

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

MONALISA DOS SANTOS

**ELETRODOS MODIFICADOS PELA TÉCNICA LbL
PARA DETECÇÃO DE ESTROGÊNIOS**

PONTA GROSSA
2014

MONALISA DOS SANTOS

**ELETRODOS MODIFICADOS PELA TÉCNICA LbL
PARA DETECÇÃO DE ESTROGÊNIOS**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Química
Aplicada no Programa de Pós-graduação
em Química Aplicada da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof. Dra. Karen
Wohnrath

Co-orientadora: Prof.Dra. Elizabeth
Weinhard de Oliveira Scheffer

PONTA GROSSA
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237 Santos, Monalisa dos
Eletrodos modificados pela técnica IbI
para detecção de estrôgenios/ Monalisa dos
Santos. Ponta Grossa, 2014.
89f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profª Drª Karen Wohnrath.
Coorientadora: Profª Drª Elizabeth
Weinhard de Oliveira Scheffer.

1. Ácido húmico. 2. Nanopartículas de
platina. 3. Silsesquioxano. 4. 17 α -etinil-
tradiol. 5. Poluentes emergentes. I. Wohnrath,
Karen. II. Scheffer, Elizabeth Weinhard de
Oliveira. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada.
IV. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

MONALISA DOS SANTOS

“ELETRODOS MODIFICADOS PELA TÉCNICA LbL PARA DETECÇÃO DE ESTROGÊNIOS.”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Orientador: Prof.^a Dr.^a Karen Wohnrath
UEPG/PR



Prof.^a Dr.^a Sueli Pércio Quinaia
UNICENTRO/PR



Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara
UEPG/PR

Ponta Grossa, 24 de abril de 2014.

Dedicatória

Aos meus amados Pais Orlando e Carmensi,
aos meus irmãos Vagner e Elieser
e ao meu noivo Diógenes

Agradecimentos

Aproveito a oportunidade para agradecer aqueles que, passando por minha vida, tornaram possível a realização deste trabalho. A todos, meu muito obrigado.

À Deus, cheio de bondade por ter me proporcionado oportunidades e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a. Dra. Karen Wohnrath pela credibilidade depositada, pela orientação desde a iniciação científica, pela amizade, por seus ensinamentos que foram essenciais para minha formação durante a realização do Mestrado.

A Prof^a. Dra. Elizabeth Weinhard de Oliveira Scheffer pela coorientação, pela amizade e pela contribuição na discussão de resultados, fatores estes que auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada de Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de realização deste curso de mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro para realizar este projeto.

Aos meus familiares pela compreensão, apoio e incentivo na realização deste Mestrado, em especial aos meus pais Orlando e Carmensi por sempre confiarem no meu potencial dando força e amor nas horas que precisei.

Ao meu irmão Vagner, pela amizade, pelo incentivo em fazer o vestibular para Licenciatura em Química, pelo auxílio nas atividades experimentais desde a iniciação científica, pelas discussões dos resultados que me auxiliaram bastante para chegar até aqui.

Ao meu noivo Diógenes por me compreender e me consolar nas horas que mais precisei no decorrer deste trabalho, pelo incentivo e por todo seu amor e carinho.

A grande amiga Rosimara Zittel, por acreditar em mim desde a graduação, pelo incentivo, pelo auxílio nos estudos do inglês, pelas suas orações e pela sua amizade.

Aos meus amigos do grupo de desenvolvimento de eletrodos modificados (GDEM) que sempre de uma forma ou de outra, procuraram me ajudar no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus queridos professores, desde a 1^o série do ensino fundamental até a graduação pelos seus ensinamentos.

“Deus nos surpreende sempre, rompe os nossos esquemas,
põe em crise os nossos projetos e nos diz: Confia em mim, não tenhas medo,
deixa-te surpreender, sai de ti mesmo, e segue-me”

Papa Francisco

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo para a obtenção de filmes finos obtidos com um polieletrólito natural e sintético, tal como o ácido húmico (AH) e o híbrido formado pela encapsulação de nanopartículas de platina na matriz de cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$). Mesmo se tratando de moléculas de natureza complexas, a deposição do filme ocorreu independente do tipo do substrato. Verificou-se que houve crescimento dos filmes pela deposição alternada dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, governadas em grande parte por interações eletrostáticas entre os grupos funcionais COOH , OH -fenólicos e enólicos do AH com o anel piridínio do SiPy^+Cl^- . A presença dos polieletrólitos nos filmes LbL construídos nas arquiteturas moleculares $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, foi obtida por medidas espectroscópicas. A partir dos deslocamentos das bandas nos espectros de absorção na região do UV-Vis dos filmes LbL em relação às soluções precursoras, inferiu-se sobre as interações entre estas moléculas. Por medidas de espectroscopia de absorção na região do FTIR e espalhamento Raman dos filmes LbL observou-se deslocamento ou desaparecimento de bandas de absorção dos precursores devido à presença de NPs-Pt nas cavidades do SiPy^+Cl^- . Verificou-se que as bandas são mais intensas e definidas nos espectros do filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ em relação ao filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$. Esta observação corrobora com resultados de UV-Vis mostrando que a partir de 12 bicamadas não há crescimento linear da absorbância em função do número de bicamadas $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$. As imagens de AFM revelaram um crescimento linear quando o filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ foi obtido, com espessura de 2,6 nm por bicamada, confirmando a natureza nanoestruturada propiciada pela organização molecular dos polieletrólitos. A caracterização morfológica demonstrou que a homogeneidade da superfície em função da quantidade de material depositada influencia os fenômenos de superfície, como a quantidade de sítios ativos, fato constatado por medidas eletroquímicas do hormônio 17α -etinilestradiol (EE2). A partir das respostas voltamétricas por pulso diferencial dos sensores investigados na presença de EE2 $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, verificou-se que o filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ apresentou valores de corrente de oxidação mais intensos ($I_{pa} = 17,26 \mu\text{A}$) e menor potencial de oxidação ($E_{pa} = 0,74 \text{ V vs Ag/AgCl}$) em relação ao eletrodo não modificado (FTO) ($I_{pa} = 8,97 \mu\text{A}$ e $E_{pa} = 1,1 \text{ V}$). Nestas condições, o eletrodo $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ obteve uma resposta linear na faixa de concentração de $1,37 \times 10^{-6}$ a $2,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se uma sensibilidade de $0,68 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) iguais a $1,06 \times 10^{-6}$ e $3,52 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Estes valores estão próximos aos relatados na literatura para eletrodos modificados com nanopartículas metálicas. Por fim, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica confirmou que a sequência de deposição, o número de bicamadas, bem como a natureza nanoestruturada dos filmes LbL afetam a resistência de transferência de carga. Portanto, a presença do AH na arquitetura do filme diminui a resistência de transferência de carga pelo fato desta macromolécula ser constituída por grande quantidade de grupos funcionais, os quais disponibilizam maior número de sítios para interações com o grupo piridínio do SiPy^+Cl^- , e consequentemente disponibilizam maior quantidade de Np-Pt na superfície do eletrodo.

Palavras-chave: Ácido Húmico, Nanopartículas de Platina, silsesquioxano, 17α -etinilestradiol, poluentes emergentes.

ABSTRACT

This work presents a study for preparation of thin films obtained with a natural and synthetic polyelectrolyte, such as humic acid (HA) and by the hybrid prepared by encapsulation of platinum nanoparticles in the matrix of chloride 3-n-propylpyridinium silsesquioxane ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$). Even when dealing with molecules of complex nature, the film deposition occurred regardless of the type of substrate. It was found that there was growth of films by alternate deposition of polyelectrolytes HA and $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, governed largely by electrostatic interactions between functional groups COOH , OH -phenolic of HA with pyridinium ring of SiPy^+Cl^- . The presence of polyelectrolytes in LbL films built on molecular architectures $(\text{HA/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ and $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{HA})_n$, was obtained by spectroscopic measurements. From the shifts of the bands in the absorption spectra in the UV-Vis region of LbL films in relation to the precursor solutions, it was inferred on the interactions between these molecules. Measurements of absorption spectroscopy FTIR and Raman scattering of the LbL film were observed by displacement or disappearance of absorption bands due to the presence of precursors of Pt-NPs cavities of SiPy^+Cl^- . It was found that bands were more intense and defined in the spectra of the film $(\text{HA/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ in relation to the $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{HA})_{30}$ film. This observation corroborates the results of UV-Vis showing that from 12 bilayers no linear growth of absorbance as a function of number of bilayers $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{HA})_{12}$. The AFM images showed a linear increase when the film $(\text{HA/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ was obtained with a thickness of 2.6 nm per bilayer, confirming the nanostructured nature provided by the molecular organization of polyelectrolytes. Morphological characterization showed that the homogeneity of the surface in function of the amount of deposited materials influence of surface phenomena, such as the number of active sites, as evidenced by electrochemical action of the hormone 17α -ethinylestradiol (EE2). From the differential pulse voltammetric response of the investigated in the presence of EE2 $6.25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, it was found that the film $(\text{HA/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ showed high peak current ($I_{pa} = 17.26 \mu\text{A}$) and minor oxidation potential ($E_{pa} = 0.74 \text{ V}$ vs Ag/AgCl) in relation to no modified electrode (FTO) ($I_{pa} = 8.97 \mu\text{A}$ e $E_{pa} = 1.1 \text{ V}$). Under these conditions, the electrode $(\text{HA/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ obtained a linear response in the concentration range of 1.37×10^{-6} to $2.14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, yielding a sensitivity 0.68 mmol L^{-1} and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) equal to 1.06×10^{-6} and $3.52 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. These values are close to those reported in the literature for electrodes modified with metals nanoparticles. Finally, the technique of electrochemical impedance spectroscopy confirmed that the sequence of deposition, the number of bilayers, as well as the nature of the nanostructured films LbL affect the charge transfer resistance. Therefore, the presence of HA in the architecture of the film decreases the charge transfer resistance of the fact that this macromolecule consist of large number of functional groups, which provide a greater number of sites occur for interactions with the pyridinium group SiPy^+Cl^- and consequently higher amounts of Pt-Np on the electrode surface.

Keywords: Humic Acid, Platinum Nanoparticles, silsesquioxane, 17α -ethinylestradiol, emerging pollutants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura básica dos esteróides.....	22
Figura 2- Estrutura dos hormônios esteróides (a) 17 β -etinilestradiol, (b) estrona, (c) estriol, (d) 17 α -etinilestradiol.....	23
Figura 3- Esquema da deposição de bicamadas de um filme LbL.....	28
Figura 4 – Estrutura idealizada do (SiPy ⁺ Cl ⁻).....	29
Figura 5- Modelo para a estrutura dos ácidos húmicos em três dimensões. Na estrutura os espaços vazios estão apresentados em A, B e C.....	32
Figura 6 – Esquema da síntese das Nps-Pt nas cavidades do SiPy ⁺ Cl ⁻	38
Figura 7- Esquema da formação de um filme LbL contendo 1 bicamada de (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁ sobre diferentes substratos (FTO, silício e quartzo).....	39
Figura 8 – Esquema da formação de um filme <i>drop-coated</i> constituídos pelos polieletrólitos AH e Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ sobre diferentes substratos (FTO, Quartzo e silício).....	40
Figura 9 - Célula eletroquímica contendo três eletrodos conectados ao potenciostato μ -AUTOLAB Tipo III, ambos conectados a um software no computador.....	43
Figura 10- Espectros de absorção na região do UV-Vis (a) das soluções aquosas 0,04 g L ⁻¹ e 0,5 g L ⁻¹ de AH; (b) do monitoramento da solubilidade da solução 0,5 g L ⁻¹ de AH em tempos variados (de 1 minuto a 72 horas); (c) das soluções aquosas de 0,5 g L ⁻¹ de AH, Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ e 0,5 g L ⁻¹ de SiPy ⁺ Cl ⁻	45
Figura 11 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da cinética de deposição para o filme LbL (a) (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ com o tempo de deposição de (30 segundos a 5 minutos) e (b) relação entre o tempo de deposição e a absorbância da banda e 264 nm.....	46
Figura 12- Espectros de absorção na região do UV-Vis para os filmes LbL de (a) (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n e (c) (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) _n . Relação entre o número de bicamadas e a absorbância da banda entre 264 e 262 nm de (b) (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) e (d) (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) _n	48
Figura 13 - Espectros FTIR de: (a) AH (pó) (pastilha de KBr), filme <i>drop-coated</i> de AH, filmes LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀ e filme LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ . (b) filmes <i>drop-coated</i> de SiPy ⁺ Cl ⁻ , Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ e filmes LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀ e (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ . Todos os filmes foram obtidos sobre silício.....	51
Figura 14- Espectros de espalhamento Raman para os filmes (a) <i>drop-coated</i> de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ , (b) <i>drop-coated</i> de AH, (c) filme LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀ e (d) filme LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ todos depositados sobre Si.....	54

Figura 15- Imagens de AFM; (a) substrato FTO, (b) (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (c) (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₅, (d) (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀, (e) (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₅, (f) (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₂₀, (g) (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₅ e (h) (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₁₀. A janela de varredura para as imagens foi de 5x5µm.....56

Figura 16- Voltamogramas cíclicos do FTO, dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH sobre o substrato FTO, em NaH₂PO₄ 0,1mol L⁻¹, pH = 7 (a) na ausência de EE2 e (b) na presença de 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ EE2 (v = 50 mV s⁻¹).....58

Figura 17- Representação da etapa de oxidação do EE2 a radical fenóxi.....59

Figura 18- Voltamogramas de (a) pulso diferencial e (b) onda quadrada do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, em NaH₂PO₄ 0,1mol L⁻¹, pH = 7 na presença de 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de EE2. Parâmetros utilizados para VPD: $E_{pulse} = 0,002V$, $t_{pulse} = 0,10 s$ e $v = 50 mV s^{-1}$ e VOQ: $f = 30 Hz$, $a = 80 mV$ e $\Delta Es = 2mV$60

Figura 19- Voltamogramas de pulso diferencial do FTO, filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH sobre o substrato FTO, em NaH₂PO₄ 0,1mol L⁻¹, pH = 7, na presença de EE2 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. ($E_{pulse} = 0,002V$, $t_{pulse} = 0,10s$ e $v = 50 mV s^{-1}$).....61

Figura 20- Voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, onde n = 1, 3, 8 e 12 bicamadas, na presença de 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ EE2 ($E_{pulse} = 0,002V$, $t_{pulse} = 0,10s$, $v = 50 mV s^{-1}$).....64

Figura 21- Voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de EE2 6,25 X 10⁻⁵ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suportes 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pHs. Parâmetros utilizados: $E_{pulse} = 0,002V$, $t_{pulse} = 0,10s$ e $v = 50 mV s^{-1}$66

Figura 22- Voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de EE2 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ nos pHs 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da solução de eletrólito suporte NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹; (b) relação entre pH e os valores de potencial obtidos67

Figura 23 - Espectros de UV-Vis do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ após imersão por 1 minuto em solução de NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ com pH 7, 8 e 10.....69

Figura 24 - (a) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de diferentes concentrações de EE2 1,37 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ a 2,14x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e (b) Curva analítica para EE2 em NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ em pH 7 e nos parâmetros ($E_{pulse} = 0,002V$) ($t_{pulse} = 0,10s$) e ($v = 50 mV$).....70

Figura 25 - Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para (a) os eletrodos FTO, *drop-coated* de AH, *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻, LbL de (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ (b) os eletrodos FTO, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ na presença de 3,84 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de EE2. Utilizou-se solução de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.....73

Figura 26- Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de EE2. Utilizou-se solução de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.....76

Figura 27- (a) Representação Nyquist para os filmes LbL, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.....77

Figura 28- Circuito equivalente proposto para os diagramas de Nyquist obtidos nos estudos utilizando os eletrodos FTO, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvido em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de substâncias classificadas como desreguladores do sistema endócrino.....	21
Tabela 2 - Concentrações do hormônio estrogênio EE2 encontrados em diferentes condições ambientais.....	24
Tabela 3 - Propriedades físicas do hormônio 17 α -etinilestradiol.....	25
Tabela 4 - Métodos de detecção para hormônios com seus respectivos limites de detecção (LD).....	26
Tabela 5 - Filmes LbL construídos com diferentes polieletrólitos e tempos de imersão diferentes.....	47
Tabela 6 - Bandas observadas nos espectros FTIR no modo de transmissão dos filmes <i>drop-coated</i> de SiPy ⁺ Cl ⁻ , Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ e AH e dos filmes LbL (AH/ Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ e (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀	52
Tabela 7- Bandas observadas nos espectros Raman dos filmes <i>drop-coated</i> de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ , <i>drop-coated</i> de AH, filme LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀ e (d) filme LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ . Todos filmes foram depositados sobre Si.....	54
Tabela 8- Rugosidade média dos grãos (nm) da superfície do FTO, dos filmes LbL (AH / Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n contendo 3, 5, 10, 15 e 20 bicamadas e do filme LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ / AH) _n contendo 5 e 10 bicamadas.....	55
Tabela 9 – Valores de potenciais de pico anódico (E _{pa}) e correntes de pico anódica (I _{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ , (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃ e filmes <i>drop-coated</i> de (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ e (AH) ₃	62
Tabela 10 – Valores de potenciais de pico anódico (E _{pa}) e correntes de pico anódica (I _{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n contendo diferentes números de bicamadas (1, 3, 8 e 12).....	64
Tabela 11 - Eletrólitos suportes utilizados na determinação de EE2 com seus respectivos valores de pH, E _{pa} e I _{pa}	66
Tabela 12 – Valores obtidos de E _{pa} e I _{pa} com o filme LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ nos pHs 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da solução de eletrólito suporte NaH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na presença de EE2 6,25 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	68
Tabela 13 – Valores de concentração de EE2 e correntes de pico anódica (I _{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	70
Tabela 14 – Valores de LD e LQ encontrados na literatura para os hormônios estrogênios obtidos com diferentes eletrodos modificados.....	72

Tabela 15 - Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa *ZView* a partir dos semicírculos obtidos com os eletrodos FTO, AH, Pt-SiPy⁺Cl⁻, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.....73

Tabela 16 - Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa *ZView* a partir dos semicírculos obtidos com o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de EE2 e na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.....76

Tabela 17 - Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa *ZView* a partir dos semicírculos obtidos com os filmes (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7.....77

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico

AFM – Microscopia de força atômica

AH – Ácido húmico

CLABMU – Complexo de Laboratórios Multiusuários

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector photodiodearray.

CuTsPc – Ftalocianina tetrassulfonada de Cobre

DA – Dopamina

DDB – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

DE – Desregulador Endócrino

E2 – 17 β - estradiol

EE2 – 17 α - etinilestradiol

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

Epa – Potencial de pico anódico

ECV – Eletrodo de carbono vítreo

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

ETEs – Estações de tratamento de esgoto

FTIR – Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier

FTO – Vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor

GDEM - Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados

HDL – Hidróxidos duplos lamelados

Ipa – Corrente de pico anódico

ITO – Vidro recoberto óxido de estanho dopado com índio

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LbL – Layer-by-Layer

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

MET – Microscopia Eletrônica de transmissão

n – Número de bicamadas

Nps – Nanopartículas

Nps-Pt – Nanopartículas de platina

NTCPM – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PAA - Poli (ácido acrílico)

PAH – Cloreto de polialilamina

PCF– Pesticida pentaclorofenol

PDAC – Poli (cloreto de dimetildialiamônia)

PE – Poluentes Emergentes

PEI – Poli (etileno imina)

PSS - Poli (estireno sulfonado)

PVS – Ácido polivinil sulfônico

PPV-SO₃– Poli -vinelenofenileno - sulfonado

Pt-SiPy⁺Cl⁻ – Nanohibrido

PMZ – Cloridrato de prometazina

SE – Sistema Endócrino

SiPy⁺Cl⁻– Cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano

UV-Vis – Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

VC – Voltametria Cíclica

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O sistema endócrino (SE).....	19
2.2 Os Desreguladores Endócrinos DE.....	19
2.3 Os hormônios como DE.....	22
2.4 O hormônio 17 α -etinilestradiol (EE2)	24
2.5 Determinação de hormônios estrogênicos.....	25
2.6 Obtenção de eletrodos modificados pela técnica LbL.....	27
2.7 Polieletrólitos empregados na formação de filmes finos obtidos pela técnica LbL.....	28
2.7.1 Cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy ⁺ Cl ⁻).....	29
2.7.2 Ácido Húmico (AH).....	32
2.8 Eletrodos modificados com AH.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.1. Procedências dos reagentes e substratos.....	36
4.2 Preparo das soluções.....	36
4.2.1 Solução trabalho 17- α etinilestradiol (EE2).....	36
4.2.2 Solução do polieletrólito AH.....	36
4.2.3 Solução de eletrólito suporte.....	37
4.2.4 Solução de ferrocianeto de potássio II (K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O) e ferricianeto de potássio III (K ₃ [Fe(CN) ₆])	37
4.2.5 Síntese das Nps-Pt ao polímero SiPy ⁺ Cl ⁻	37
4.3 Procedimentos de limpeza dos substratos e preparação dos filmes.....	38
4.4 Fabricação dos filmes finos.....	38
4.4.1 Fabricação dos filmes LbL.....	38
4.4.1.1 Cinética de crescimento dos filmes LbL.....	39
4.4.2 Fabricação dos filmes <i>drop-coated</i>	40
4.5 Medidas de caracterização espectroscópicas dos filmes.....	41
4.5.1 Espectroscopia de Absorção na região do UV-Vis.....	41
4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do FTIR.....	41
4.5.3 Espectroscopia de espalhamento Raman.....	41

4.6 Potencial Zeta (ζ)	42
4.7 Medidas de caracterização morfológica dos filmes.....	42
4.7.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)	42
4.8 Medidas de Caracterização Eletroquímica.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1 Caracterizações dos polieletrólitos precursores	44
5.2 Obtenção e caracterização espectroscópicas dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n e (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) _n	46
5.3 Caracterização morfológica dos filmes LbL por AFM.....	55
5.4 Caracterização eletroquímica dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ , (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃ e filmes <i>drop-coated</i> de (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ e (AH) ₃	57
5.4.1 Determinação do hormônio 17 α -etinilestradiol (EE2) por voltametria cíclica (VC)	57
5.4.2 Determinação do EE2 por voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ)	60
5.5 Caracterização eletroquímica das arquiteturas dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ , (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃ e filmes <i>drop-coated</i> de (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ e (AH) ₃ por VPD.....	61
5.6 Espectroscopia de Impedância eletroquímica dos filmes LbL.....	72
6. CONCLUSÃO.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, há uma preocupação científica com relação a alguns contaminantes ambientais considerados como poluentes emergentes (PE) (FONTENELE et al. 2010; REIS FILHO et al. 2006). Entre os PE há um grupo de compostos que têm demonstrado efeitos adversos sobre o sistema endócrino dos seres humanos e de outros animais, afetando a saúde, o crescimento, a reprodução destas espécies (BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; SCHIAVINI et al. 2011) e podendo também atuar como indutores de cânceres (NAGPAL e MEAYS, 2009). Estes contaminantes são conhecidos como Desreguladores Endócrinos (DE).

As definições propostas para os DE convergem, e podem ser assim resumidas: “trata-se de um agente exógeno presente no ambiente e que assume idêntica função de um hormônio natural dos seres vivos, capaz de interferir no funcionamento normal do sistema endócrino, como na síntese, transporte, ligação, ação, ou eliminação de hormônio natural no corpo” (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO et al. 2007; ALVES et al. 2007; NAGPAL e MEAYS, 2009; LOPES et al. 2010; SCHIAVINI et al. 2011).

Os DE abrangem inúmeras substâncias químicas encontradas em produtos de uso doméstico, farmacêutico, industrial e agrícola tais como os inseticidas, detergentes, repelentes, bloqueadores solar, desinfetantes, fragrâncias solventes, retardantes de chama, hormônios naturais e sintéticos entre outros PE que apresentam comprovada atividade hormonal (REIS FILHO et al. 2007; BILA e DEZOTTI, 2007; ALVES et al. 2007; FONTENELE et al. 2010).

Tais compostos vêm sendo encontrados no meio ambiente principalmente em efluentes industriais, em esgoto doméstico, em solos, sedimentos, e nas estações de tratamento de água e esgoto em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} (BILA e DEZOTTI, 2007). Eles se dispersam no ambiente após serem eliminados através do esgoto lançado diretamente nos corpos d’ água ou através dos efluentes, mesmo após tratamento (LOPES et al. 2010).

As principais classes de DE são geralmente designadas com relação ao seu potencial estrogênico, sendo os hormônios naturais e sintéticos aqueles que apresentam potenciais mais elevados (FERNANDES et al. 2011).

O foco neste trabalho foi o estrogênio 17 α -etinilestradiol (EE2), um hormônio feminino sintético derivado do hormônio natural 17 β -estradiol (E2) (NAGPAL e MEAYS, 2009). O EE2 é considerado um DE de grande importância, devido a sua ampla utilização em

medicamentos contraceptivos, nas terapias de reposição hormonal na menopausa ou na prevenção do aborto (BILA e DEZOTTI, 2007) e no tratamento do câncer de próstata, sendo assim excretado através da urina com mais frequência do que os hormônios naturais (REIS FILHO et al. 2006).

A detecção do EE2 em amostras ambientais pode servir de alerta, desencadeando ações que tragam novos métodos de descontaminação de efluentes e esgotos de forma a evitar a impactação do meio ambiente e o surgimento de doenças (REIS FILHO et al. 2006). De maneira geral, os métodos/equipamentos empregados nesta determinação apresentam alto custo, impedindo que se torne uma análise de rotina e aplicada em larga escala.

Nesta perspectiva, este projeto visou a construção de um sensor eletroquímico contendo nanopartículas de platina (Nps-Pt) encapsuladas na matriz de cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-). O híbrido formado, Pt- SiPy^+Cl^- foi imobilizado nas superfície de eletrodos, combinadas com ácido húmico (AH) a partir da utilização da técnica *Layer-by-Layer* (LbL). Esta superfície modificada foi então aplicada como mediadora redox para determinação de EE2.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O sistema endócrino (SE)

O sistema endócrino dos seres humanos e de outros animais é formado por glândulas e órgãos que juntamente ao sistema nervoso, coordenam os processos fisiológicos de um organismo (LEHNINGER, 2007). Estes órgãos apresentam um conjunto de células responsáveis pela síntese e excreção dos hormônios na corrente sanguínea, que atuam diretamente sobre a funcionalidade dos órgãos (REIS FILHO et al. 2006). É um sistema de comunicação que age através de mensageiros químicos: os hormônios, que circulam pelo corpo regulando a atividade e o metabolismo, integrando o organismo como um todo (REIS FILHO et al. 2007).

As principais glândulas que constituem o sistema endócrino são o hipotálamo, hipófise, paratireóide, tireóide, adrenais, pâncreas, ovários (mulher) e testículos (homem) (LEHNINGER, 2007). A presença dos DE pode manifestar seus efeitos em cada um dos estágios da função hormonal, tais como, na produção de hormônios, ligação aos receptores, ação hormonal excreção e biotransformação (LEHNINGER, 2007). Estes atuam nos sítios receptores e no conjunto de enzimas associado ao ciclo hormonal e nas interconexões com o sistema nervoso e imunológico (REIS FILHO et al. 2007).

Nesta perspectiva, há uma preocupação mundial com relação aos DE devido aos efeitos provocados no sistema endócrino de humanos e outros animais (BILA e DEZOTTI, 2007). Os principais contaminantes ambientais e seus efeitos serão abordados a seguir.

2.2 Os Desreguladores Endócrinos (DE)

Diversos compostos químicos presentes em efluentes urbanos e industriais, no esgoto doméstico e no ambiente como um todo, inclusive em águas superficiais, hoje são considerados poluentes emergentes (PE) (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO et al. 2007). O termo PE não se refere a novas drogas ou compostos recém-descobertos, mas a um grupo de substâncias ambientalmente importantes em razão dos níveis crescentes de utilização e de contaminação (REIS FILHO et al. 2007; DURIGAN et al. 2012).

Estes compostos estão presentes no ambiente em concentrações realmente muito baixas, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , mas mesmo nessas concentrações alguns possuem atividade estrogênica (BILA e DEZOTTI, 2007; FERNANDES et al. 2011) e por isso são

considerados desreguladores endócrinos (DE) causando efeitos adversos aos organismos vivos, quando expostos a estes contaminantes (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO et al. 2006).

Os PE abrangem uma grande faixa de classes de estruturas químicas distintas de origem natural e sintética (BILA e DEZOTTI, 2007; DURIGAN et al. 2012). As substâncias naturais classificadas como DE são os fitoestrogênios, androgênios e os estrogênios naturais. As substâncias sintéticas são os produtos utilizados na agricultura e seus subprodutos, tais como, os pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; produtos químicos utilizados na indústria química e seus subprodutos, ftalatos, bisfenol A, entre outros; compostos farmacêuticos, tais como, os estrogênios sintéticos, dietilestilbestrol e 17 α -etinilestradiol, entre outros. A Tabela 1 apresenta algumas substâncias PE conhecidas por serem DE.

Os compostos citados na Tabela 1 são considerados como DE devido a sua atividade sobre o sistema endócrino. Alguns efeitos sobre os animais são: feminização de peixes machos, diminuição na eclosão de ovos de pássaros, de peixes e de tartarugas; indução da síntese de vitelogenina no plasma de peixes; problemas no sistema reprodutivo de peixes, répteis, pássaros e mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO et al. 2006; DHAMODHARAN et al. 2011; SCHIAVINI et al. 2011; FERNANDES et al. 2011).

Nos seres humanos os efeitos ocasionados são redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, de próstata, de tireóide, de testículos, de ovário e de útero, desenvolvimento sexual anormal, aumento da incidência de ovários policísticos, distúrbios nas funções do ovário (no crescimento folicular e na ovulação), na fertilização, gravidez, endometriose (BILA e DEZOTTI, 2003; REIS FILHO et al. 2006; BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; FERNANDES et al. 2011; BATISTA et al. 2011; SCHIAVINI et al. 2011) e pode levar ainda a alterações puberais e reprodutivas em crianças (ALVES et al. 2007).

A exposição aos DE pode ocorrer através do contato direto e indireto. Por exemplo, no local de trabalho, no ambiente doméstico, através do ar, da ingestão de água e de alimentos contaminados e ao contato com o solo (BILA e DEZOTTI, 2007).

Segundo Bila e Dezotti (2007), uma das maiores exposições aos DE ocorre através da ingestão de alimentos contaminados e estima-se que mais de 90% são absorvidos por via digestiva. A contaminação de alimentos também pode estar relacionada ao uso de alguns hormônios na criação de animais consumidos na alimentação humana.

Tabela 1- Exemplos de substâncias classificadas como desreguladores do sistema endócrino.

Pesticidas
Atrazina, lindano, triclosan, detametrin, carbofurano, penconazol, DBCP (dibromocloropropano), PCP (pentaclorofenol), rifuralin, tridemorfos, propiconazol e etc.
Metais pesados
Cádmio, mercúrio, chumbo e zinco.
Fármacos
Fluoxetina, tamoxifan, fluvastatina, medetomidina, propranolol, hormônios sintéticos (dietilestilbestrol e 17 α -etinilestradiol).
Esteróides naturais
Androgênios, estrogênios (estrone, estriol e 17 β -estradiol) e fitoestrogênios (daidzeína, genisteína, metaresinol e enterodiol).
Ftalatos
Dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), butilbenzilftalato (BBP) e etc.
Alquifenóis
Nonilfenol, nonilfenoletoxilado, octilfenol, octilfenoletoxilado.
Bisfenol
Bisfenol A
Parabenos
Benzilparabeno, isobutilparabeno, butilparabeno, n-propilparabeno, etilparabeno e metilparabeno.
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Naftalina, fluoreteno, pireno, fluoreno e etc.
Compostos orgânicos de estanho
Tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)
Organoclorados
Dibenzo-p-dioxina, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina) e etc.
Policlorados de bifenilas
2,4,4'-triclorobifenil, 2,2', 5,5'-tetraclorobifenil e etc.
Retardantes de chama bromados
Polibromobifenila (PBB), hexabromociclododecano (HBCD), tetrabromobisfenol A (TBBA) e etc.

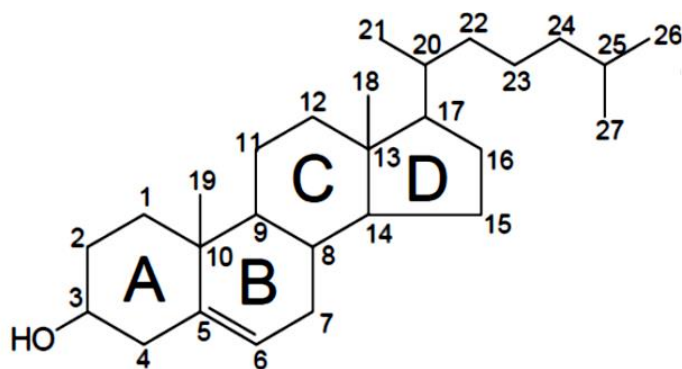
Fonte: Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007.

Os hormônios estrogênicos naturais e sintéticos são aqueles que apresentam maior potencial como desreguladores (REIS FILHO et al. 2006; DURIGAN et al. 2012) e isso faz com que sejam os maiores responsáveis por provocar alterações endócrinas em organismos expostos principalmente em águas superficiais (TORRES et al. 2012).

2.3 Os hormônios como DE

Quimicamente, os hormônios são proteínas provenientes de aminoácidos conhecidos como esteróides (RAIMUNDO, 2007). Segundo a IUPAC (do inglês - *International Union of Pure and Applied Chemistry*), os esteróides fazem parte de uma classe de hormônios com estrutura básica formada de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si. Todos os esteróides apresentam em comum a estrutura química denominada Ciclo-pentano-peridro-fenantreno ou ciclo [a] fenantreno: um núcleo cíclico similar, semelhante ao núcleo do fenantreno (anéis A, B e C), que são ligados a um anel ciclopentano (D) (PÉREZ e ESCANDAR, 2013) (Figura 1). Estes são biossintetizados a partir do colesterol (LOPES et al. 2008) formando um grande grupo de compostos solúveis em gordura (lipossolúveis).

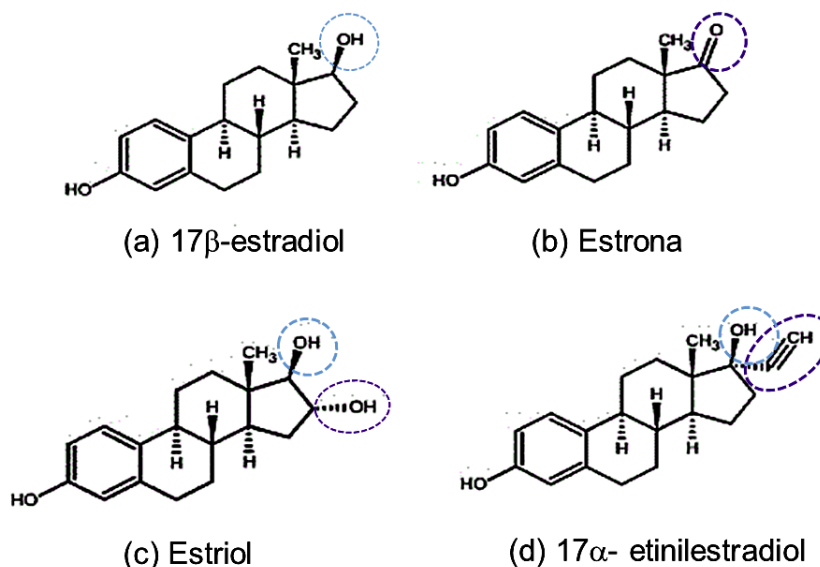
Figura 1- Estrutura básica dos esteróides.



Fonte: PÉREZ e ESCANDAR, 2013 e MACHADO, 2010.

Na estrutura apresentada na Figura 1 podem existir ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, dando origem a uma série de hormônios esteróides (PÉREZ e ESCANDAR, 2013) com importante papel na fisiologia humana e alguns hormônios são produzidos sinteticamente com finalidade médico-terapêutica. A Figura 2 mostra alguns dos hormônios naturais e sintéticos provenientes da estrutura ciclo [a] fenantreno.

Figura 2- Estrutura dos hormônios esteróides (a) 17 β -etinilestradiol, (b) estrona, (c) estriol, (d) 17 α -etinilestradiol.



Fonte: Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007.

Os hormônios estão envolvidos na reprodução sexual tanto de homens quanto de mulheres e agem como uma espécie de mensageiros químicos que se comunicam em diferentes tipos de células, denominadas células alvo, as quais identificam os hormônios através de receptores que são estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular (MARTINEZ et al. 2012). Eles são responsáveis pelo desenvolvimento de características femininas no início da puberdade e possuem um papel importante na diferenciação sexual, no desenvolvimento pré e pós-nascimento (LEVENT, 2012).

Os esteróides sexuais são classificados em três grupos, os estrogênios, androgênios e progesterona. Os estrogênios podem ser de origem natural e sintética, como exemplo de hormônios femininos naturais tem-se o 17 β -estradiol (Figura 2 (a)), a estrona (Figura 2 (b)) e o estriol (Figura 2 (c)) e como sintético têm-se o 17 α -etinilestradiol (Figura 2(d)) (BILA e DEZOTTI, 2007; MARTINEZ et al. 2012).

Os hormônios estrogênios são excretados através da urina por mulheres, por fêmeas de outras espécies animais e em menor quantidade, por homens na forma de conjugados polares inativos, como glucoronides e sulfatos (BILA e DEZOTTI, 2007). Estas substâncias uma vez descartadas no esgoto doméstico aportam no meio ambiente através do lançamento direto no curso d' água, e mesmo após tratamentos convencionais em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Ainda que, em baixas concentrações, a deposição contínua de hormônios

estrogênios no ambiente ocasiona um efeito acumulativo destes desreguladores ao longo do tempo.

2.4 O hormônio 17 α -etinilestradiol (EE2)

O composto 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio feminino sintético derivado do hormônio natural 17 β -estradiol (E2) e pertence ao grupo dos estrogênios (RAIMUNDO, 2007) (Figura 2 (a) e (d)).

O EE2 é amplamente empregado na medicina como contraceptivo (REIS FILHO et al. 2006; MACHADO, 2010), no tratamento de algumas disfunções hormonais, tais como, endometriose, dismenorreia grave, síndrome do ovário policístico e no tratamento do câncer de próstata (VERBINNEN e NUNES, 2010), sendo assim liberado através da urina.

O EE2 excretado pode ser encontrado em diversos compartimentos no ambiente como águas superficiais e subterrâneas, esgoto bruto ou tratado, sedimentos, solos, lodos biológicos de estações de tratamento de efluentes e esgotos, chorumes de aterros sanitários (BILA e DEZOTTI, 2007) entre outros, em concentrações baixas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . A Tabela 2 resume as faixas de concentração do EE2 em diferentes condições ambientais.

Tabela 2–Concentrações do hormônio estrogênio EE2 encontrados em diferentes condições ambientais.

Concentrações do EE2 no ambiente			Condições ambientais
$\mu\text{g L}^{-1}$	ng L^{-1}	mol L^{-1}	
0,005	5	$3,01 \times 10^{15}$	Esgoto doméstico
0,01	10	$6,02 \times 10^{15}$	
0,0045	4,5	$2,709 \times 10^{15}$	
0,001	1	$6,02 \times 10^{14}$	Efluente de ETEs
0,009	9	$5,418 \times 10^{15}$	
0,017	17	$1,023 \times 10^{16}$	Lodo ativado de ETEs
0,0009	0,9	$5,418 \times 10^{14}$	Sedimento marinho
0,0005	0,5	$3,01 \times 10^{14}$	Água potável

Fonte: Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007.

Tendo em vista um controle ambiental objetivando a minimização dos impactos ocasionados pelos hormônios estrogênios, a determinação de compostos como o EE2 em amostras ambientais, tais como, águas superficiais, efluentes, esgotos domésticos, sedimentos entre outros é de extrema importância. Na Tabela 3 encontram-se algumas propriedades físicas do EE2.

Tabela 3- Propriedades físicas do hormônio 17 α -etinilestradiol.

Propriedades Físicas	Características
Nº CAS	57-63-6
Aparência	Sólido branco
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Massa Molecular	296,4 g
Solubilidade em água	4,8 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos	Etanol (59 mg/mL a 25 °C) DMF (~20 mg/mL a 25 °C) DMSO (59 mg/mL a 25 °C), Acetona e acetonitrila
Ponto de ebulição	182 – 184 °C
Massa Específica	1,210 (mg L ⁻¹) (a 20°C)
Sensibilidade	à luz
Armazenamento	-20 °C
Densidade	~1,2 g/cm ³
pK _a	10.24
Pressão de Vapor	4,5x10 ⁻¹¹ (mmHg)
Meia-Vida	4 – 6 (dias)

Fonte: adaptado de: NAGPAL e MEAYS, 2009.

2.5 Determinações de hormônios estrogênicos

Muitos trabalhos relatados na literatura são dedicados ao desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e quantificação de DE e avaliação de sua atividade estrogênica em matrizes ambientais complexas, tais como águas superficiais e subterrâneas (LEVENT, 2012), esgoto doméstico (REIF et al. 2008), efluentes em estação de tratamento (SANTOS et al. 2010), sedimentos marinhos (BILA e DEZOTTI, 2007), solos (BILA e DEZOTTI, 2007) e lodo biológico (LEVENT, 2012). Na Tabela 4 são destacados vários métodos para determinação de hormônios citados na literatura e seus respectivos valores de limite de detecção (LD).

Dentre os métodos para determinação de hormônios, listados na Tabela 4, tem-se os métodos cromatográficos, (cromatografia líquida de alta eficiência com detector "photodiodearray", CLAE-DAD e cromatografia gasosa com detector MS etc.) e os testes toxicológicos como YES, ELEISA, E-Screen, ELRA (LEVENT, 2012).

No entanto, os métodos cromatográficos são os mais utilizados para a detecção de hormônios estrogênicos devido a sua alta seletividade e sensibilidade, porém apresentam alto custo, principalmente devido ao equipamento e sua manutenção, compreendida pelo consumo e descarte dos solventes utilizados. Por este motivo, como alternativa a esta limitação, os métodos eletroquímicos têm se destacado, com medidas mais rápidas e análises realizadas

diretamente na amostra. Atualmente potenciostatos portáteis possibilitam inclusive a realização de medidas, *in situ*, com baixo custo em relação às demais técnicas. Além disso, a geração de resíduos é menor, e com o emprego de eletrodos seletivos, as respostas se tornam mais seletivas e sensíveis, o que possibilita a obtenção de baixos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), eliminando etapas de pré-concentração normalmente empregadas em técnicas cromatográficas.

Tabela 4 - Métodos de detecção para hormônios com seus respectivos limites de detecção (LD).

Métodos de detecção	Estrogênios	LD (mol L ⁻¹)	Referência
Cromatografia HPLC-DAD	Etinilestradiol (EE2)	1,7 x10 ⁻¹³	TORRES et al. 2012
Cromatografia HPLC-DAD	Estriol (E3)	3,5 x10 ⁻¹³	TORRES et al. 2012
Cromatografia HPLC-DAD	Etinilestradiol (EE2)	6,7 x10 ⁻¹³	MCADAM et al. 2010
Cromatografia HPLC-DAD	Estrona (E1)	3,7 x10 ⁻¹³	MCADAM et al. 2010
Cromatografia HPLC-DAD	Estradiol (E2)	2,2 x10 ⁻⁸	LOPES et al. 2010
Cromatografia CG/MS	Etinilestradiol (EE2)	3,4 x10 ⁻¹⁰	PESSOA et al. 2012
Cromatografia CG/MS	Estrona (E1)	1,8 x10 ⁻¹⁰	PESSOA et al. 2012
Cromatografia HPLC-DAD	Estriol (E3)	2,3 x10 ⁻¹⁰	VERBINNEN et al. 2010
Cromatografia HPLC-DAD	Etinilestradiol (EE2)	42 x10 ⁻⁹	VERBINNEN et al. 2010
Eletroquímica (VC e VOQ)	Estrona (E1)	8,4 x10 ⁻⁷	LIN e LI, 2006
Eletroquímica (VC e VOQ)	Estriol (E3)	6,2 x10 ⁻⁷	LIN e LI, 2006
Eletroquímica (VC e VOQ)	Estriol (E3)	1,7 x10 ⁻⁷	SANTOS et al. 2010
Eletroquímica (VC e EIE)	Estradiol (E2)	1,6 x10 ⁻⁸	YUAN et al. 2011
Eletroquímica (VC)	Etinilestradiol (EE2)	3,4 x10 ⁻¹⁴	MARTÍNEZ et al. 2012

Fonte: A autora

Devido às vantagens dos métodos eletroquímicos, estes são tidos como uma alternativa eficiente em relação às demais técnicas, para determinação de hormônios estrogênios.

Muitos estudos relatam a detecção eletroquímica de DE em ambientes aquáticos (LEVENT, 2012; NOGUEIRA, 2003), urina (MARTINEZ et al. 2012) e fármacos (REIF et al. 2008). Dentre as técnicas eletroquímicas que podem ser utilizadas para detecção

de DE encontram-se as técnicas de voltametria cíclica (VC) (LIN e LI, 2006), voltametria de pulso diferencial (VPD) (CRESPILHO e LOST, 2012) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) (LIN e LI, 2006).

Santos et al. (2010), utilizaram as técnicas de VC e VOQ e observaram que o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foi eficaz para a determinação do hormônio estrogênio estriol (E3) em produto farmacêutico e em amostra de urina coletada durante a gravidez. A partir da técnica de VC, observaram um potencial de oxidação deste hormônio em 0,35 V e pela VOQ obtiveram a curva analítica, com um limite de detecção (LD) de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($49 \mu\text{g L}^{-1}$) e limite de quantificação (LQ) de $8,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($245 \mu\text{g L}^{-1}$).

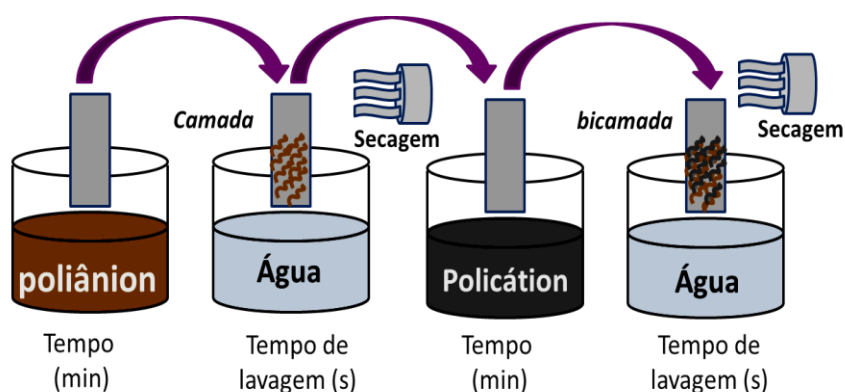
De maneira que, em função da melhora na sensibilidade e seletividade na determinação e quantificação de hormônios estrogênicos, eletrodos quimicamente modificados podem ser uma alternativa eficiente por serem ainda mais seletivos, de menor custo do que os eletrodos convencionais, facilitando no processo de transferência de elétrons.

2.6 Obtenção de eletrodos modificados pela técnica LbL

Dentre as técnicas de modificação de eletrodos a partir da obtenção de filmes finos, o processo de automontagem eletrostática camada por camada denominado ELBL (do inglês *electrostatic Layer-by-Layer*) ou SAM (*self-assembly*) tem apresentado grande destaque (DECHER e SCHLENOFF, 2012). Este processo foi proposto pela primeira vez no início da década de 1980 por Sagiv onde era relatado que a formação de multicamadas ocorria por interações químicas, especificamente por ligações covalentes entre as camadas adjacentes. Anos mais tarde este processo foi reformulado por Decher et al. (1994), os quais sugeriram que um novo método de fabricação de filmes baseado na adsorção espontânea, química ou física, de camadas ultrafinas de polieletrólitos com cargas opostas sobre a superfície de um suporte sólido, sem o inconveniente da realização de ligações moleculares entre as camadas adsorvidas. Os filmes assim produzidos, nomeados por filmes LbL (*Layer-by-Layer*) podem envolver além de ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, entre outras (DECHER e SCHLENOFF, 2012). A técnica de obtenção de filmes LbL apresenta um baixo custo, simplicidade experimental, possibilidade de construir sistemas miniaturizados e a capacidade de produzir filmes ultrafinos, organizados em nível nanométrico (1-100 nm) com diferentes materiais solúveis em meio aquoso, o que proporciona alta interação entre as diferentes moléculas do sistema (DURAN et al. 2006; DECHER, 1997).

O início da formação do filme LbL se dá pela imersão de um substrato sólido, carregado por exemplo, positivamente, em uma solução carregada negativamente, de modo que uma camada do poliânion deposite na superfície do substrato. A remoção das espécies que não adsorveram, é realizada pela imersão do sistema substrato/poliânion numa solução de lavagem com pH ajustado. Então, o sistema substrato/poliânion é imerso na solução de um policação, seguida da imersão do sistema substrato/poliânion/policação que após a lavagem deste, obtém-se uma bicamada. Os tempos de imersão são determinados por estudos cinéticos de deposição. A repetição do processo permite a formação de filmes LbL contendo o número de camadas desejado. A Figura 3 ilustra o esquema de preparação de filmes LbL.

Figura 3- Esquema da deposição de bicamadas de um filme LbL.



Fonte: A autora

As adsorções que ocorrem na superfície do substrato e entre as camadas depositadas para a formação dos filmes LbL são autolimitadas, ou seja, ocorre adsorção até haver sítios de ancoragem disponíveis. As interações que ocorrem entre polieletrólitos altamente carregados são principalmente eletrostáticas e auto-organizáveis, porém também são possíveis interações secundárias do tipo van der Waals e ligação de hidrogênio (DECHER e SCHLENOFF, 2002).

2.7 Polieletrólitos empregados na formação de filmes finos obtidos pela técnica LbL

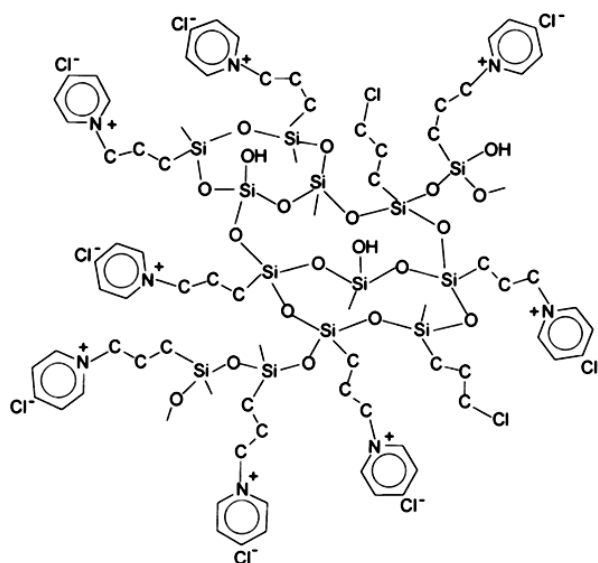
Polieletrólitos são polímeros com grupos parcialmente ionizáveis ao longo da cadeia, classificados em aniônicos e catiônicos de acordo com seu grupo, e dessa forma quando em solução podem ter diversas densidades de carga na cadeia. Neste sentido, diversos materiais ionizáveis e solúveis em meio aquoso podem ser imobilizados para preparação de filmes LbL (LIN e LI, 2006). Os polieletrólitos sintéticos mais utilizados são os polímeros comerciais

PAH (poli (cloreto de alilamina), PEI (poli (etileno imina)), PDAC (poli (cloreto de dimetildialamônia)), PVS (poli (ácido vinilsulfônico)), PSS (poli (estireno sulfonato de sódio) e o PAA (poli (ácido acrílico) (BERTRAND et al. 2000). Outros polieletrólitos sintéticos não convencionais são também explorados, tais como os nanotubos de carbono (GASPAROTTO et al. 2011), complexos inorgânicos (JESUS et al. 2011), as nanopartículas metálicas (SANTOS et al. 2012). Alguns polieletrólitos naturais incluem ácidos nucleicos (BECKER et al. 2010), proteínas (JOHNSTON et al. 2005), polissacarídeos (RECHTENBACH et al. 2005), ácido algínico e sulfato de condroitina (DHAMODHARAN, et al. 1999), DNA (DECHER et al. 1994) heparina, quitosana, sulfato de celulose, sulfato de dextrano e carboximetil-celulose (DHAMODHARAN, et al. 1999; DECHER et al. 1994; VOIGT et al. 1999; VILLIERS et al. 2011), materiais biológicos (WANG et al. 2007), macromoléculas, biomacromoléculas (CRESPILO et al. 2005) e até mesmo colóides (DECHER e SCHLENOFF, 2012). Neste trabalho será explorado o emprego do polieletrólito sintético 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano e do polieletrólito natural formado por ácidos húmicos para a obtenção de filmes com multicamadas.

2.7.1 Cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy^+Cl^-)

Dentre os polímeros inorgânicos que podem ser imobilizados em filmes LbL destaca-se o cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) (FUJIWARA et al. 2001; JESUS et al. 2011), cuja estrutura idealizada é ilustrada na Figura 4.

Figura 4– Estrutura idealizada do (SiPy^+Cl^-).



Fonte: GUSHIKEM, Y et al. Patent INPI N°. PI9803053-1, 1998.

O SiPy^+Cl^- (Patente: BR9803053-A) (GUSHIKEM et al.1998) é um material híbrido (orgânico-inorgânico) à base de sílica que contém grupos piridínicos carregados positivamente, obtido a partir de um precursor orgânico denominado organossilano. Todos os átomos de silício do organossilano presentes no SiPy^+Cl^- , se encontram ligados ao grupo orgânico. Esta é a principal característica que diferencia os silsesquioxanos dos outros híbridos à base de sílica (BENVENUTTI et al. 2009).

A motivação em pesquisar materiais híbridos orgânico-inorgânicos com organização estrutural, se dá pela existência de nanoespaços na estrutura. Estes possibilitam a incorporação de espécies orgânicas e/ou inorgânicas proporcionando a obtenção de novos materiais com propriedades distintas daquelas já existentes (HANDKEM e KOWALEWSKA, 2011).

O polímero SiPy^+Cl^- preparado por Gushikem et al. (1998), apresenta a excelente propriedade de ser incorporado na forma de filmes finos na superfície de diversos substratos, tais como vidro, grafite, sílica, sílica recoberta com Al_2O_3 , fibras de celulose modificadas com Al_2O_3 , vidro recoberto com óxido de estanho e flúor (FTO), vidro recoberto com óxido de estanho e índio (ITO), quartzo, platina, prata e silício.

Dentre as propriedades verificadas para o polímero SiPy^+Cl^- , está a alta capacidade de troca iônica, boa estabilidade química, alta solubilidade em água e nanoespaços em sua estrutura. No trabalho de Fujiwara et al. (2011) foi observada uma capacidade de troca aniônica de $1,04 \text{ mmol g}^{-1}$ nos estudos de adsorção de FeCl_3 , CuCl_2 e ZnCl_2 sobre um filme de SiPy^+Cl^- presente no substrato de sílica gel contendo um filme fino de Al_2O_3 . Valor similar a este ($1,09 \text{ mmol g}^{-1}$) foi constatado por Lucho et al. (2004) para o híbrido $\text{Al-SiPy}^+\text{Cl}^-$, obtido pelo recobrimento da superfície de Al_2O_3 com o polímero SiPy^+Cl^- .

Além da excelente capacidade de troca aniônica, o SiPy^+Cl^- contém boa estabilidade química e alta solubilidade em água (JESUS et al. 2011), propriedades estas importantes na construção de filmes finos obtidos pela técnica LbL. Alguns trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa têm mostrado que o emprego deste polímero SiPy^+Cl^- como polycation é inédita e muito eficiente na preparação de filmes LbL. Estes filmes foram aplicados como sensores de algumas biomoléculas, tais como a dopamina (JESUS et al. 2011), o ácido ascórbico (JESUS et al. 2011) e prometazina (JESUS et al. 2011). Uma breve descrição destes trabalhos é apresentada a seguir.

Jesus et al. (2011), desenvolveram um eletrodo modificado pela técnica LbL utilizando SiPy^+Cl^- como polycation e a ftalocianina tetrasulfonada de cobre (CuTsPc) como poliânion para a determinação de cloridrato de prometazina (PMZ). O filme obtido com cinco

bicamadas destes polieletrólitos na arquitetura (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅, apresentou dois potenciais de oxidação da PMZ em 0,48 e 0,79V e a partir da técnica de VOQ, obteve-se uma curva analítica com valor de R=0,9994, em que o LD e LQ foram $8,71 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,79 \mu\text{g L}^{-1}$) e $9,31 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($9,31 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Este filme foi aplicado como sensor em formulações comerciais de cloridrato deprometazina, observando-se uma boa estabilidade deste eletrodo em amostras complexas, sem qualquer pré-tratamento da amostra. A presença do polycation SiPy⁺Cl⁻ no filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ melhorou o perfil voltamétrico do sensor eletroquímico frente ao processo redox da PMZ quando comparado com o eletrodo sem modificação (FTO) e os demais filmes previamente testados (CuTsPc) e (SiPy⁺Cl⁻). Além disso, o Filme LbL foi reprodutível a sucessivas varreduras voltamétricas ao contrário dos demais filmes estudados que lixiviavam com o aumento do número de varredura.

Em outro trabalho de Jesus et al. (2011), com esta mesma arquitetura de filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ determinou-se o neurotransmissor dopamina (DA) na presença do interferente ácido ascórbico (AA) com uma diferença de potencial de oxidação entre estes analitos de 500 mV, valor este superior à faixa relatada na literatura (100 a 200 mV). Além disso, baixo valor de LD ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e alto valor de sensibilidade ($20,25 \mu\text{A /mmol L}^{-1}$) foram obtidos. Ainda neste trabalho, foi observado que na arquitetura contrária (CuTsPc/SiPy⁺Cl⁻)₅, nenhum sinal de oxidação foi detectado na presença de DA. Este comportamento foi atribuído à natureza não electroativa do SiPy⁺Cl⁻ observado em estudos preliminares para filmes contendo apenas este polieletrólito, que impede a oxidação DA.

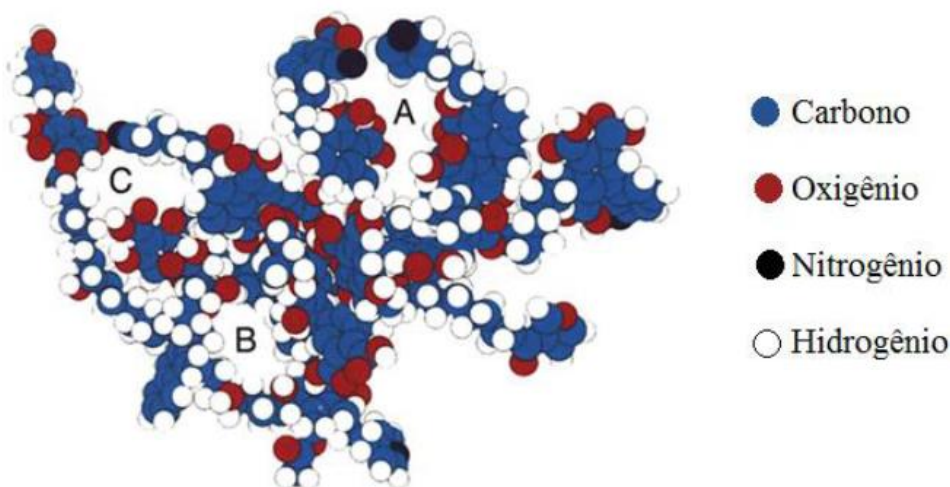
O emprego do SiPy⁺Cl⁻ como eficiente nanoreator para síntese de nanopartículas (Nps) metálicas também foi constatado em nosso grupo de pesquisa. A eficiência da incorporação das Nps deve-se às cavidades internas do esqueleto do SiPy⁺Cl⁻, capazes de servirem de molde para estabilização e crescimento das mesmas. Santos et al. (2012), incorporou Np-Pt nas cavidades da rede do polímero SiPy⁺Cl⁻ obtendo-se o híbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ com tamanho das Nps-Pt da ordem de 3 a 40 nm. O nanohíbrido obtido, Pt-SiPy⁺Cl⁻, foi alternado com o poliânion PVS na obtenção do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, que foi utilizado como sensor eletroquímico na determinação de DA em meio ao interferente AA. Por medidas eletroanalíticas, observou-se que o sensor exibiu um LD igual a $2,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um LQ de $8,69 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, os filmes mostraram boa repetibilidade e estabilidade, com uma diferença de potencial de 550 mV para a oxidação de DA na presença de AA. A importância da imobilização de Nps nos filmes LbL foi fundamental para o aumento do número de sítios ativos presentes no filme, cuja presença auxiliou no processo de transferência de elétrons da DA.

O híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ também foi imobilizado em substratos sólidos na presença do polímero condutor PPV, para a construção do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$. Após imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) na superfície deste filme, observou-se por medidas eletroanalíticas na presença de H_2O_2 e glicose que o biossensor $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ Gox exibiu uma sensibilidade igual a $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,17 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), $\text{LD} = 27,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), $\text{LQ} = 91,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($9,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e $k_m^{\text{app}} = 2,64 \text{ mmol L}^{-1}$ ($2,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), valores estes superiores a filmes mais complexos relatados na literatura, demonstrando a importância da presença do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ para estes filmes. Além disso, o biossensor de glicose exibiu resposta eletroquímica constante em um período de aproximadamente 30 dias, indicando assim uma adsorção estável de Gox (SANTOS et al. (2013).

2.7.2 Ácido Húmico (AH)

Os ácidos húmicos também tem sido explorados na formação de filmes finos por serem um tipo de macromolécula orgânica de elevado peso molecular, tendo características coloidais e polieletrólíticas, e por possuírem uma estrutura dominada por unidades aromáticas que contêm uma vasta variedade de grupos funcionais contendo oxigênio (Figura 5), que é capaz de quelar íons metálicos (GALESKA et al. 2001). Estas propriedades fazem do AH um material adequado para a auto-montagem de filmes LbL.

Figura 5 - Modelo para a estrutura dos ácidos húmicos em três dimensões. Na estrutura os espaços vazios estão indicados como A, B e C.



Fonte: SCHULTEN e SCHNITZER, 1995.

O AH é formado através da decomposição de resíduos, animais e vegetais, em ambientes úmidos, ácidos e de pouca oxigenação (PETRONI et al. 2000). Eles são considerados como biopolímeros encontrados no solo, sedimentos, água e algumas plantas como o tabaco (GALESKA et al. 2001). Basicamente consistem na mistura de carboidratos, proteínas, lipídios, que fornecem grande quantidade de grupos funcionais com cargas negativas em suas estruturas, tais como, ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas e alcoólicas unidas por ligações de hidrogênio (SILVA, W. et al. 2002).

Os AH possuem uma coloração escura, são solúveis em meio alcalino, precipitando-se em forma de produto escuro e amorfo em meio ácido ($\text{pH} < 2$) (JESUS et al. 2004). São substâncias com cargas variáveis em que os grupos carboxila e hidroxila se dissociam gradualmente com o aumento do pH (SILVA, W. et al. 2002). É um polímero natural que possui uma complexa estrutura química, podendo conter espaços vazios de diferentes tamanhos nas suas estruturas moleculares, os quais poderiam alojar metais e outros compostos orgânicos hidrofílicos, tais como, carboidratos e materiais proteínáceos, lipídeos, além de agrotóxicos (pesticidas e herbicidas) e outros poluentes devido a sua grande capacidade de troca iônica. Os seus grupos funcionais são os sítios de adsorção dos metais em solução, com elevada capacidade de adsorção para metais de transição e moléculas orgânicas polares (PETRONI, 2000).

Os AH atuam como ligantes para complexação de íons metálicos micronutrientes de plantas, tais como, VO^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ou tóxicos como o Al^{3+} . A formação e transporte desses complexos, e sua deposição, pode ser um importante mecanismo na acumulação de metais nos depósitos sedimentares (JESUS et al. 2004). A presença de ácido vanílico e acetovanila com AH são importantes na constituição de estruturas quinônicas, indicando a participação de vegetais superiores em sua formação. Os AH pertencem à classe dos produtos naturais mais abundantes na biosfera com cerca de 50 a 70% do húmus, dependendo do tipo de solo e são os precursores dos combustíveis fósseis (FERREIRA, 2006).

2.8 Eletrodos modificados com AH

Alguns trabalhos descritos na literatura têm mostrado que o emprego deste polímero natural AH como poliânion é inédita e eficiente na preparação de sensores de algumas moléculas, tais como o pentaclorofenol (PCF) (CRESPILHO et al. 2005), íons Cu (II)

(SILVA et al. 2002) e Glicose (GALESKA et al. 2001). Uma breve descrição destes trabalhos é apresentada a seguir.

Crespilho et al. (2005) prepararam um filme LbL alternando camadas de AH com camadas de poli (cloridrato de alilamina) (PAH) para a detecção do pesticida pentaclorofenol (PCF), bastante utilizado na preservação da madeira. Por medidas de microscopia de força atômica (AFM) dos filmes PAH/AH contendo 5 e 15 bicamadas, foi observada uma rugosidade entre 0,89 a 1,19 nm. O filme LbL apresentou boa eletroatividade para o PCF, com um LD de $1,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), valor este dentro da faixa permitida pela legislação ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Além disto, constatou-se que a presença de AH no filme LbL melhorou a adsorção do PCF na superfície do ITO, catalisando a transferência de elétrons entre o PCF e o eletrodo.

Silva et al. (2002) prepararam um eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificados com o polímero natural AH para a determinação do íon metálico Cu (II). Através de voltamogramas cíclicos observou-se que o comportamento eletroquímico do filme (AH-MCPE) em tampão acetato (pH = 4,5) é quase irreversível, pois exibe a redução de Cu (II) em Cu (0) nos potenciais de 0,26 e 0,15 V. Além disto, o eletrodo mostrou que através de medidas sucessivas dos voltamogramas cíclicos aumenta os picos do processo redox do íon metálico e estabiliza após o quinto ciclo. Este aumento das auturas de pico com o número de ciclos pode ser através do efeito do aumento de Cu (II) durante o tempo de pré-concentração do eletrodo. Isso sugere que esse tipo de experimento poderia permitir a classificação das capacidades de complexação de AH com os íons metálicos.

Baseado nos materiais que são empregados na obtenção de filmes finos pela técnica LbL, as possibilidades de combinação são inúmeráveis, todavia a escolha adequada e satisfatória entre os polieletrólitos depende essencialmente dos grupos funcionais e da capacidade de troca iônica. Assim, neste trabalho, espera-se obter filmes LbL contendo Nps-Pt incorporadas ao SiPy⁺Cl⁻ e combinadas ao AH e analisar as interações existentes entre ambos os polieletrólitos imobilizados, objetivando a exploração das propriedades eletroquímicas frente ao EE2.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na preparação e caracterização de filmes finos estáveis formados por Nps-Pt incorporadas a matriz de SiPy^+Cl^- e ácido húmico via técnica *Layer-by-Layer*. Os filmes LbL serão caracterizados por técnicas espectroscópicas, morfológicas e eletroquímicas a fim de avaliar o crescimento dos polieletrólitos em diferentes substratos, as interações existentes entre estes e a mudança da morfologia em função do número de bicamadas e da arquitetura estudada. A organização molecular e a natureza nanoestruturada dos filmes serão exploradas na potencialidade sensorial para a determinação eletroquímica do hormônio EE2.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Procedências dos reagentes e substratos

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A.) obtidos comercialmente sem purificação prévia, tais como o EE2 ($\geq 98\%$), H_2PtCl_6 ($\geq 8\%$ da solução em água) e o ferricianeto de potássio III da Sigma-Aldrich. O ácido fórmico foi obtido da Mallinckrodt, a acetonitrila e o NaH_2PO_4 obtidos da Vetec. O álcool isopropílico e o H_2O_2 foram adquiridos da Dinâmica. O clorofórmio foi obtido da Merck e o NH_4OH da F. Maia.

O polieletrólito AH foi adquirido da Sigma-Aldrich (CAS = 1415-93-6) com as seguintes especificações: sólido preto, de solubilidade de 0,1 g em 10 mL de água, cuja solução 0,5 g L^{-1} apresenta pH igual a 7,9 e possui coloração marrom. Possui 40,33 % de carbono, 3,69 % de hidrogênio e 0,80 % de nitrogênio em sua composição.

O polieletrólito SiPy^+Cl^- (BR9803053-A) foi sintetizado a partir do procedimento previamente descrito por Gushikem et al. (1998).

Os filmes finos foram desenvolvidos com os substratos FTO obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich ($R_s = 10 - 20 \Omega\text{m}$).

4.2 Preparo das soluções

4.2.1 Solução trabalho 17- α etinilestradiol (EE2)

Foram preparadas soluções estoques de EE2 na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, dissolvendo-se 0,002964 g do hormônio em 10 mL de acetonitrila.

4.2.2 Solução do polieletrólito AH

A solução do polieletrólito AH foi preparada dissolvendo-se 0,0125 g em 25 mL de água destilada, obtendo-se a concentração de 0,5 g L^{-1} , como descrito no trabalho de Crespilho et al. (2005).

4.2.3 Solução de eletrólito suporte

Foram preparadas diferentes soluções de eletrólitos suporte para a caracterização eletroquímica do filme LbL (AH/ Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, tais como, NaH₂PO₄ (pH= 4,3), Na₂HPO₄ (pH= 9,4), NaNO₃ (pH= 6,2), KCl (pH= 6,5), Tampão fosfato (pH= 7,5), Tampão PBS (pH= 7,2) e Tampão Britton Robson (BR) (pH= 2,0). Ambas as soluções foram preparadas na concentração de 0,1 mol L⁻¹ sem ajuste de pH.

A solução de fosfato de sódio monobásico NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ foi escolhida para dar continuidade aos demais estudos eletroquímicos, tais como, o estudo do comportamento do filme (AH/ Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de EE2 em diferentes valores de pH (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

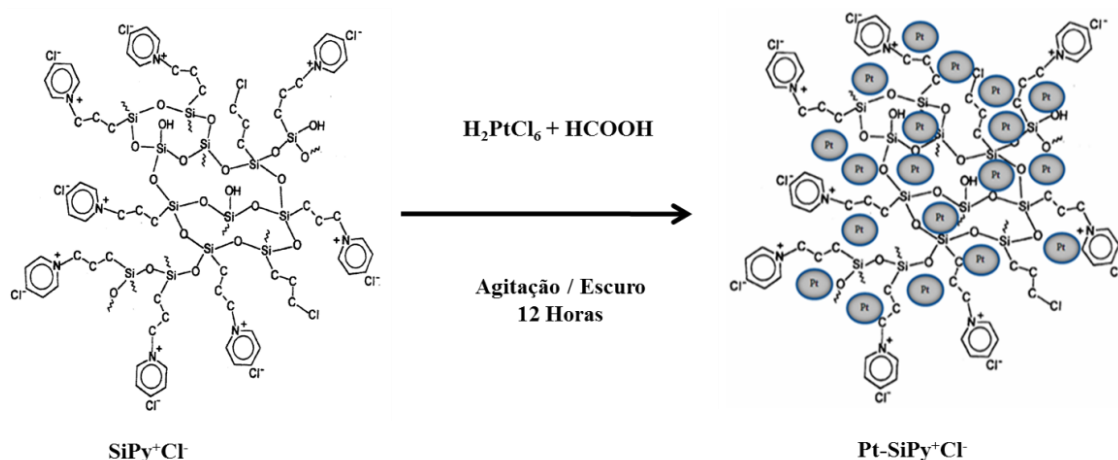
4.2.4 Solução de ferrocianeto de potássio II (K₄Fe(CN)₆.3H₂O) e ferricianeto de potássio III (K₃[Fe(CN)₆])

Foram preparadas soluções de K₄Fe(CN)₆.3H₂O e K₃[Fe(CN)₆], ambas na concentração de 5 x 10⁻³ mol L⁻¹, dissolvendo-as em 25 mL de eletrólito suporte NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ em temperatura ambiente.

4.2.5 Síntese das Nps-Pt ao polímero SiPy⁺Cl⁻

As Nps-Pt foram sintetizadas no polímero SiPy⁺Cl⁻ pelo método descrito por Santos et al. (2012). Este método consiste na mistura das soluções de 2 mmol L⁻¹ de H₂PtCl₆, 0,5 g L⁻¹ de SiPy⁺Cl⁻ e 0,1 mol L⁻¹ de ácido fórmico, na proporção 1:1:1 (v/v/v). Primeiramente foram misturadas as soluções de H₂PtCl₆ e SiPy⁺Cl⁻ e sequencialmente foi gotejada à solução do redutor ácido fórmico. Inicialmente a solução manteve a coloração amarela característica da solução do H₂PtCl₆, e sequencialmente, depois de deixada durante 12 horas em agitação sob temperatura ambiente e sob proteção da luz a mistura adquiriu uma coloração preta, indicando a formação de Nps-Pt nas cavidades do SiPy⁺Cl⁻ (MELO Jr et al. 2012), obtendo-se o híbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻. O esquema da síntese das Nps-Pt é ilustrado na Figura 6.

Figura 6- Esquema da síntese das Nps-Pt nas cavidades do SiPy^+Cl^- .



Fonte: Adaptado de Santos et al. 2012

4.3 Procedimentos de limpeza dos substratos e preparação dos filmes

A limpeza dos substratos FTO, quartzo e silício foi realizada a partir da imersão destes em uma mistura de H_2O_2 20 volumes, NH_4OH concentrado e H_2O destilada, preparada na proporção 1:1:5 (v/v/v), sob aquecimento durante 15 minutos até a atingir a ebulição (KIM et al. 1998). Em seguida, mergulharam-se os substratos no clorofórmio em aquecimento até atingir a ebulição. Após serem secos à temperatura ambiente foram imersos em álcool isopropílico em aquecimento por 5 minutos até a atingir a ebulição. Repetiu-se o procedimento até verificação visual da limpeza total dos substratos.

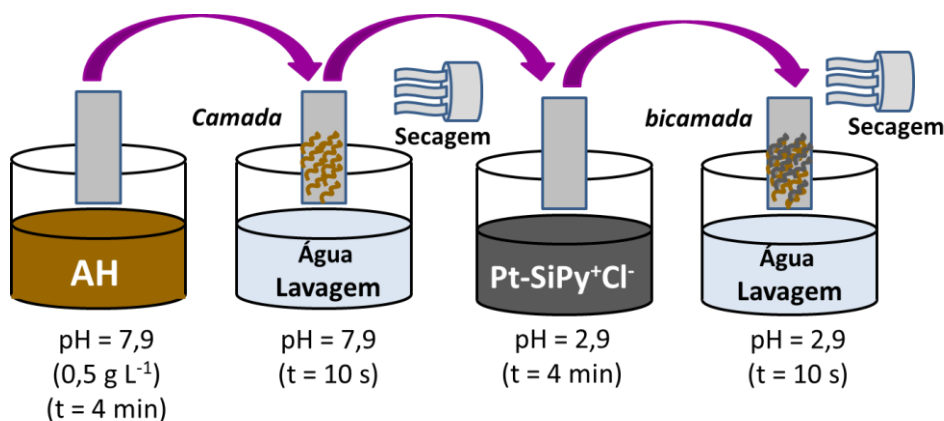
4.4 Fabricação dos filmes finos

4.4.1 Fabricação dos filmes LbL

Para a fabricação dos filmes LbL utilizou-se o AH como poliânion e o híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ como policação. A concentração da solução de AH foi de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e o valor de pH nestas condições foi 7,9. O pH da solução do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foi do 2,9. Prepararam-se os filmes com a AH na parte interna e externa do filme, de modo a obter as arquiteturas $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ onde n representa o número de bicamadas, respectivamente, pela imersão do substrato (FTO, silício e quartzo) manualmente nas soluções dos precursores, alternadamente. O tempo de imersão do substrato nas soluções dos

polieletrólitos foi de 4 minutos e na solução de limpeza, com valores de pH ajustados para os mesmos valores dos pH dos polieletrólitos, foi de 10 segundos. O tempo de imersão foi determinado em estudos cinéticos através da espectroscopia de UV-Vis. Depois da deposição de cada camada secou-se o sistema substrato/filme com o auxílio de um soprador térmico. O esquema da deposição dos filmes LbL sobre o substrato nas duas arquiteturas é ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema da formação de um filme LbL contendo 1 bicamada de $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_1$ sobre diferentes substratos (FTO, silício e quartzo).



Fonte: A autora

4.4.1.1 Cinética de crescimento dos filmes LbL

Para o estudo da cinética de adsorção dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foram preparadas as soluções de AH utilizando-se 0,005 g para 10 mL de água destilada e 10 mL de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Foram fabricados filmes LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ com 3 bicamadas em tempos variados de imersão do substrato de quartzo (30 segundos a 5 minutos). A cada tempo pré-determinado a deposição era interrompida para obtenção dos espectros. O mesmo substrato de quartzo foi utilizado para a construção dos filmes LbL em diferentes intervalos de tempo de deposição com o intuito de garantir a mesma linearidade das absorvâncias. Para as soluções de lavagem foram mantidos o tempo de 10 segundos. A absorvância foi monitorada a cada espectro até verificar a saturação do processo de deposição pela estabilização no valor da absorvância. Este estudo cinético de deposição dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foi realizado em triplicatas para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

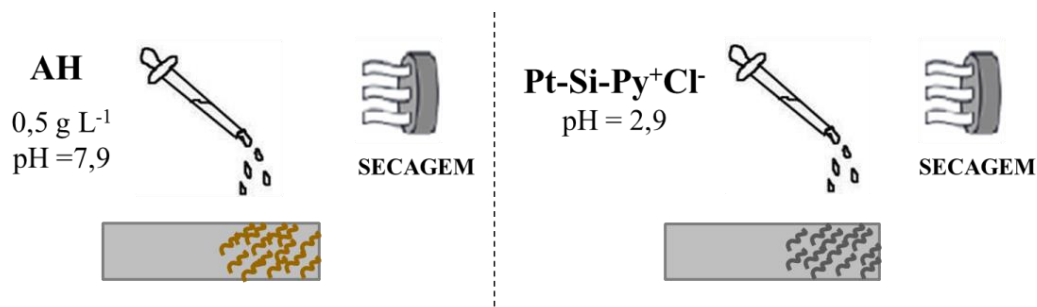
Para o estudo da cinética de crescimento das bicamadas dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foram construídos filmes LbL com até 42 bicamadas de $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)$ e até 21

bicamadas de (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH). A absorvância foi realizada a cada 3 bicamadas e os espectros foram monitorados até verificar a saturação do processo do crescimento das bicamadas em ambas as arquiteturas. Este estudo também foi realizado em triplicatas com o intuito de obter a reprodutibilidade dos resultados.

4.4.2 Fabricação dos filmes *drop-coated*

Os filmes *drop-coated* foram preparados pelo gotejamento das soluções de Pt-SiPy⁺Cl⁻ (pH = 2,9) e AH (0,5 g L⁻¹ em pH = 7,9) sobre a superfície dos substratos de silício, para a realização de medidas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e espalhamento Raman. Para as medidas eletroquímicas, os filmes *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH foram preparados sobre a superfície de FTO. As soluções gotejadas sobre os substratos foram secadas com o auxílio de um soprador térmico a uma determinada distância para evitar que as moléculas saiam da superfície do substrato e após a evaporação total do solvente obteve-se a formação dos filmes. O esquema da formação dos filmes *drop-coated* é ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema da formação de um filme *drop-coated* constituído pelos polieletrólitos AH e Pt-SiPy⁺Cl⁻ sobre diferentes substratos (FTO, quartzo e silício).



Fonte: A autora

Os filmes *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH foram preparados com o intuito de caracterizar estes polieletrólitos individualmente e verificar a presença dos mesmos nos filmes LbL.

A construção dos filmes pelo método de imersão não é eficaz, pois no trabalho de Santos et al. (2012) observou-se que nos espectros de UV-Vis dos filmes construídos pela imersão do substrato quartzo nos polieletrólitos (Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (PVS)_n não ocorria o aumento da absorvância com o número de camadas. Isso ocorre porque a imersão do substrato na mesma solução contendo cargas positivas (Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n ou negativas (PVS)_n ocorre a repulsão destas cargas, ou seja, não tem trocas de cargas impedindo o crescimento dos filmes.

Já na técnica LbL ocorre a interação entre as diferentes cargas dos polieletrólitos, obtendo-se o crescimento dos filmes. No entanto Santos et al. (2012) utilizaram filmes drop-coated para a caracterização dos polieletrólitos precursores dos filmes LbL devido a formação de filmes mais expessos para a análise espectroscópicas e eletroquímicas.

4.5 Medidas de caracterização espectroscópicas dos filmes

4.5.1 Espectroscopia de Absorção na região do UV-Vis

As medidas de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro *CARY 50 BIO*, disponível no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM), com intuito de caracterizar as soluções dos polieletrólitos 0,5 g L⁻¹ de AH e Pt-SiPy⁺Cl⁻, realizar a cinética da deposição dos filmes e monitorar crescimento dos filmes depositados em substratos de quartzo nas arquiteturas (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)_n monitorando-se a absorbância das bandas dos precursores dos filmes.

4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do FTIR

Realizaram-se as medidas na região de FTIR com o equipamento *SHIMADZU IR PRESTIGE 21*, disponível no laboratório do GDEM, no modo de transmissão com resolução espectral 4 cm⁻¹ e 64 *scans*. Com o intuito de investigar as possíveis interações existentes entre o AH e as Np-Pt foram realizadas as medidas de FTIR em AH (sólido), homogeneizados em pastilha de KBr. Também foram realizadas medidas em filmes *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻, Pt-SiPy⁺Cl⁻, AH, nos filme LbL contendo 30 bicamadas de (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀, todos depositados sobre substrato de silício.

4.5.3 Espectroscopia de espalhamento Raman

As medidas de Raman foram realizadas nos filmes *drop-coated* dos precursores, SiPy⁺Cl⁻, Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH e nos filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀, todos depositados sobre substrato de silício. O equipamento utilizado para essas medidas foi o espectroscópio dispersivo Raman com microscopia ótica (*BRUKER SENTERRA*), disponível no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa

(CLABMU). Os parâmetros utilizados para estas medidas foram com mapeamentos espectrais com resolução espacial de aproximadamente 25 μm usando uma lente objetiva de 20 x e detector abc. A intensidade de potência do laser de 10 W, a faixa de varredura foi de 550 a 2000 nm, com um tempo de interação com as amostras de 40 s.

4.6 Potencial Zeta (ζ)

Foram realizadas medidas de potencial zeta do polieletrólito AH 0,5 g L⁻¹ com o intuito de confirmar a presença de cargas negativas em sua estrutura, utilizando o equipamento *ZETASIZER NANO SERIES Z590 DA MALVERN*, disponível no CLABMU.

4.7 Medidas de caracterização morfológica dos filmes

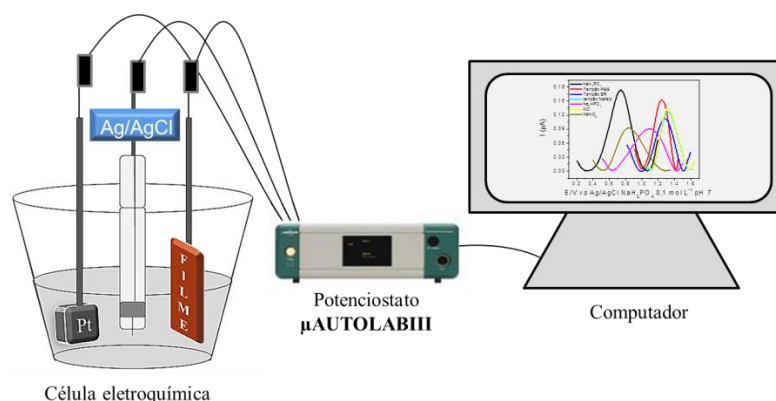
4.7.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Obtiveram-se imagens de AFM com o intuito de analisar morfológicamente os filmes LbL depositados sobre o substrato FTO, no equipamento *SHIMADZU SPM – 9600* no modo de contato, sensor de Si SPM recoberto com Al (*NANOWORD*) com espessura de 4 μm , comprimento de 125 μm , largura de 30 μm , frequência de 320 kHz e força constante de 42 N/m. O software utilizado foi o SPM manager versão 3.03, disponível no CLABMU.

4.8 Medidas de Caracterização Eletroquímica

A caracterização eletroquímica dos filmes preparados com AH e Pt-SiPy⁺Cl⁻ foi obtida pela análise dos voltamogramas cíclicos (VC), de pulso diferencial (VPD) e de onda quadrada (VOQ). Os estudos eletroquímicos foram realizados no potenciostato modelo μ -AUTOLAB Tipo III (*AUTOLAB/ECOCHEMIE*), disponível no laboratório GDEM, conectado a uma célula eletroquímica convencional constituída por três eletrodos (Figura 8): um eletrodo de referência Ag/AgCl, um eletrodo auxiliar uma placa de platina (com área de 1,2 cm²) e um eletrodo de trabalho de FTO sem modificação ou formado pelo sistema FTO/filme LbL nas duas arquiteturas, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)_n, ou FTO/filme *drop-coated*, ambos com área de 0,6 cm².

Figura 9 - Célula eletroquímica contendo três eletrodos conectados ao potenciostato μ -AUTOLAB Tipo III, ambos conectados a um software no computador.



Fonte: A autora.

Os VC dos filmes foram obtidos em solução aquosa de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 como eletrólito suporte com velocidades de varredura de 50 mV s^{-1} , sob temperatura ambiente em uma faixa de potenciais de -0,1 até 1,5 V, iniciando em -0,2 V. Os sensores fabricados foram imersos em solução aquosa de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 como eletrólito suporte na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. Esta mesma concentração foi utilizada aplicando as técnicas VPD e VOQ. Os sensores eletroquímicos preparados foram testados na presença de adições consecutivas de EE2 na faixa de concentração de $1,37 \times 10^{-6}$ a $2,88 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se a curva de calibração com a técnica de VPD.

Parâmetros da voltametria de pulso diferencial, tais como o potencial de pulso aplicado (E_{pulse}), tempo de pulso (t_{pulse}) e velocidade de varredura (v) foram otimizados para realização das medidas. Os parâmetros instrumentais da VOQ, como frequência de aplicação de pulso de potencial (f), amplitude do pulso de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE_s) foram otimizados para a realização de medidas.

Além das técnicas voltamétricas, realizaram-se medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Para estas medidas foi utilizado o potenciostato AUTOLAB (PG STAT 100) disponível no laboratório do GDEM. Utilizou-se os filmes LbL ($\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃ e ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH}$)₃, os filmes drop-coated de AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ ambos os filmes construídos sobre o substrato FTO e realizou-se também medidas somente do FTO. Os diagramas de Nyquist foram obtidos em potencial de circuito aberto, dissolvendo-se a mistura de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , pH 7. Os valores de resistência de transferência de carga (R_2) e capacitância (C_1) para os eletrodos testados foram determinados com o programa Zview.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

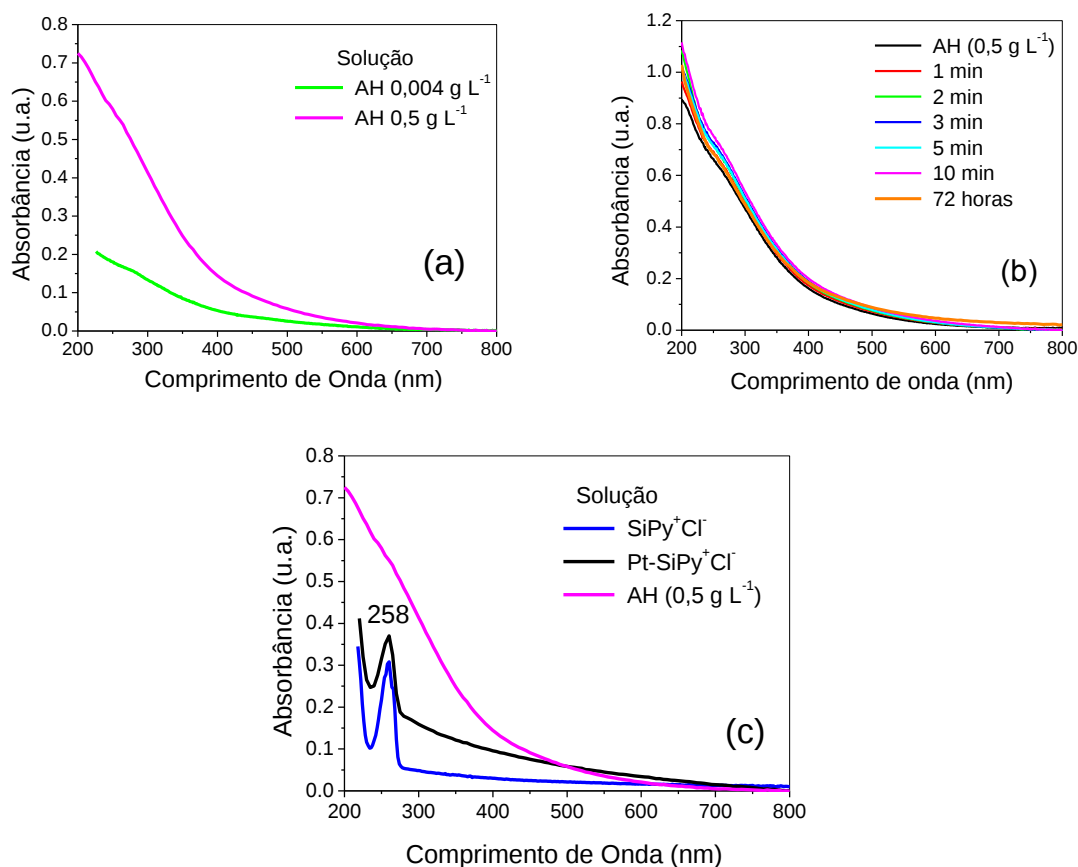
5.1 Caracterização dos polieletrólitos precursores

Uma vez que praticamente não existem restrições na seleção de polieletrólitos, muitos são os materiais que podem ser empregados na fabricação de filmes LbL. A escolha do ácido húmico para a obtenção dos filmes estudados neste trabalho foi baseada nas características coloidais e polieletrólíticas desta macromolécula orgânica. Pelo fato deste polieletrólito ser carregado negativamente (GALESKA et al. 2001) e possuir grupos aromáticos em sua estrutura, ele se torna ideal para a absorção de materiais inorgânicos (HU et al. 2012). Medidas de potencial zeta para a solução $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (pH 7,9) da macromolécula de AH, foram realizadas obtendo-se um valor correspondente a $-59,3 \text{ mV}$ confirmando a existência de grupos ácidos carregados com cargas negativas em sua estrutura. Em análises de titulação volumétrica na faixa de pH entre 2,5 a 12 de uma amostra de AH de procedência da Aldrich (GALESKA et al. 2001), foram obtidos três pontos de inflexão na curva de titulação ((I) pH 3,2; (II) pH 5,8 e 6,8; (III), pH 10,3) atribuídos à presença de diferentes grupos ácidos ((I) grupos carboxílicos aromáticos em posição *orto* à substituição fenólica, (II) ácidos carboxílicos aromáticos e alifáticos fracos, (III) grupos OH- fenólicos e catecólicos). Portanto, pode-se inferir no nosso trabalho que uma grande parte da contribuição da carga negativa da solução de AH em pH 7,9 é devido à presença dos ácidos carboxílicos (II e III).

O emprego do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ como policação para obter os filmes nas arquiteturas $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ é devido à existência de estruturas com cargas positivas conforme confirmada por medidas de potencial zeta ($\zeta = 173,33 \text{ mV}$), obtidas por Santos, V. et al. (2012). A reprodutibilidade dos filmes e estabilidade das bicamadas atribuída às fortes interações o SiPy^+Cl^- ou $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ com outros polieletrólitos (SANTOS et al. 2012; SANTOS et al. 2013; JESUS et al. 2011;) fez com que escolhêssemos este material para a obtenção de novos filmes LbL formados com AH.

Antes de iniciar o processo de crescimento dos filmes LbL, realizou-se a caracterização espectroscópica de absorção na região do UV-Vis dos precursores AH, SiPy^+Cl^- e do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ em solução. Os espectros obtidos com as soluções aquosas de $0,04 \text{ g L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de AH, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de SiPy^+Cl^- e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ são ilustrados na Figura 10.

Figura 10 - Espectros de absorção na região do UV-Vis (a) das soluções aquosas $0,04 \text{ g L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de AH; (b) do monitoramento da solubilidade da solução $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de AH em tempos variados (de 1 minuto a 72 horas); (c) das soluções aquosas de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de AH, $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de SiPy^+Cl^- .



Na Figura 10 (a) verificou-se que ambos os espectros do poliânion AH em diferentes concentrações ($0,04 \text{ g L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$) exibiram uma banda de absorção alargada e mal definida na região compreendida entre 200 – 250 nm, indicativo de absorção de sistemas aromáticos (CANELLAS et al., 2000). Na literatura é observada uma banda pouco definida em torno de 220 nm, como exemplo, no trabalho de Yuan et al. (2013), foi constatada uma banda de absorção do AH com o máximo em 220 nm nos espectros de UV-Vis do filme LbL contendo hidróxidos duplos lamelares (HDL) alternado com AH, $(\text{HDL/AH})_n$. Na tentativa de encontrar uma banda mais definida na região do ultravioleta, monitoramos a solução de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de AH durante 72 horas e observamos que o espectro mantém o ombro mal definido na região de 200 – 250 nm (Figura 10(b)). A fraca absorção das substâncias húmicas na região do UV-Vis é devido à grande aromaticidade e ao grau de condensação da cadeia de carbonos aromáticos do AH (HU et al., 2012).

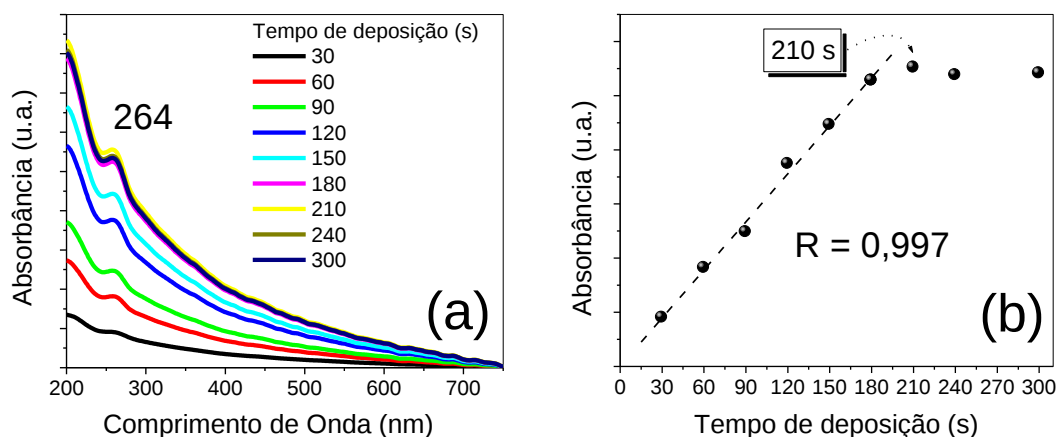
O espectro da solução do policátion $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (Figura 10 (c)) apresentou uma banda de absorção em 258 nm, da mesma forma que o espectro da solução de SiPy^+Cl^- . Esta banda é

atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos dos anéis piridínicos do SiPy^+Cl^- (SANTOS,V. et al. 2012; JESUS et al., 2011; GUSHIKEN et al., 1998; FUJIWARA et al., 2001).

5.2 Obtenção e caracterização espectroscópica dos filmes LbL $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$.

Após a caracterização das soluções dos polieletrólitos, foi realizado um estudo da cinética de crescimento via espectroscopia de absorção na região do UV-Vis para avaliar o tempo necessário para que ocorra uma adsorção suficiente dos precursores AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ sobre o substrato de quartzo. Devido a melhor definição da banda do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ em 258 nm, o monitoramento do crescimento dos filmes LbL foi realizado a partir da análise da absorbância desta banda, com filmes preparados em tempos variados de imersão, ou seja, tempo que o substrato permanece em repouso nas soluções dos polieletrólitos (30 segundos a 5 minutos). A cada tempo pré-determinado, a deposição era interrompida para obtenção dos espectros dos filmes LbL. A absorbância foi monitorada a cada espectro até verificar a saturação do processo de deposição pela estabilização no valor da absorbância. A Figura 11 ilustra os espectros de UV-Vis dos filmes LbL com a arquitetura $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ obtidos de filmes imersos em diferentes tempos de deposição (30 a 300 s) em cada polieletrólito (AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$).

Figura 11 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da cinética de deposição para o filme LbL (a) $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ com o tempo de deposição de (30 segundos a 5 minutos) e (b) relação entre o tempo de deposição e a absorbância da banda em 264 nm.



Ao analisar os espectros de absorção na região do UV-Vis da Figura 11 (a) verificou-se que com o aumento do tempo de deposição da bicamada de $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ sobre o substrato de quartzo, ocorre um aumento da absorbância na região de 264 nm até 180

segundos com um crescimento linear ($R = 0,997$) das bandas (Figura 11 (b)). Após 210 segundos é verificado no gráfico um patamar, o qual corresponde à estabilização na absorbância, a qual passa a ser constante com o aumento do tempo de deposição dos polieletrólitos, indicando a saturação do crescimento do filme LbL. Esta observação nos sugere que o tempo ideal para o crescimento dos filmes LbL com os polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ deve ser igual a 210 segundos. Por esta razão, o tempo de 4 minutos, foi o escolhido para o crescimento dos filmes LbL utilizados nesta pesquisa, visando garantir um maior número de espécies imobilizadas na superfície dos substratos. Este valor é próximo ao encontrado na literatura para filmes contendo $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. A Tabela 5 apresenta alguns tempos de imersão para filmes LbL construídos com polieletrólitos similares ao nosso trabalho.

Tabela 5- Filmes LbL construídos com diferentes polieletrólitos e tempos de imersão diferentes.

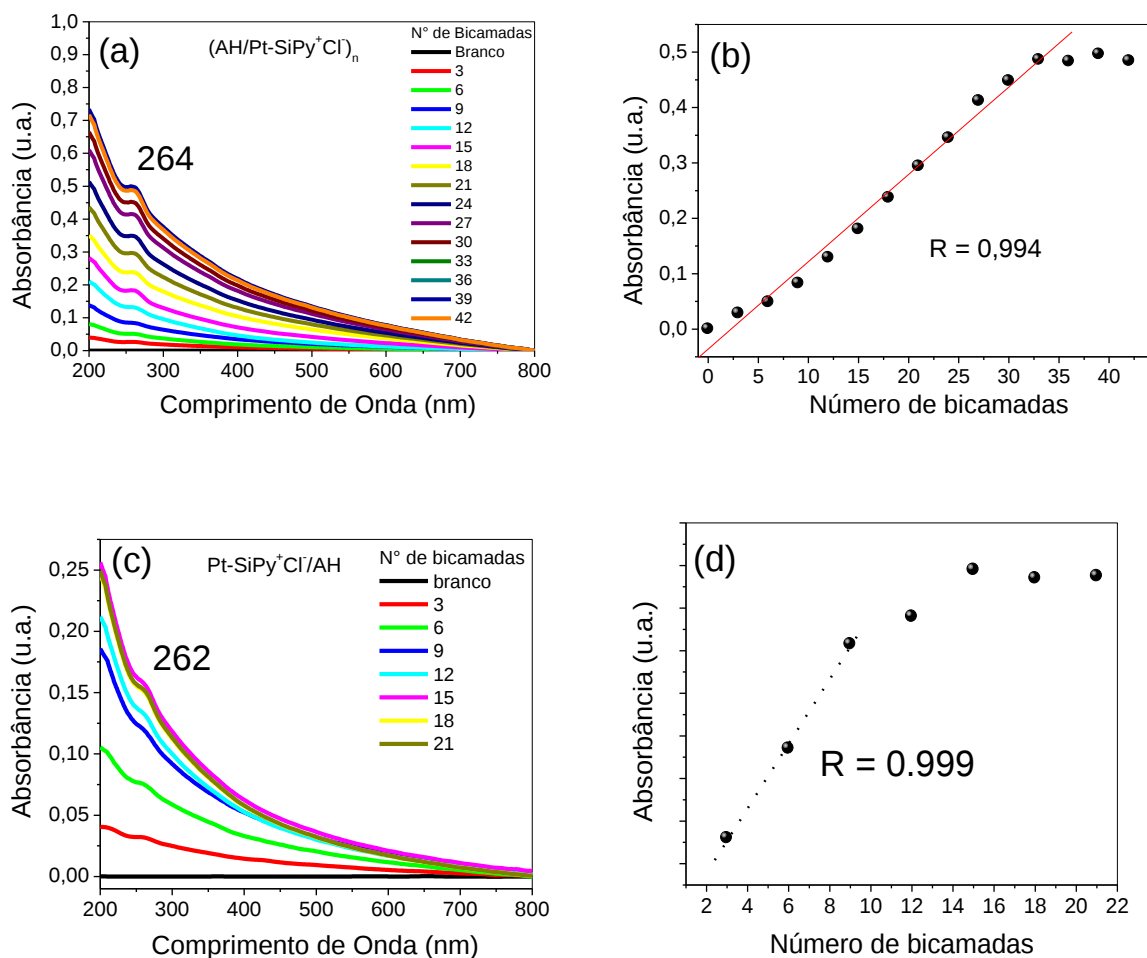
Filme LbL	Tempo de imersão	Referência
PVS/ $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	4 min	SANTOS, V et al. 2012
PPV/ $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	4 min	SANTOS, V et al. 2013
$\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$	5 min	JESUS et al. 2011
AH/ Fe^{3+}	5 min	GALESKA et al. 2001
PAMAN/AH	5 min	CRESPILHO et al. 2005
HDL/AH	10 min	YUAN et al. 2013

Fonte: A autora

Como pode ser observado na Tabela 5, os filmes LbL contendo o polication $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ são construídos no mesmo tempo de imersão (4 min) que o nosso trabalho, independente do poliânion presente. Quando o SiPy^+Cl^- é utilizado, um tempo similar (5 min) foi determinado. Em relação aos filmes LbL contendo AH, dois tempos de deposição foram observados, 5 e 10 min, logo nota-se que nosso tempo é similar aos trabalhos com tempo de 5 min. A discrepância observada para a construção do filme LbL HDL/AH (10 min), pode ser explicada baseada na diferença da estrutura das nanofolhas formadas por hidróxidos duplos lamelares de Mg-Al, porém neste trabalho nenhuma menção foi feita em relação a escolha do tempo de deposição (YUAN et al. 2013). Após definido o tempo de imersão, 4min, realizou-se um estudo do monitoramento do crescimento das bicamadas dos filmes LbL em ambas arquiteturas, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, onde $n = 3$ a 21 bicamadas para o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ e $n = 3$ a 42 bicamadas para o filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$. Os respectivos

espectros de absorção são ilustrados na Figura 12. Este estudo foi realizado em triplicatas para averiguar a reprodutibilidade do sistema.

Figura 12- Espectros de absorção na região do UV-Vis para os filmes LbL de (a) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e (c) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$. Relação entre o número de bicamadas e a absorbância da banda entre 264 e 262 nm de (b) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e (d) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$.



Nos espectros de UV-Vis (Figuras 12 (a) e (c)) confirma-se a presença dos polieletrólitos precursores, AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, depositados sobre a superfície de quartzo dos filmes LbL com ambas arquiteturas. Os deslocamentos das bandas de absorção do espectro da solução de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ com máximo em 258 nm (Figura 10 (b)) para 264 nm (Figura 12 (a)) e 262 nm (Figura 12 (c)) nos espectros dos filmes $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, respectivamente, são atribuídos às interações existentes entre a carga positiva dos anéis piridínicos do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e a carga negativa proveniente dos ânions carboxilatos do AH. Ressalta-se que além da atração eletrostática entre estes materiais positivamente e negativamente carregados, outras interações podem ocorrer incluindo a ligação de hidrogênio, como também a formação de um complexo entre o ácido húmico e as Nps-Pt do silano. O fato

do deslocamento do máximo da banda de absorção para um comprimento de onda maior, ou seja, um deslocamento batocrômico, demonstra que a absorção da estrutura formada pela interação entre os grupos funcionais dos polieletrólitos produz uma estabilização na absorção da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel piridínico. Esta estabilização se deve a conjugação de ligações múltiplas.

Com o aumento de número de deposições, nota-se que os dois filmes apresentam o mesmo perfil dos espectros de absorção com diferentes espessuras (Figuras 12 (a) e (c)). A partir disto, pode-se inferir que a estruturação molecular é a mesma, independente da espessura dos filmes (ALESSIO, 2012). Além disto, o crescimento é dependente da arquitetura do filme, ou seja, observou-se um crescimento mais linear ($R = 0,994$) para o filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ do que para o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ ($R = 0,999$) em função do aumento da quantidade de bicamadas para a arquitetura. Nota-se que apesar do menor valor de coeficiente de regressão, quando o crescimento do filme inicia com AH, há mais pontos na curva. Este fato indica que há uma deposição mais homogênea das espécies a cada bicamada depositada (Figura 12 (b)) nesta arquitetura, com uma relação linear entre a absorbância e o número de bicamadas variando de 0 a 33 bicamadas de $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$. A partir deste número de bicamadas observa-se a saturação no processo de crescimento das bicamadas (33 – 42 bicamadas). Por outro lado, para a arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ verifica-se um crescimento linear até 9 bicamadas (Figura 12 (c)) e após esse número de bicamadas, o aumento na absorbância é interrompido provavelmente pela saturação no processo de deposição, que ocorre devido à interpenetração das camadas adjacentes (DURAN et al. 2006).

Este efeito ocorre de forma mais pronunciada na arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, pois quando se deposita o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ sobre a superfície do substrato, para a formação da primeira camada, é provável que esta espécie não adere o suficiente no substrato para ancorar a grande estrutura do AH. Diferentemente, quando se deposita primeiramente o AH sobre o quartzo para obtenção da arquitetura $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, a presença da macromolécula (AH) sobre o quartzo pode disponibilizar um maior número de sítios de ancoragem para as Nps-Pt presentes no $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, o que nos mostra um crescimento mais linear do filme contendo a arquitetura $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, e assegura um crescimento mais uniforme de ambos polieletrólitos no filme, como veremos por medidas de AFM.

Existem trabalhos na literatura que relatam esta linearidade do crescimento das bicamadas para os filmes LbL contendo AH, tais como, o valor de $R = 0,999$ obtido com o filme HDL/AH (YUAN et al. 2013) e $R = 0,997$ para o filme LbL PAMAN/AH (CRESPILHO et al. 2005). Nota-se que em ambos estes estudos, o AH atuou como um poliânion para a

ancoragem de policações formados por moléculas volumosas. No entanto estes pesquisadores verificaram melhores respostas dos sensores HDL/AH (YUAN et al. 2013) e PAMAN/AH (CRESPILHO) com o AH imobilizado na parte externa do filme. Comparando com o nosso trabalho, observou-se que as melhores respostas foram determinadas com o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻), ou seja, com o AH na parte interna do filme. Isso indica que a presença do poliânion AH sobre a superfície do substrato de quartzo pode disponibilizar um maior número de sítios de ancoragem para o híbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ se imobilizarem mais facilmente no filme, o que nos mostra um crescimento mais linear e uniforme deste filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻) ($R = 0,994$).

Os AH são solúveis em pH básico e precipita-se em forma de produto escuro amorfo em pH ácido (JESUS et al. 2004). São substâncias com cargas variáveis em que os grupos principalmente o carboxílico (pKa 4-5) e hidróxilo (pKa 8-11) se dissociam gradualmente com o aumento do pH (SILVA, W. et al. 2002; GALESKA et al. 2011).

Medidas espectroscópicas na região do infravermelho (FTIR) no modo transmissão do AH (pó), dos filmes *drop-coated* de AH ilustrados na Figura 13 (a), dos filmes *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ ilustrados na Figura 13 (b), foram fundamentais para confirmar a presença destes polieletrólitos nos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ (Figura 13 a-b). A fim de comparação do AH quando em estado sólido ou em solução, obteve-se o espectro do AH em pó (pastilha de KBr) imobilizado em filme a partir da técnica *drop-coated* e LbL. É possível verificar nos espectros dos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ presentes nas Figuras 13 (a) e (b), algumas bandas características dos polieletrólitos precursores, AH em pó e depositado na forma de filme *drop coated* (Figura 13 (a)), SiPy⁺Cl⁻ (Figura 13 (b)) e Pt-SiPy⁺Cl⁻ (Figura 13 (b)). As atribuições das principais bandas dos polieletrólitos precursores e filmes LbL são resumidas na Tabela 6.

Dentre as bandas do AH (espectro na forma de pó e filme *drop-coated*) que são observadas nos espectros dos filmes LbL destacamos a banda de baixa intensidade em 3694 ou 3692 cm⁻¹ atribuída à ligação de hidrogênio (GU et al. 2012) a qual não é alterada em relação aos filmes LbL, pois ocorre dentro dos grupos do AH. Por outro lado, a banda da vibração do estiramento C=C (GU et al. 2012) e estiramento assimétrico do grupo COO⁻ dos ácidos carboxílicos (FIALHO et al. 2010; CRESPILHO et al. 2005; PICCOLO et al. 2006; AMIR et al. 2010) que surge em 1580 ou 1572 cm⁻¹ nos espectros do AH (pó e filme *drop-coated*, respectivamente), sofre um deslocamento acentuado nos espectros dos filmes LbL, ou seja, desloca para 1564 cm⁻¹ no (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ e para 1580 cm⁻¹ no (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀. A vibração da torção dos grupos CH₂ do AH (GU et al. 2012) em 1386 ou 1378 cm⁻¹ (espectro

do AH pó e filme *drop-coated*, respectivamente) é também deslocada em relação aos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ (1350 cm⁻¹) e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ (1372 cm⁻¹). A banda em 1034 cm⁻¹ atribuída à deformação no plano e fora do plano do C=O aromático (AMIR et al. 2010) e à vibração do OH alifático (GU et al. 2012) nos espectros do AH difere em relação aos filmes LbL (1031 cm⁻¹), em cujos espectros torna-se muito intensa e alargada, devido à sobreposição com a vibração da estrutura de gaiola do grupo Si-O-Si do SiPy⁺Cl⁻ e do Pt-SiPy⁺Cl⁻ (LIU et al. 2002; SANTOS et al. 2012; JESUS et al. 2011), a qual comprova a presença do híbrido nos filmes LbL.

Figura 13- Espectros FTIR de: (a) AH (pó) (pastilha de KBr), filme *drop-coated* de AH, filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ e filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀. (b) filmes *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻, Pt-SiPy⁺Cl⁻ e filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃₀ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀. Todos os filmes foram obtidos sobre silício.

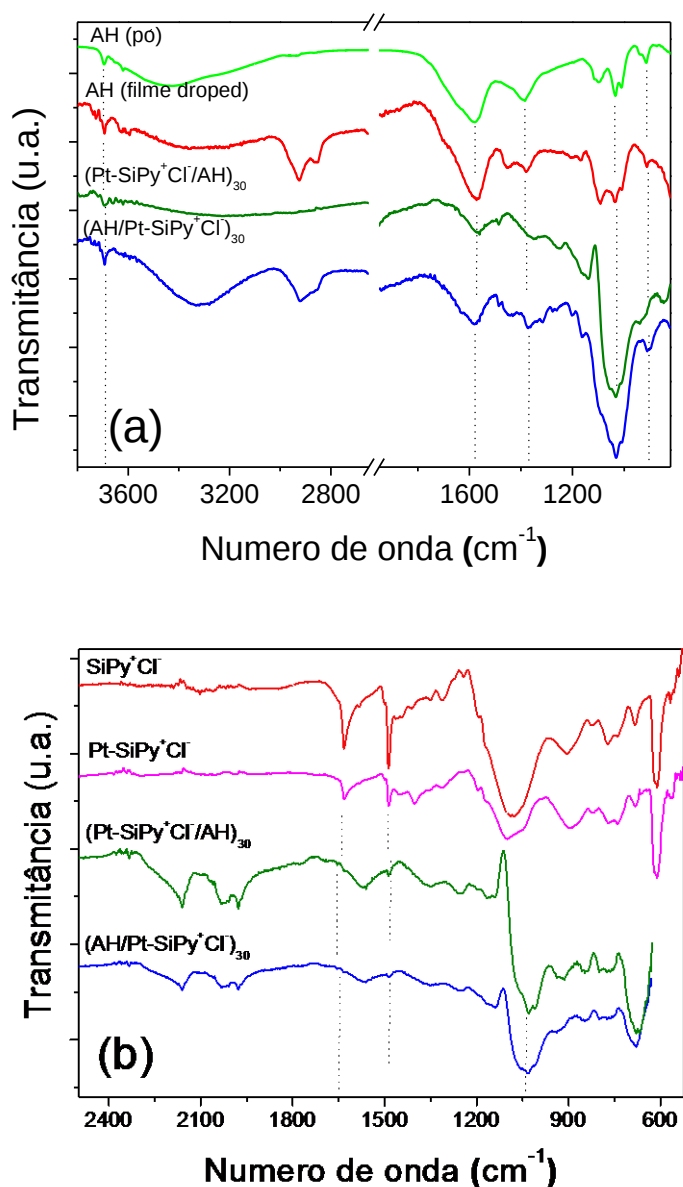


Tabela 6- Bandas observadas nos espectros FTIR no modo de transmissão dos filmes *drop-coated* de SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e AH e dos filmes LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$

Atribuições	(AH) cm^{-1}	(Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) cm^{-1}	(Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃₀ cm^{-1}	(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ cm^{-1}
Ligação de Hidrogênio	3692	-	3692	3692
ν Anéis nos anéis piridínicos	1632 1487	1632 1487	1632 1486	1634 1487
$\nu \text{C}=\text{C}$; $\nu_{\text{assim}} \text{COO}^-$	1572	-	1564	1580
vibração de torção dos grupos CH_2	1378	-	1350	1372
δ plano e fora do plano de $\text{C}=\text{O}$ aromático	1092	-	-	-
Estrutura de gaiola do grupo Si-O-Si ($\nu_{\text{assim}} \text{Si-O-Si}$; δ plano e fora do plano de $\text{C}=\text{O}$ aromático; vibração do -OH alifático	1034	1034	1031	1031
$\nu_{\text{sim}} \text{C-O}$	911	-	-	900
$\nu_{\text{sim}} \text{Si-O-Si}$	-	774	769	797
$\delta \text{Si-H}$	-	610	670	674

Fonte: A autora

Ainda no espectro do AH, pode ser observada uma banda em 911 ou 914 cm^{-1} nos espectros do AH (pó e filme *drop-coated*, respectivamente), a qual é deslocada para 900 cm^{-1} nos espectros do filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$. Esta banda é pouco definida no espectro do LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$, o que pode ser justificado pela melhor transferência dos polieletrólitos quando a deposição inicia com o AH, conforme observado por UV-Vis.

Com observado no espectro do SiPy^+Cl^- e do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (Figuras 13 (b)), a presença do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ também é confirmada pelas bandas em 1632 e 1487 cm^{-1} , atribuídas aos anéis piridínio (JESUS et al. 2011), a qual surge sem deslocamentos e menor intensidade nos espectros dos filmes LbL. A falta de definição desta banda é devido à presença da banda alargada em torno de $1564 - 1580 \text{ cm}^{-1}$ dos grupos do AH. A banda em 774 cm^{-1} observada no do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ atribuída ao estiramento simétrico do grupo Si-O-Si é deslocada para 769 e 797 cm^{-1} nos espectros dos filmes LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$ e $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$, respectivamente. Além desta banda, a banda intensa em 610 cm^{-1} do dobramento balanço sacudida do grupo Si-H é deslocada para cerca de $670 - 677 \text{ cm}^{-1}$ nos filmes LbL.

Conforme exposto, ao comparamos os espectros dos polieletrólitos precursores com os dos filmes LbL é perceptível a diminuição da intensidade das bandas dos anéis piridínicos em 1487 e 1632 cm^{-1} na Figura 13 (b). Além disso, nota-se a diminuição da banda do AH em 1092 cm^{-1} correspondente às deformações do grupo C = O aromático e 1576 cm^{-1} ($\nu_{\text{assim}} \text{COO}^-$). Esta observação representa um forte indício das interações entre os anéis piridínicos do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e os grupos COO^- do AH após deposição dos precursores na forma de filmes LbL. Além disso, alguns trabalhos reportados na literatura ressaltam a importância do desaparecimento da banda do AH em torno de 1720 cm^{-1} atribuída ao C=O protonado dos ácidos carboxílicos (Crespilho et al. 2005) que geralmente aparece no AH em pó, e desaparece em solução. A importância da desprotonação está no aumento da disponibilidade dos grupos aniônicos carboxilatos (COO^-), o que propicia maior interação eletrostática com o polycation. No entanto, a banda em torno de 1720 cm^{-1} não foi verificada neste trabalho no espectro dos filmes investigados nem no espectro do AH em pó depositados em pastilha de KBr, como mostra a Figura 13 (a).

Ainda dos espectros de FTIR é perceptível que as bandas são mais intensas e definidas nos espectros do filme LbL $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$. Esta observação corrobora com os resultados de UV-Vis, que mostraram que nesta arquitetura há o crescimento linear da absorbância do filme até 30 bicamadas. Por outro lado, na arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, a partir de 12 bicamadas (Figura 12 (c)) não há crescimento linear em função do aumento do número de bicamadas. Sendo assim, uma menor quantidade de espécie está adsorvida no presente no filme, o que explica as bandas menos intensas e definidas no espectro de FTIR.

Os deslocamentos das bandas evidenciados no espectro do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, tais como, 610, 771, 1098, 1487 e 1630 cm^{-1} em relação as bandas do espectro do SiPy^+Cl^- , tais como, 616, 776, 1082, 1490 e 1634 cm^{-1} são decorrentes à incorporação das Nps-Pt nas cavidades do SiPy^+Cl^- .

Espectros de espalhamento Raman dos filmes *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, *drop-coated* de AH, filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$ e filme LbL de $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ depositados sobre substrato de Si, são ilustrados na Figura 14. No espectro do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (Figura 14 (a)) é possível observar a banda em 1028 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel piridínio (DOLLISH et al. 1974). No espectro do AH (Figura 14 (b)) verifica-se as bandas em 1364 e 1598 cm^{-1} das bandas D e G, respectivamente. Estas duas bandas são atribuídas ao modo de respiração do anel (banda D) e aos estiramentos de ligações presentes na cadeia e nos anéis do AH (YANG; WANG, 1997; CRESPILO et al. 2005). A presença das bandas D e G nos filmes LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$ (1375 e 1589 cm^{-1}) (Figura 14 (c) e

Tabela 7) e $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ (1371 e 1594 cm^{-1}) (Figura 14 (d)) assim como a verificação de deslocamentos de bandas nos espectros Raman confirmam as interações existentes entre o AH e o nanohíbrido $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)$. O maior deslocamento das bandas D e G observado no espectro do filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ em relação ao espectro do polianion AH corrobora com a constatação de que há uma interação mais efetiva entre os grupos funcionais dos polieletrólitos evidenciada pelas técnicas espectroscópicas UV-Vis e FTIR.

A banda do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ em 1028 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel piridínio não aparece nos espectros dos filmes LbL. Isto provavelmente ocorre devido à grande quantidade de grupos vibracionais presentes na grande estrutura do AH que podem estar sobrepondo esta banda.

Figura 14- Espectros de espalhamento Raman para os filmes (a) *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, (b) *drop-coated* de AH, (c) filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$ e (d) filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ todos depositados sobre Si.

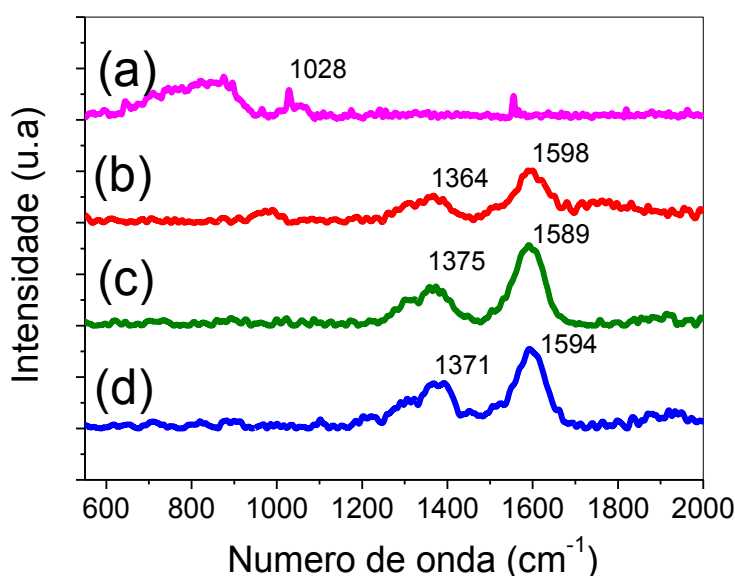


Tabela 7- Bandas observadas nos espectros Raman dos filmes *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, *drop-coated* de AH, filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$ e (d) filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$. Todos os filmes foram depositados sobre silício.

Bandas (cm^{-1})	(AH)	($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)	($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH}$) ₃₀	($\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$) ₃₀
Modo de respiração do anel piridínio	1364 cm^{-1}	—	1375 cm^{-1}	1371 cm^{-1}
Estiramentos na cadeia e nos anéis	1598 cm^{-1}	—	1589 cm^{-1}	1594 cm^{-1}
Modo de respiração do anel piridínio	—	1028 cm^{-1}	—	—

Fonte: A autora

5.3 Caracterização morfológica dos filmes LbL por AFM

Medidas de AFM foram realizadas com o intuito de investigar a morfologia superficial dos filmes LbL nas duas arquiteturas, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ ($n = 3, 5, 10, 15$ e 20 bicamadas) (Figura 15 (a–f)) e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$ ($n = 5$ e 10 bicamadas) (Figura 15 (g–h)) sobre a superfície de FTO. Os valores de rugosidade média destes filmes LbL são listados na Tabela 8.

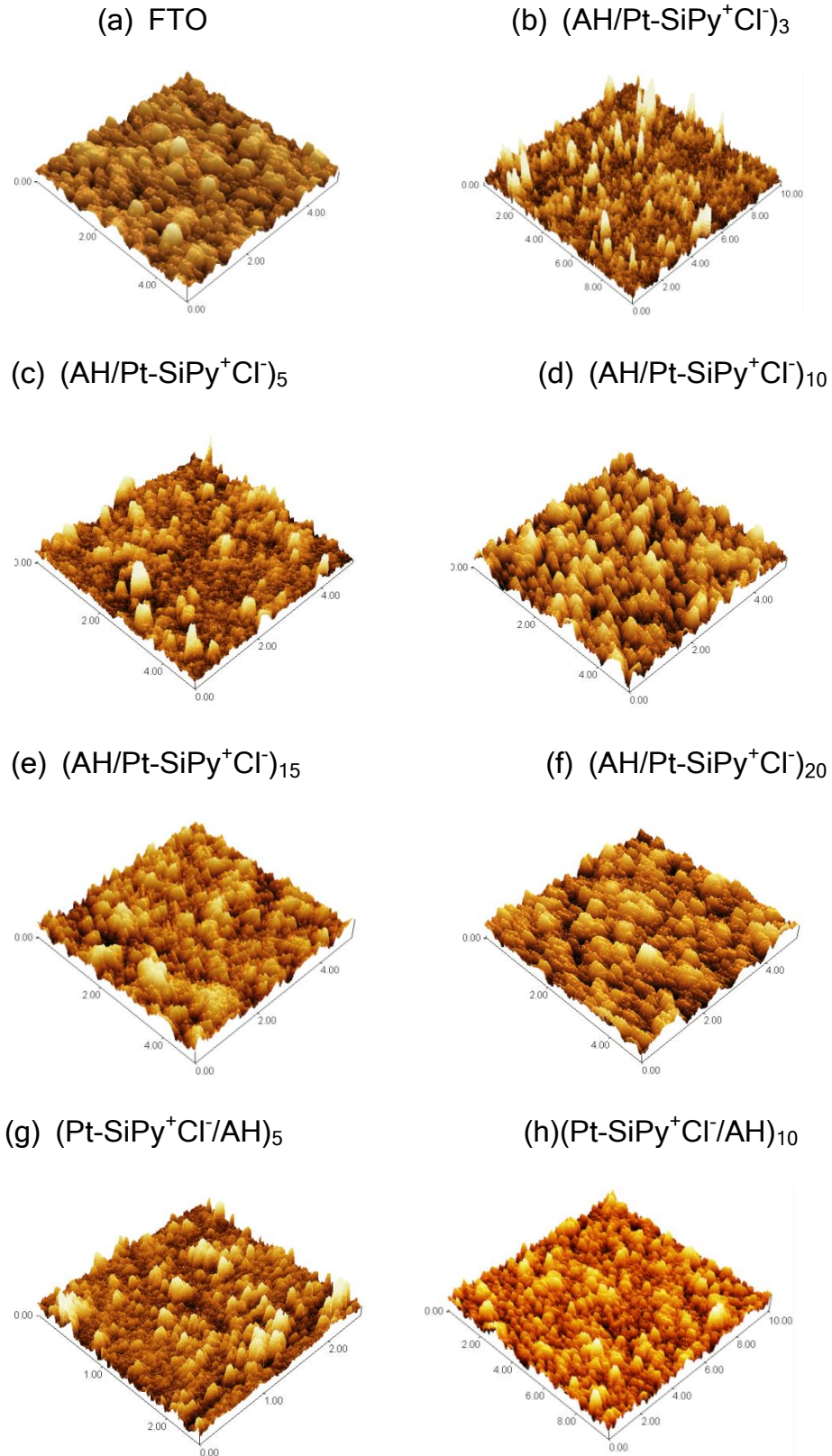
Tabela 8 - Rugosidade média dos grãos (nm) da superfície do FTO, dos filmes LbL $(\text{AH} / \text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ contendo 3, 5, 10, 15 e 20 bicamadas e do filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^- / \text{AH})_n$ contendo 5 e 10 bicamadas.

Substrato / FilmeLbL	Rugosidade $R_q(\text{nm})(5 \times 5 \mu\text{m})$
(a) FTO	32,029
(b) FTO $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	10,514
(c) FTO $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$	14,476
(d) FTO $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$	26,601
(e) FTO $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{15}$	31,588
(f) FTO $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{20}$	33,150
(g) FTO $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_5$	14,823
(h) FTO $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{10}$	25,362

Fonte: A autora

Ao comparar a rugosidade média dos grãos de superfície, nota-se que o substrato FTO é o que apresenta maior rugosidade (32,029 nm) em relação aos filmes com poucas bicamadas (3 a 10 bicamadas). A deposição dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ diminui essa rugosidade, pois estes se depositam nos espaços existentes do substrato FTO entre os grãos os preenchendo. Após as primeiras bicamadas, a quantidade adsorvida ou espessura por bicamada torna-se independente do substrato (DECHER & SCHLENOFF, 2012) e com a deposição sequencial das bicamadas faz com que a rugosidade aumente novamente devido à auto-organização que ocorre entre os polieletrólitos. Resultados similares foram obtidos para filmes LbL contendo $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$ estudados por Jesus et al. (2011) e para filmes LbL contendo $\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (SANTOS, V et al. 2012) e $\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (SANTOS, V. et al. 2013). Além disso, é evidente na imagem da Figura 15 (g) e (f) obtida com o filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_5$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{10}$ um aspecto morfológico distinto dos observados para os filmes contendo a arquitetura $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ (Figura 15(c) e (d)). Isto nos mostra por mais uma técnica a influência da sequência de deposição exercida sobre a arquitetura molecular superficial dos filmes. Essa influência tem origem nos diferentes tipos de interações eletrostáticas, que podem ser fracas ou fortes.

Figura 15 - Imagens de AFM; (a) substrato FTO, (b) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, (c) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$, (d) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$, (e) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{15}$, (f) $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{20}$, (g) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_5$ e (h) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{10}$. A janela de varredura para as imagens foi de $5 \times 5 \mu\text{m}$.



Como ilustrado nas Figuras 15 (c-e) as imagens dos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)_n (n = 5-15) mostram uma superfície globular com rugosidade média quadrática (RMS) variando de 14,476 a 31,588 nm, respectivamente (janela de 5 µm x 5 µm), sugerindo que a rugosidade da superfície aumenta mediante ao aumento da bicamada automontada. O mesmo ocorre para filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)_n (n = 5 e 10) (Figura 15 (g-h)) com valores de RMS entre 14,823 a 25,362 nm, respectivamente. Além disto, pode dizer que para um filme de 10 bicamadas para ambas as arquiteturas, a espessura média de cada bicamada foi estimada em aproximadamente 2,6 nm. Este valor é similar ao filme (HDL/AH)_n (n= 8) cujo valor foi estimado em torno de 2,1 nm (YUAN et al. 2013). Segundo Shiratori e Rubner (2000) a adsorção de tais bicamadas finas molecularmente organizadas em filmes finos LbL é esperada que ocorram desde que polieletrólitos fracos e totalmente carregados são empregados. Portanto, isto prova que neste trabalho tanto o AH e o Pt-SiPy⁺Cl⁻ são carregados nos pH empregados (pH 7,9 para o AH e pH 2,9 para o Pt-SiPy⁺Cl⁻).

A imagem de AFM para o filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₂₀ (Figura 15 (f)) mostra que a superfície do filme é mais suave e uniforme, da mesma forma que encontrado para filmes LbL contendo 30 bicamadas de AH alternado com hidróxidos duplos lamelares (YUAN et al. 2013). Este fato comprova que filmes de múltiplas bicamadas de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH foi formado com sucesso pela técnica LbL. A formação de filmes ultrafinos com camadas com superfícies homogêneas e lisas podem ser vantajosa para a construção de eletrodos modificados, porque muitos dos processos eletroquímicos são conhecidos serem dependentes da espessura (CRESPILHO e LOST, 2012), como será visto no item a seguir.

5.4 Caracterização eletroquímica dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filmes *drop-coated* de (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (AH)₃

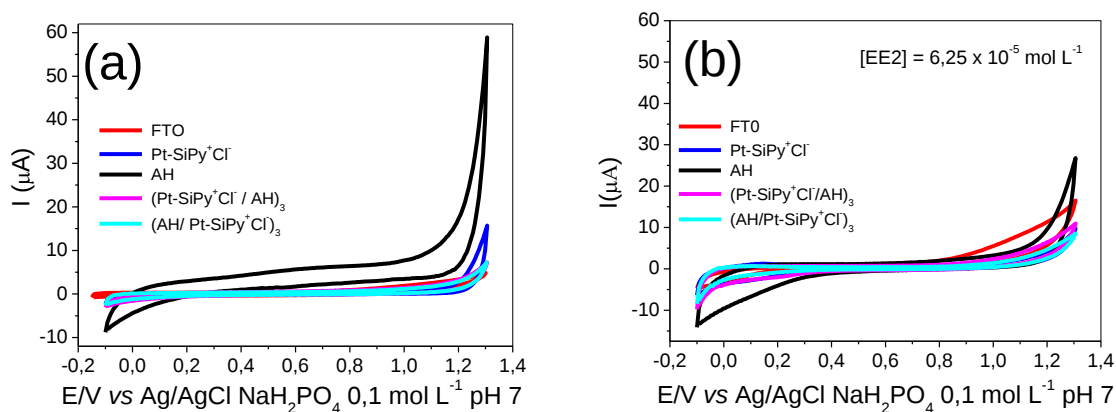
5.4.1 Determinação do hormônio 17 α-etinilestradiol (EE2) por voltametria cíclica (VC)

A avaliação das propriedades eletroquímicas dos filmes LbL em diferentes arquiteturas no processo de oxidação do hormônio EE2, foram realizadas inicialmente por medidas de VC.

Os voltamogramas cíclicos do substrato FTO, dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e dos filmes *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH foram obtidos na ausência e na presença de 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de EE2, utilizando como eletrólito suporte uma solução de

0,1mol L⁻¹ NaH₂PO₄ em pH 7 na janela de potencial de -0,1 a 1,4 V, como mostrado na Figura 16 (a) (b).

Figura 16- Voltamogramas cíclicos do FTO, dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH sobre o substrato FTO, em NaH₂PO₄ 0,1mol L⁻¹, pH = 7 (a) na ausência de EE2 e (b) na presença de 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ EE2 ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).



Nota-se dos voltamogramas cíclicos ilustrados na Figura 16 (a) que os filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃, e filmes *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH, não apresentaram processo redox devido à não eletroatividade destes polieletrólitos na janela de potencial investigada (-0,1 a 1,3 V vs Ag/AgCl). É conhecido de outros trabalhos (JESUS et al. 2011; SANTOS, V. et al. 2012) que filmes LbL e *drop-coated* construídos com os policátions SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ não apresentam processos redox definidos quando estudados neste mesmo meio e janela de potencial.

A ausência do processo redox do policátion AH também foi constatada no estudo quando o AH foi imobilizado alternadamente com hidróxidos duplos lamelares de Mg-Al em filmes LbL LDH/AH (YUAN et al. 2013). Por outro lado, quando o filme LbL contendo PAH/AH depositado sobre ITO foi estudado na faixa mais negativa de potencial (-1,0 a 1,0 V, vs Ag/AgCl), foi observado um pico de redução em -0,67 V (vs Ag/AgCl) (CRESPILO et al. 2005). Como nosso interesse é a detecção do hormônio EE2, esta faixa de potencial não foi estudada.

Também pode-se verificar dos voltamogramas apresentados na Figura 16 (a) que o eletrodo contendo o filme *drop-coated* de AH possui maior corrente capacitiva em relação ao FTO e aos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ devido ao fato do AH, presente na superfície do eletrodo, aumentar o efeito resistivo e por ocorrerem algumas reações redox nas próprias moléculas do AH. O aumento da corrente capacitiva também foi observado no eletrodo de pasta de carbono modificado com AH (CRESPILO e REZENDE et al. 2004).

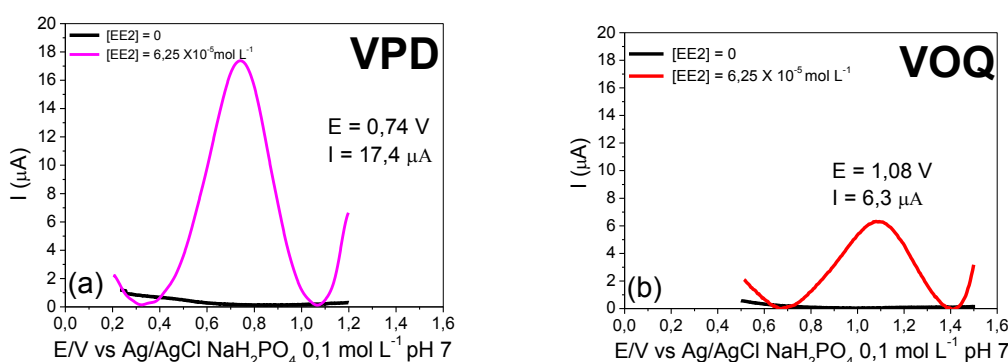
Apesar do EE2 ser eletroquimicamente inativo, sobre as condições experimentais até aqui estudadas, a literatura relata exemplos de eletrodos que detectaram diferentes estrogênios com a presença de um pico anódico. Quando o EE2 foi estudado em eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), a corrente de pico anódica em 1,26 V (vs ECS) que surgiu nos primeiros ciclos, diminuiu sua intensidade após varreduras consecutivas, fato este devido ao fenômeno de incrustação proveniente da deposição de um produto semi-condutor eletropolimerizado na superfície do DDB, o qual foi responsável pela redução da velocidade de transferência de elétrons ao eletrodo. Por outro lado, Santos et al. (2010) constataram que o eletrodo DDB apresentou excelente propriedade eletrocatalítica para a oxidação de hormônios, em particular ao Estriol (1,3,5,(10)-estratriene-3,16,17-triol), com a presença de um pico anódico em 0,3 V, quando utilizaram a técnica Voltametria de Onda Quadrada, pelo fato desta ser uma técnica de pulso vantajosa pela velocidade rápida e boa sensibilidade, tanto em reações reversíveis como em irreversíveis. Portanto, no nosso trabalho optou-se pela continuidade do estudo da oxidação do EE2 pelo uso das técnicas eletroanalíticas VOQ e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).

5.4.2 Determinação do EE2 por voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ)

Através da técnica de VC não foi possível verificar um processo redox definido para a oxidação do EE2, sendo necessário utilizar técnicas eletroanalíticas mais sensíveis para este estudo, tais como, a VPD e VOQ.

Os voltamogramas obtidos com o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2, utilizando como eletrólito suporte uma solução de NaH₂PO₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 na janela de potencial de 0 a 1,6 V, utilizando as técnicas eletroanalíticas VPD e VOQ são ilustrados na Figuras 18 (a) e (b), respectivamente. Notou-se que ambos os voltamogramas apresentaram um pico anódico definido, porém, dentre estas técnicas empregadas na oxidação do EE2, a VPD foi a que apresentou melhor resposta eletroquímica em função do menor potencial de oxidação ($E_{pa} = 0,74 \text{ V}$) e maior valor de corrente de pico de oxidação ($I_{pa} = 17,38 \text{ } \mu\text{A}$), do que obtido com a técnica VOQ ($E_{pa} = 1,09 \text{ V}$ e $I_{pa} = 6,31 \text{ } \mu\text{A}$). Diante desta análise, a técnica de VPD foi a escolhida para a continuidade dos estudos eletroquímicos dos filmes LbL, embora a VOQ seja mais sensível, a VPD foi mais eficaz para a oxidação do EE2.

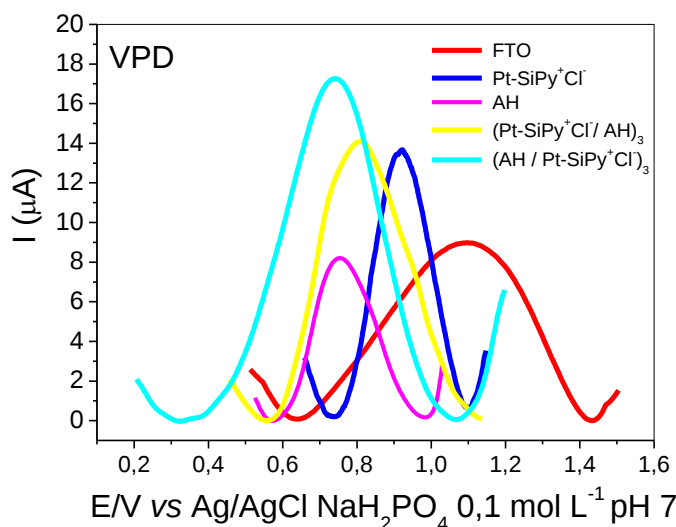
Figura 18 - Voltamogramas de (a) pulso diferencial e (b) onda quadrada do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, em NaH₂PO₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7 na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. Parâmetros utilizados para VPD: $E_{pulse} = 0,002 \text{ V}$, $t_{pulse} = 0,10 \text{ s}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



5.5 Caracterização eletroquímica das arquiteturas dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filmes *drop-coated* de (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (AH)₃ por VPD

Os voltamogramas de pulso diferencial do substrato FTO, filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filmes *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH, foram obtidos com o objetivo de avaliar as propriedades eletroquímicas das diferentes arquiteturas, na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. A Figura 19 ilustra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos com estes eletrodos.

Figura 19 - Voltamogramas de pulso diferencial do FTO, filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH sobre o substrato FTO, em NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH = 7, na presença de EE2 $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ($E_{\text{pulse}} = 0,002 \text{ V}$, $t_{\text{pulse}} = 0,10 \text{ s}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).



Ao analisar os voltamogramas da Figura 19, observa-se que os eletrodos constituídos pelos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃, filmes *drop-coated* Pt-SiPy⁺Cl⁻ e AH, bem como o substrato FTO apresentaram um pico anódico atribuído à oxidação do EE2 ao radical fenóxi (MURUGANANTHAN et al. 2007), com os máximos de potenciais de oxidação (E_{pa}) entre 0,74 e 1,09 V (0,74; 0,81; 0,92; 0,74 e 1,09 V, respectivamente). Além disto, as correntes de picos de oxidação de EE2 ocorreram com diferentes intensidades. As maiores correntes de pico anódicas (I_{pa}) foram obtidas para os filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filme *drop-coated* Pt-SiPy⁺Cl⁻ (I_{pa} = 17,21 μA, I_{pa} = 14,01 μA e I_{pa} = 13,48 μA, respectivamente) em relação ao FTO (I_{pa} = 8,78 μA) e ao filme *drop-coated* AH (I_{pa} = 8,15 μA). Os valores dos potenciais e correntes de pico de oxidação dos filmes estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de potenciais de pico anódico (E_{pa}) e correntes de pico anódica (I_{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ e filmes *drop-coated* de (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (AH)₃.

Filmes	$E_{pa}(V)$ n=3	$I_{pa}(\mu A)$ n=3
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	0,74 ± 0,01	17,21 ± 0,25
(Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /AH) ₃	0,81 ± 0,01	14,01 ± 0,50
Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻	0,92 ± 0,01	13,48 ± 0,65
AH	0,74 ± 0,01	8,15 ± 0,47
FTO	1,09 ± 0,01	8,78 ± 0,41

Fonte: A autora

Ao comparar os valores de E_{pa} e I_{pa} obtidos com os filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ (I_{pa} = 17,21 e 14,01 μA , respectivamente) e *drop-coated* contendo AH e Pt-SiPy⁺Cl⁻ (I_{pa} = 8,15 e 13,48 μA , respectivamente), em relação ao eletrodo sem modificação, FTO, (I_{pa} = 8,78 μA) nota-se que os dois tipos de filmes forneceram maiores correntes de oxidação para o EE2. Isto prova que a presença dos dois polieletrólitos auxiliam a transferência de elétrons entre o EE2 e o eletrodo. Dentre estes eletrodos, observou-se que o eletrodo contendo apenas AH exibiu menor corrente de oxidação para o EE2 (I_{pa} = 8,15 μA). Estudos descritos na literatura revelam que o voltamograma de um eletrodo de pasta de carbono (EPC) contendo AH difere de um EPC sem modificação devido ao fato do AH presente na superfície do eletrodo aumentar o efeito resistivo e por ocorrerem algumas reações redox nas próprias moléculas de AH (CRESPILHO e REZENDE, 2004). Porém, a presença de AH na construção dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ é fundamental. Neste caso, podemos dizer que a combinação do AH com o Pt-SiPy⁺Cl⁻, fornece um incremento no valor de corrente anódica do processo redox do EE2 e o potencial de oxidação fica mais baixo com a presença do AH, em relação ao filme contendo apenas Pt-SiPy⁺Cl⁻. Baseado nos resultados de medidas de UV-Vis e FTIR, o aumento da corrente de pico proporcionado pela presença do AH nos filmes, pode ser explicado pelo fato desta macromolécula ser constituída por grande quantidade de grupos funcionais, tais como COOH, OH-fenólicos, OH-enólicos, OH-alcoólicos, C=O de quinonas e hidroxiquinonas, e cetonas (SARGENTINI Jr. et al. 2001), os quais disponibilizam maior número de sítios para ocorrerem as interações com o grupo piridínico do SiPy⁺Cl⁻. Este fato faz com facilite a adsorção da molécula orgânica, EE2, sobre a superfície do eletrodo. O aumento da corrente de pico em função da intercalação de analitos, tal como o pentaclorofenol sobre a superfície do filme LbL PAH/AH e HDL/AH foi observado por outros autores (CRESPILHO et al. 2005;

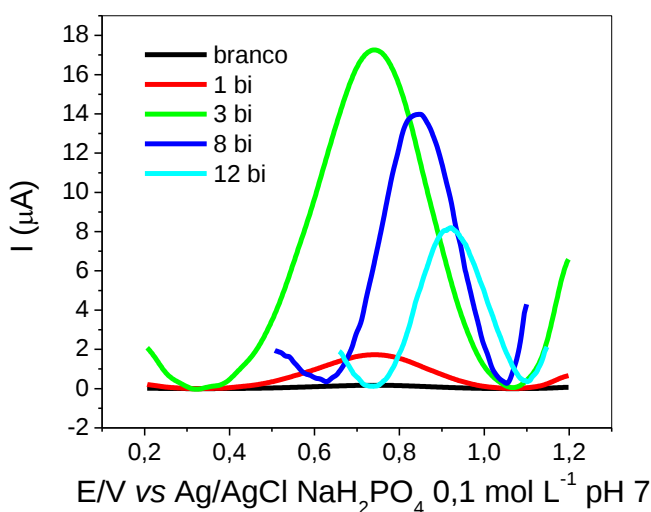
YUAN et al. 2013). Segundo Crespilho et al. (2005) a presença de AH no filme LbL melhora a adsorção do PCP na superfície do eletrodo, catalisando a transferência de elétrons entre o PCP e o eletrodo.

Outro fato constatado dos resultados dos voltamogramas de pulso diferencial é influência da sequência de deposição dos polieletrólitos na intensidade da corrente de pico de oxidação quando analisadas as mesmas condições experimentais de EE2. Nota-se que a intensidade de corrente de oxidação obtida com o filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ é maior ($I_{pa} = 17,21 \mu\text{A}$) do que para o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ ($I_{pa} = 14,01 \mu\text{A}$). A maior corrente observada para o filme com as $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ na superfície externa no eletrodo, se deve pelas Nps-Pt estarem diretamente em contato com a solução de EE2, o que facilita o processo de transferência de elétrons. Apesar de relatos na literatura mostrarem a importância do AH na parte externa do filme LbL, no nosso estudo observamos que o AH minimiza a capacidade das Nps-Pt em atuarem como mediadoras de elétrons na oxidação do EE2. Resultados similares foram obtidos por Santos et al. (2012), que investigaram o processo redox do neurotransmissor dopamina (DA) e observaram maiores valores de correntes de oxidação e menores valores de potencial de oxidação para o filme LbL contendo Nps-Pt na parte externa do filme contendo 3 bicamadas de ácido poli-vinil-sulfônico (PVS) e o híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$. Em outro trabalho os mesmos autores (2013), observaram que o filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ forneceu as maiores intensidades de corrente de oxidação para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em relação ao filme com as Nps-Pt na parte interna. Como notado, em ambos os trabalhos, foi constatado uma influência significativa da presença das Nps-Pt na constituição dos filmes LbL para aplicação destes como sensores eletroquímicos.

Quando comparados os perfis dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os filmes LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ ($I_{pa} = 17,21$ e $14,01 \mu\text{A}$, respectivamente), com os filmes *drop-coated* de AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ ($I_{pa} = 8,15$ e $13,48 \mu\text{A}$, respectivamente), (Figura 20) percebe-se que as maiores correntes de oxidação proporcionada pelos filmes LbL para o EE2 nos revela a importância da técnica de automontagem no processo de modificação do eletrodo FTO para construção de sensores para a determinação de EE2.

Tendo observado que as melhores respostas eletroquímicas para oxidação de EE2 foram verificadas com o eletrodo $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, testou-se a dependência da resposta eletroquímica deste filme na presença de EE2 em diferentes números de bicamadas. Foram preparados filmes LbL contendo 1, 3, 8 e 12 bicamadas. A Figura 20 ilustra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os filmes LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ numa concentração de EE2 $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, onde n = 1, 3, 8 e 12 bicamadas, na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ EE2 ($E_{\text{pulse}} = 0,002 \text{ V}$, $t_{\text{pulse}} = 0,10 \text{ s}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).



Nos voltamogramas ilustrados na Figura 20, verificou-se que entre os filmes LbL contendo diferentes bicamadas de (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, destaque pode ser dado para o filme com 3 bicamadas, o qual proporcionou maior intensidade de corrente de oxidação para EE2 ($I_{\text{pa}} = 17,26 \mu\text{A}$). Isto ocorre, pois, devido ao aumento do recobrimento da superfície pelo filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻), os sítios disponíveis no eletrodo para a análise deste analito aumenta com o número de bicamadas de um filme muito fino. Os valores dos potenciais e correntes de pico de oxidação dos filmes (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de potenciais de pico anódico (E_{pa}) e correntes de pico anódica (I_{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contendo diferentes números de bicamadas (1, 3, 8 e 12).

Filmes	$E_{\text{pa}}(\text{V})$ n=3	$I_{\text{pa}}(\mu\text{A})$ n=3
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁	$0,74 \pm 0,01$	$1,83 \pm 0,41$
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	$0,73 \pm 0,01$	$17,26 \pm 0,51$
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₈	$0,84 \pm 0,01$	$14,02 \pm 0,52$
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁₂	$0,91 \pm 0,02$	$8,12 \pm 0,49$

Fonte: A autora

Constatou-se também na Figura 20 que a deposição de uma única bicamada não foi suficiente para propiciar o recobrimento da superfície do FTO necessário para intensificação no sinal de corrente de oxidação de EE2. Com 3 bicamadas a quantidade de material depositado sobre a superfície do substrato FTO é suficiente para as moléculas se auto-

organizarem para promover a transferência de elétrons e a intensificação do sinal. Isto está relacionado à natureza nanoestruturada do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃.

Para os filmes LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n com maior número de bicamadas (n = 8 e 12) a corrente de oxidação de EE2 diminuiu porque o eletrodo se torna mais resistivo devido à maior quantidade de material depositado, o que dificulta o processo de transferência de elétrons do analito em solução até a superfície do eletrodo. Estes resultados corroboram com o aumento da intensidade de absorbância obtido por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, bem como por AFM, onde verificou-se uma relação linear da rugosidade superficial com o aumento no número de bicamadas (Figura 15).

A constatação de que o aumento do número de bicamadas proporciona uma significativa diminuição no valor de corrente de pico também foi observada em trabalhos com SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻. Jesus et al. (2011), verificaram que o filme LbL contendo 5 bicamadas de SiPy⁺Cl⁻ e ftalocianina tetrasulfonada de cobre II (CuTsPc) exibiu maiores valores de corrente de pico de oxidação para DA e ácido ascórbico (AA), em relação aos demais filmes LbL obtidos com mais bicamadas (10 e 20 bicamadas). Na detecção de DA e H₂O₂ com os filmes LbL contendo Pt-SiPy⁺Cl⁻, Santos et al. (2012 e 2013) constataram as melhores respostas eletroquímicas com filme com 3 bicamadas do que filmes com 6, 9 e 12 bicamadas. Portanto, no nosso trabalho filmes com 3 bicamadas foram adotados nos experimentos posteriores.

Após determinado que o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ exibiu as melhores respostas no processo de detecção do EE2, realizou-se um estudo eletroquímico com o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para a escolha do melhor eletrólito suporte na detecção de EE2 (Figura 21). A escolha do eletrólito de suporte é uma etapa importante em estudos eletroanalíticos porque a sua composição e pH afetam as propriedades da solução, bem como a interface eletrodo-solução, modificando a termodinâmica e cinética do processo de transferência de carga e a adsorção na superfície do eletrodo (AGOSTINHO e VILLAMIL, 2004). Neste sentido, as soluções com diferentes composições e valores de pH foram testadas como eletrólito de suporte para investigar a oxidação do EE2. Portanto, utilizaram-se as soluções dos eletrólitos NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaNO₃, KCl, Tampão PBS, Tampão BR e Tampão Fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹ com seus respectivos valores de pH (sem ajuste). Os valores de pH, dos eletrólitos suportes utilizados neste experimento estão descritos na Tabela 11.

Figura 21- Voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de EE2 $6,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suportes 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pHs. Parâmetros utilizados: $E_{pulse} = 0,002V$, $t_{pulse} = 0,10s$ e $v = 50 mV s^{-1}$.

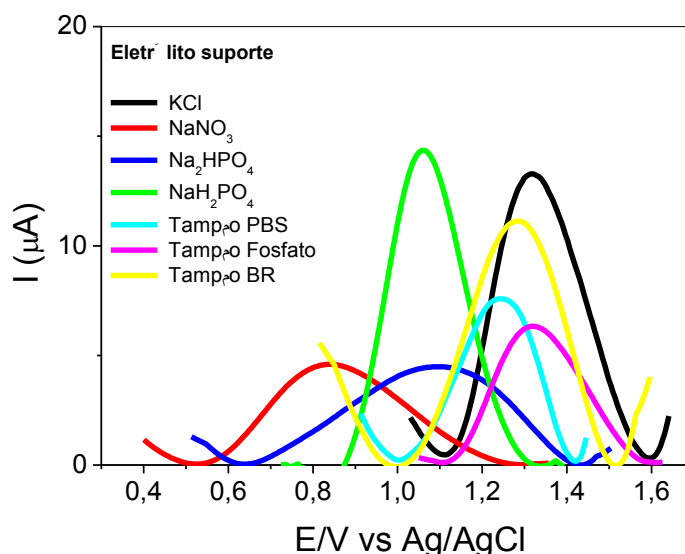


Tabela 11- Eletrólitos suportes utilizados na determinação de EE2 com seus respectivos valores de pH, Epa e Ipa.

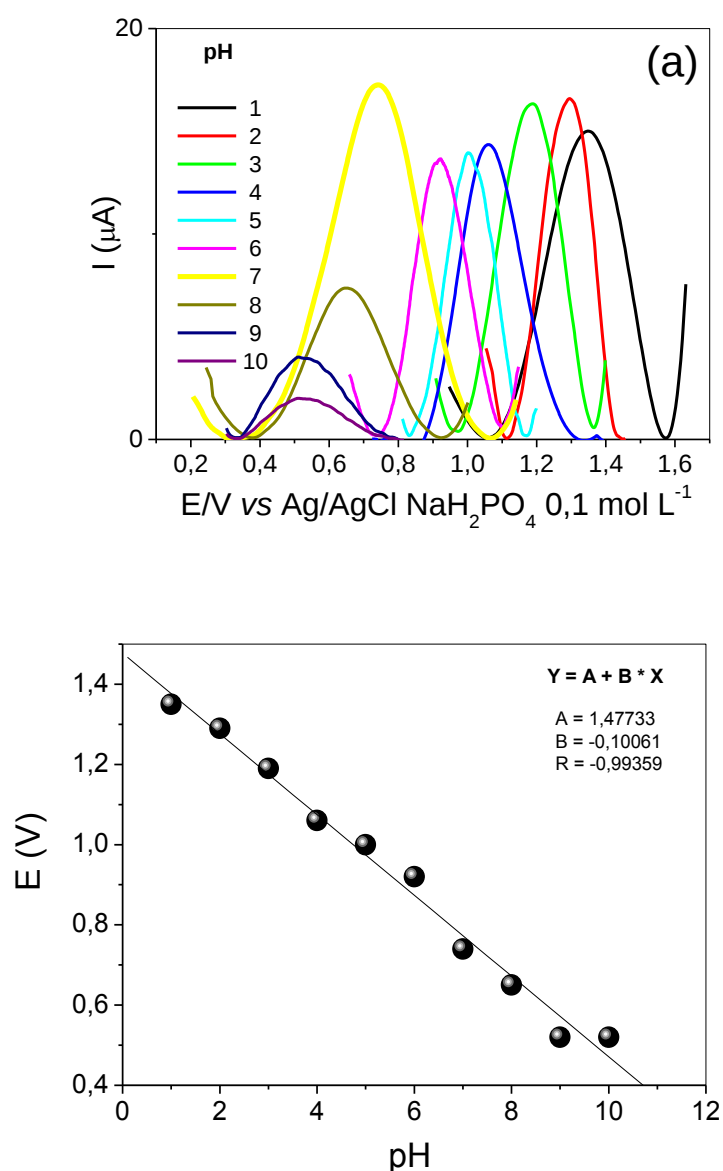
Eletrólito suporte (0,1 mol L ⁻¹)	pH	Epa (V)	Ipa (μA)
NaH ₂ PO ₄	4,3	1,06	14,4
Na ₂ HPO ₄	9,4	1,09	4,5
NaNO ₃	6,2	0,83	4,64
KCl	6,5	1,32	13,27
Tampão PBS	7,2	1,25	7,52
Tampão Britton Robson (BR)	2,0	1,28	11,07
Tampão Fosfato	7,5	1,33	6,28

Fonte: A autora

Apenas um pico de oxidação foi observado para todos estes eletrólitos suporte, porém com valores distintos de potencial e corrente de pico. O eletrólito suporte o NaH₂PO₄ em pH 4,3 foi o meio que proporcionou melhor resposta eletroquímica do filme LbL para a oxidação do EE2, pois foi observado maior valor de corrente de pico ($I_{pa} = 14,4 \mu A$) e um potencial de oxidação baixo ($E_{pa} = 1,06 V$). Os demais eletrólitos suportes, tais como, Na₂HPO₄, NaNO₃, KCl, tampão PBS, tampão BR e tampão Fosfato apresentaram valores de potenciais de oxidação próximos (1,09; 0,83; 1,32; 1,25; 1,28; 1,33 V, respectivamente). Embora em NaNO₃ tenha sido observada a oxidação do EE2 em potencial menos positivo ($E_{pa} = 0,83 V$) em relação a resposta em NaH₂PO₄, o sinal de corrente obtido em NaNO₃ ($I_{pa} = 4,64 \mu A$) foi

significativamente menor do que o verificado utilizando NaH_2PO_4 ($I_{pa} = 14,4 \mu\text{A}$). Em resumo, as melhores respostas eletroquímicas em termos do maior valor de corrente de pico oxidação do EE2 e potencial de oxidação baixo foi obtida com o eletrólito suporte NaH_2PO_4 em pH 4,3, porém, Santos et al. (2010) relataram que as melhores respostas eletroquímicas do eletrodo DDB para a oxidação do hormônio estriol é em pH ácido (2,0), utilizando o tampão BR como eletrólito suporte com potencial em 0,9 V (vs. ECS). Portanto, foi realizado um estudo da influência do pH deste eletrólito na presença de EE2 $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Testou-se o filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ nos pH 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 da solução de NaH_2PO_4 (Figura 22).

Figura 22- (a) Voltamogramas de pulso diferencial do filme $\text{LbL}(\text{AH}/\text{Pt}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de EE2 $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ nos pHs 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da solução de eletrólito suporte NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (b) relação entre o pH e os valores de potencial obtidos.



A Figura 22 mostra que o pH influencia no processo redox do hormônio, tal como, os valores de potenciais e de correntes. Nota-se que à medida que aumenta o pH da solução (1-10), o potencial de oxidação do EE2 se desloca para valores menos positivos (Tabela 12). Este é um comportamento típico para a oxidação de fenóis e foi também observado por Santos et al. (2010), para a oxidação de estriol (E3) e por Vega et al. (2007) para a oxidação de compostos fenólicos estrogênicos. Além disto, Santos et al. (2010) obtiveram a partir da correlação entre Epa vs pH, o valor de pKa do grupo fenólico (10.0) presente na estrutura química do estriol a partir da interseção de duas retas próximas ao pH 10. Logo, a ausência de mudança de potencial no pH 10, obtido na Figura 22 é muito próximo de 10,3-10,4, cujo valor é o pKa para estrogênios obtidos na literatura (QUINTANA et al. 2004).

Tabela 12 – Valores obtidos de Epa e Ipa com o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ nos pHs 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da solução de eletrólito suporte NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ na presença de EE2 6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Epa (V)	1,35	1,29	1,19	1,06	1	0,92	0,74	0,65	0,52	0,52
Ipa (μA)	14,98	16,53	16,32	14,34	14,10	13,76	17,21	7,40	4,50	2,01

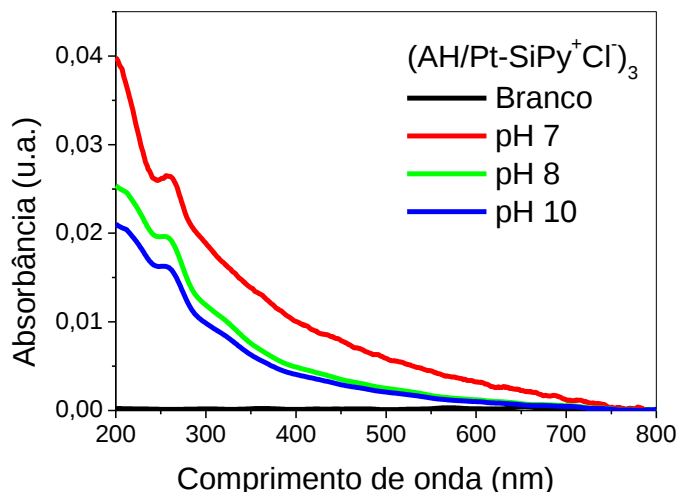
Fonte: A autora

Ainda da Tabela 12 pode ser observado que os voltamogramas obtidos em pH 8, 9 e 10 são os que apresentaram menores valores de corrente de pico e menores potenciais de pico de oxidação do EE2. Isso provavelmente ocorre devido ao AH ser altamente solúvel em pH alcalino, acima de 8 (CANELLAS et al. 2000; PEÑA-MÉNDEZ et al. 2005). Desta forma, a imersão do filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ nestes valores de pH, pode estar desestabilizando o eletrodo, causando a lixiviação do AH para o seio da solução e influenciando na resposta eletroquímica do filme na presença do hormônio EE2. Em pH mais ácido (1-7) o AH é insolúvel e a suspensão das Nps-Pt por ser ácida (pH = 2,9), pode estar influenciando no maior sinal de corrente de oxidação do EE2 nesta faixa de pH, com destaque para o pH 7 (IpA = 17,21 μA e Epa = 0,74 V) que por conter um valor de pH próximo do valor de pH da solubilidade do AH (pH = 8), pode propiciar um incremento significativo no sinal de corrente de oxidação do EE2.

Com o intuito de confirmar o processo de lixiviação do AH no filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em pH básico, imergiu-se este filme em soluções de NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ com pH 7, 8 e 10, deixando imerso por 1 minuto em cada solução. Após este tempo secou-se

o filme e mediu-se no UV-Vis. Nota-se dos espectros de absorção na região do UV-Vis do filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, ilustrados na Figura 23, que ocorre uma diminuição da intensidade do máximo de absorção em 264 nm em função do aumento do pH devido à solubilização do AH do filme, o que corrobora com os experimentos eletroquímicos.

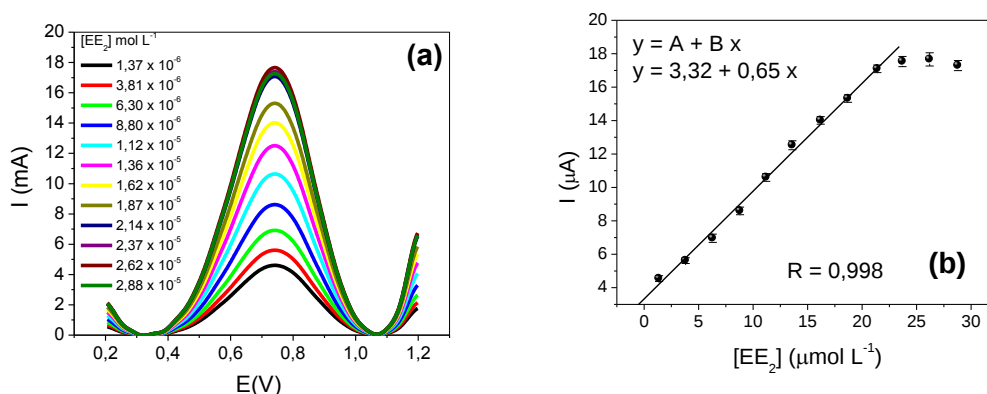
Figura 23- Espectros de UV-Vis do filme LbL $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ após imersão por 1 minuto em solução de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7, 8 e 10.



No entanto, depois de confirmado o processo de lixiviação do eletrodo $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ em pH básico (Figura 23), determinou-se o pH 7 para dar continuidade aos demais estudos eletroquímicos deste sensor, pois neste valor de pH obteve-se um incremento nos valores de corrente ($I_{pa} = 17,21 \mu\text{A}$) e potencial de oxidação ($E_{pa} = 0,74 \text{ V}$) do EE2 com relação aos demais pH testados.

Para verificar a dependência da resposta eletroquímica do eletrodo $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ em função da quantidade de EE2, foram realizados ensaios variando a concentração deste analito numa faixa de $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A partir dos voltamogramas de pulso diferenciais obtidos, as intensidades de corrente de pico anódico foram registradas em função da concentração de EE2, com os voltamogramas resultantes apresentados na Figura 24 (a).

Figura 24-(a) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de diferentes concentrações de EE2 $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) Curva analítica para EE2 em NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 e nos parâmetros ($E_{\text{pulse}} = 0,002\text{V}$) ($t_{\text{pulse}} = 0,10\text{s}$) e ($v = 50 \text{ mV}$).



Observa-se nos voltamogramas da Figura 24 (a) o aumento das intensidades das correntes de pico anódico em função da concentração de EE2, sem o deslocamento dos potenciais de pico ($E_{\text{pa}} = 0,74 \text{ V}$). Os valores de concentração do EE2 e correntes de pico de oxidação do filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de concentração de EE2 e correntes de pico anódica (I_{pa}) obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$.

Nº de medidas	[EE2] mol L^{-1}	$I_{\text{pa}}(\mu\text{A})$ n=3
1	$1,37 \times 10^{-6}$	$4,54 \pm 0,30$
2	$3,81 \times 10^{-6}$	$5,62 \pm 0,30$
3	$6,30 \times 10^{-6}$	$6,96 \pm 0,43$
4	$8,80 \times 10^{-6}$	$8,59 \pm 0,39$
5	$1,12 \times 10^{-5}$	$10,60 \pm 0,40$
6	$1,36 \times 10^{-5}$	$12,52 \pm 0,46$
7	$1,62 \times 10^{-5}$	$14,01 \pm 0,39$
8	$1,87 \times 10^{-5}$	$15,32 \pm 0,39$
9	$2,14 \times 10^{-5}$	$17,10 \pm 0,39$
10	$2,37 \times 10^{-5}$	$17,53 \pm 0,53$
11	$2,62 \times 10^{-5}$	$17,66 \pm 0,69$
12	$2,88 \times 10^{-5}$	$17,29 \pm 0,53$

Fonte: A autora

Analizando os valores da Tabela 13, verificou-se que há uma relação linear entre os valores de concentração de EE2 e as correntes de pico anódicos na faixa de concentração de

$1,37 \times 10^{-6}$ a $2,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 24 (b)) com um valor de coeficiente angular da reta da curva analítica de 0,998. Em valores maiores que $2,14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ há uma estabilidade no valor de corrente de pico oxidação com o aumento da concentração. Provavelmente isso ocorre devido a baixa solubilidade do EE2, que em meio aquoso é de $4,8 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,62 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (NAGPAL e MEAYS, 2009). No entanto como a solução de EE2 é preparada em acetonitrila, isso possibilita maior solubilidade do hormônio, ultrapassando o valor de $1,62 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, tendo em vista que em acetonitrila a solubilidade do EE2 é superior do que em água.

A partir dos dados obtidos da curva analítica foram calculados os valores de sensibilidade de $0,65 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($6,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), limite de detecção (LD) ($1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e limite de quantificação (LQ) ($3,68 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). O LD e o LQ foram obtidos através da relação entre a o desvio padrão de valores de correntes registrados nos voltamogramas de 10 brancos com os valores do coeficiente angular da curva analítica. A partir disso, calculou-se o LD para EE2, com a Equação 1, e o LQ com a Equação 2.

$$LD = \frac{3X}{b} \quad [1] \qquad LQ = \frac{10X}{b} \quad [2]$$

Ao comparar nossos resultados com os reportados de EE2 (LD = $1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ = $3,68 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na literatura (SCHIAVINI et al. 2011; SANTOS, K. et al. 2010) (Tabela 12), percebe-se que se encontram na faixa de valores de LD ($10^{-4} - 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e LQ ($10^{-5} - 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Também pode ser observado dos demais trabalhos para os hormônios estrogênicos com diferentes eletrodos testados, que o Epa do EE2 por nós obtido (0,74 V) é abaixo do encontrado para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) (BATISTA et al. 2011) e igual ao ECV modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) incorporado com NpPt (ECV/NTCPM-NpPt) (LIN e LI, 2006). Este fato mostra que nosso eletrodo é versátil, pois requer menor quantidade de amostra, além de permitir o ajuste de uma fina camada de material na arquitetura do filme.

Tabela 14 – Valores de LD e LQ encontrados na literatura para os hormônios estrogênicos obtidos com diferentes eletrodos modificados.

Eletrodos	Eletrólito suporte	Epa (V)	Hormônio	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	Referência
FTO (AH/Pt-iPy ⁺ Cl ⁻) ₃	NaH ₂ PO ₄ (pH = 7)	0,74 (vs Ag/AgCl)	EE2	1,06 x 10 ⁻⁶	3,52 x 10 ⁻⁶	Neste trabalho
ECV (NTCPM-NpPt)	Tampão PBS (pH= 7)	0,43 (vs SCE)	E2	1,8 x10 ⁻⁷	—	LIN & LI, 2006
ECV (NTCPM-NpPt)	Tampão PBS (pH= 7)	0,65 (vs SCE)	E1	8,4 x10 ⁻⁷	—	LIN & LI, 2006
ECV (NTCPM-NpPt)	Tampão PBS (pH= 7)	0,7 (vs SCE)	E3	6,2 x10 ⁻⁷	—	LIN & LI, 2006
DDB	NaOH (pH= 12)	0,3 (vs Ag/AgCl)	E3	1,7 x10 ⁻⁷	8,5 X 10 ⁻⁷	SANTOS, K. et al. 2010
ECV Nps-Pt	KCl (pH= 7)	0,5 (vs SCE)	E2	1,6 x 10 ⁻⁸	—	YUAN et al. 2011
ECV MWCNTs	H ₂ SO ₄ (pH= 2)	0,72 (vs Ag/AgCl)	EE2	3,4 x10 ⁻¹⁴	—	MARTÍNEZ et al. 2012

Fonte: A autora

Os filmes de LbL apresentaram durabilidade satisfatória. Nenhuma alteração significativa foi observada entre as respostas voltamétricas de um filme recém-preparado e do mesmo filme submetido às condições da análise por VPD durante um dia inteiro, podendo ser empregado nas análises durante uma semana, sem queda significativa da resposta eletroquímica.

5.6 Espectroscopia de Impedância eletroquímica dos filmes LbL

Visando investigar as propriedades de transferência de elétrons na superfície dos eletrodos de FTO, filme *drop-coated* de AH, filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻, filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃, foi empregada a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O uso desta técnica é baseado no fato de que a EIE é uma ferramenta eficaz para monitorar a interação entre analitos e a superfície do eletrodo. A formação de bicamadas perturba a dupla camada carregada na interface eletrodo/eletrólito. Esta mudança afeta a capacitância e a transferência de elétrons nesta interface (FERREIRA et al. 2010).

A Figura 25 (a) mostra os diagramas de Nyquist obtidos em potencial de circuito aberto, na presença da molécula prova, $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvida em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , pH 7, para os filmes preparados e para o eletrodo sem modificação, FTO. A representação da variação da impedância de um sistema eletroquímico, na forma do diagrama de Nyquist traz informações importantes a respeito das alterações da interface em eletrodos modificados. Em altas frequências podem-se obter informações sobre o processo de transferência de elétrons limitada por ativação, já em baixas frequências pode-se observar a influência dos processos difusionais na velocidade do processo de transferência de elétrons (DARAIN et al. 2004). Os valores de resistência de transferência de carga (R_2) e capacitância (C_1) para os eletrodos testados são sumarizados na Tabela 15.

Figura 25- Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para **(a)** os eletrodos FTO, *drop-coated* de AH, *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, LbL de $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ **(b)** os eletrodos FTO, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ na presença de $3,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. Utilizou-se solução de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.

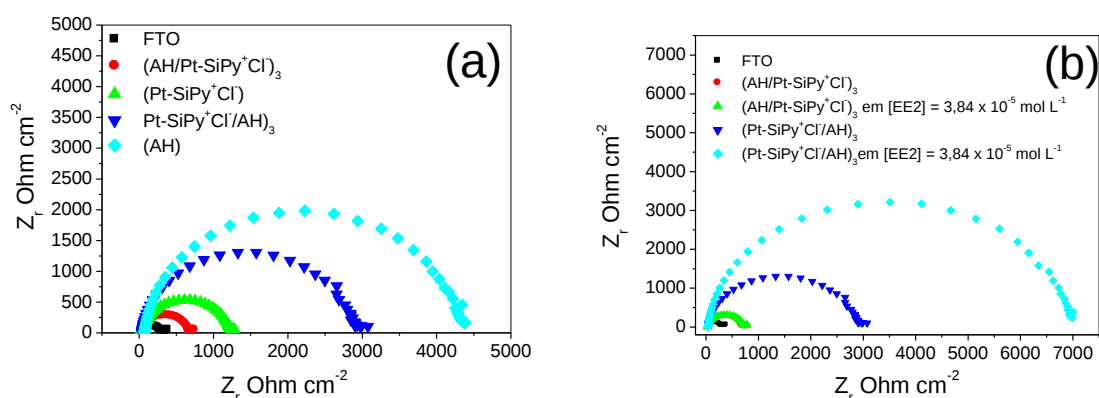


Tabela 15- Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa ZView a partir dos semicírculos obtidos com os eletrodos FTO, AH, $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.

ELETRODO	$R_2(\Omega)$	$C_1 \text{ (F)}$
FTO	$2,789 \times 10^2$	$6,169 \times 10^{-6}$
AH	$4,445 \times 10^3$	$6,652 \times 10^{-6}$
$\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	$1,236 \times 10^3$	$7,012 \times 10^{-6}$
$(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	$6,972 \times 10^2$	$7,962 \times 10^{-6}$
$(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$	$2,872 \times 10^3$	$5,126 \times 10^{-6}$

Fonte: A autora

Verifica-se nos diagramas de Nyquist da Figura 25 (a), que a modificação do eletrodo FTO com os polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, leva ao aumento no valor de R_2 que passa de $2,789 \times 10^2 \, \Omega \, \text{cm}^{-2}$ (FTO) a $6,972 \times 10^2$ e $2,872 \times 10^3 \, \Omega \, \text{cm}^{-2}$ para os filmes LbL $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$, respectivamente, na deposição das três primeiras bicamadas.

Os maiores valores de R_2 observados nos filmes LbL em relação ao eletrodo FTO, podem ser explicados pela deposição dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, que por aumentarem a disponibilidade de espécies químicas sobre a superfície do FTO, aumentam também a resistência de transferência de carga observada. Diversos trabalhos da literatura reportam pesquisas onde filmes utilizados como sensores apresentam maiores valores de R_2 que o eletrodo sem modificação, devido ao processo de deposição (CANELLAS et al. 2000; PEÑA-MÉNDEZ et al. 2005)

Yuan et al. (2011), observaram que a deposição de ácido 6-mercaptonicotínico e Nps-Pt propiciou um aumento no valor de R_2 em relação ao eletrodo de carbono vítreo sem modificação. No entanto, o processo de construção do filme foi fundamental para determinação do hormônio 17β -estradiol obtendo-se um excelente valor de limite de detecção igual a $1,6 \times 10^{-8} \, \text{mol L}^{-1}$ atribuído à presença de Nps-Pt no filme. Em trabalho semelhante, Im et al. (2010), também constataram que embora a deposição de polieletrólitos contendo grupos tióis e carboxílicos aumentaram os valores de R_2 em relação ao eletrodo de ouro, a presença dos polieletrólitos sobre a superfície do ouro foi essencial para o processo de detecção de 17β -estradiol obtendo-se um limite de detecção na faixa de $10^{-6} \, \text{mol L}^{-1}$.

Dentre os filmes LbL, o aumento no valor de R_2 é mais pronunciado no filme contendo AH na parte externa $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ que apresentou um valor de R_2 igual a $2,872 \times 10^3 \, \Omega \, \text{cm}^{-2}$. Este valor é cerca de 4,12 vezes maior que o valor observado com o filme contendo as Nps-Pt na parte externa $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ ($R_2 = 6,972 \times 10^2 \, \Omega \, \text{cm}^{-2}$). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos pelas técnicas voltamétricas, onde observou-se que o filme contendo AH na parte externa se mostrou mais resistivo (Figura 15 (b)). É possível que a presença de Nps-Pt na parte externa do filme propicie um auxílio na transferência de carga do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na superfície do filme, num processo conhecido como salto eletrônico, do inglês *Electron Hopping* (LAURENT e SCHLENOFF, 1997; CRESPILO et al. 2006), demonstrando uma menor resistência ($R_2 = 6,972 \times 10^2 \, \Omega \, \text{cm}^{-2}$).

Além disso, verifica-se que entre os filmes *drop-coated*, o que apresentou maior valor de R_2 foi o filme contendo apenas AH ($R_2 = 4,445 \times 10^3$). O valor de R_2 verificado para o

filme *drop-coated* contendo apenas $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ é cerca de 3,6 vezes menor ($R_2 = 1,236 \times 10^3$) do que verificado com o filme *drop-coated* contendo AH. Isto nos indica que as Nps-Pt incorporadas no SiPy^+Cl^- auxiliam no processo de transferência de elétrons na superfície eletródica.

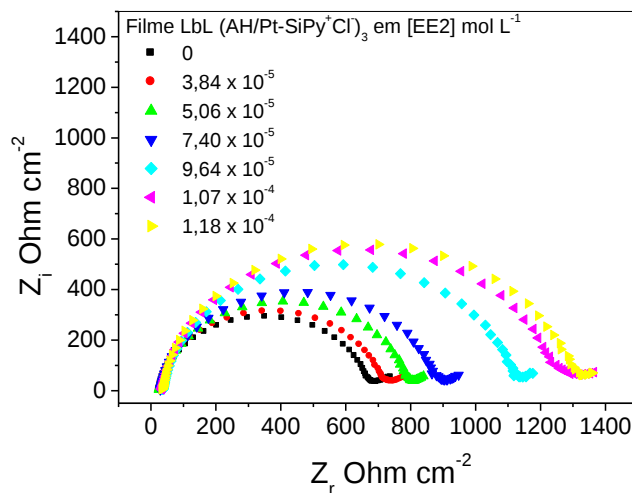
Quando se tem AH na parte externa, o grande número de grupos orgânicos presentes na estrutura deste polieletrólito, pode bloquear o acesso do elétron até as Nps-Pt decorrente da interação do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com a superfície do filme, o que leva a um aumento no valor do R_2 ($2,872 \times 10^3 \Omega \text{ cm}^{-2}$). A interação de íons Fe (III) e Fe (II) com as estruturas do AH é conhecida na literatura. Em função das características estruturais das substâncias húmicas, existem algumas possibilidades de ligação com este metal. A ligação pode ocorrer como quelante entre grupos carboxila e hidroxilas fenólicas; quelação entre dois grupos carboxila ou complexação com o grupo carboxila (MANAHAN, S. 1991).

Na Figura 25 (b) pode-se comparar os diagramas de Nyquist obtidos com os filmes LbL $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ na presença de uma concentração fixa de EE2 ($3,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). É possível constatar que a interação da superfície dos filmes com o hormônio EE2, propicia um aumento no valor da resistência de transferência de carga proveniente do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Novamente, verifica-se que para o filme contendo AH na parte externa, o aumento do R_2 é mais pronunciado ($6,945 \times 10^3 \Omega \text{ cm}^{-2}$) o que indica forte interação entre o AH da superfície eletródica com o EE2 e bloqueio das Nps-Pt incorporadas no SiPy^+Cl^- . Estes resultados podem explicar os menores valores de correntes faradaicas observadas nos resultados obtidos com voltametria por pulso diferencial (Figura 18) encontrados com o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ em relação ao filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$.

Desta forma, a escolha pelo filme contendo Nps-Pt na parte externa $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ como um sensor eletroquímico, novamente é justificada, já que possivelmente ocorre uma significativa adsorção do EE2 na superfície do filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$. No entanto, até mesmo com o filme LbL $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, onde observou-se menor valor de R_2 na presença de EE2, verifica-se um aumento nos valores de R_2 , com o aumento da concentração do hormônio EE2, como mostrado na Figura 26.

O comportamento observado pode ser explicado pelo fato de que um aumento na concentração de EE2 leva a uma diminuição da transferência de carga proveniente do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Quanto maior a concentração de EE2 maior o bloqueio na superfície do eletrodo o que aumenta os valores de R_2 .

Figura 26- Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de EE2. Utilizou-se solução de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.



Os valores de R2 e C1 para o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de EE2 é mostrado na Tabela 16.

Tabela 16- Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa ZView a partir dos semicírculos obtidos com o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de EE2 e na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.

[EE2] em mol L ⁻¹	R2(Ω)	C1 (F)
0	6,455x10 ²	8,597x10 ⁻⁶
3,84 x 10 ⁻⁵	6,97x10 ²	7,962x10 ⁻⁶
5,06 x 10 ⁻⁵	7,802x10 ²	8,643x10 ⁻⁶
7,40 x 10 ⁻⁵	8,503x10 ²	7,931x10 ⁻⁶
9,64 x 10 ⁻⁵	1,082x10 ³	9,211x10 ⁻⁵
1,07 x 10 ⁻⁴	1,215x10 ³	6,72x10 ⁻⁶
1,18 x 10 ⁻⁴	1,265x10 ³	7,880x10 ⁻⁶

Fonte: A autora

A escolha do filme contendo 3 bicamadas nos estudos eletroquímicos para determinação do hormônio EE2, também pode ser justificada por EIE (Figura 26), pois verificou-se que um aumento no número de bicamadas proporcionou um aumento na resistência de transferência de carga decorrente ao maior número de espécies eletroquímicas disponibilizadas pelo processo de deposição. Este aumento nos valores de R2 com o número de bicamadas é ilustrado na Figura 27 e os valores de R2 e C1 para os filmes contendo 3, 6 e 10 bicamadas de (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n são mostrados na Tabela 17.

Figura 27- (a) Representação Nyquist para os filmes LbL, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz.

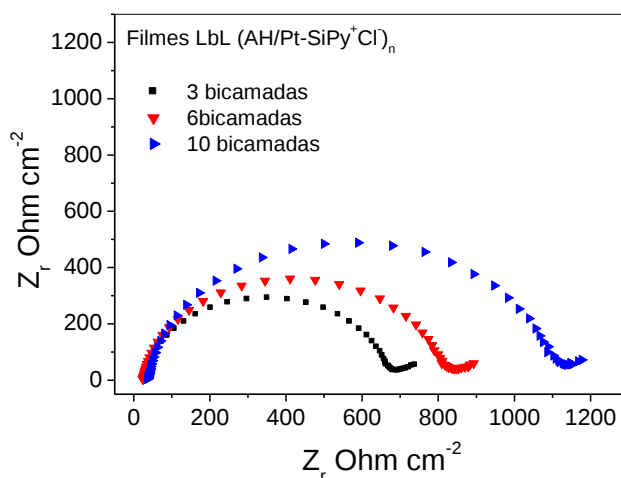


Tabela 17- Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa ZView a partir dos semicírculos obtidos com os filmes (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7.

Eletrodo	R2(Ω)	C1 (F)
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	6,972x10 ²	7,962 x10 ⁻⁶
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₆	8,673 x10 ²	5,645x10 ⁻⁴
(AH/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁₀	1,076x10 ³	9,262x10 ⁻³

Fonte: A autora

É possível verificar que à medida que o número de bicamadas aumenta, o valor de R2 aumenta gradativamente passando de 6,972x10² Ω cm⁻² no (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para 8,673 x10² Ω cm⁻² no filme LbL contendo 6 bicamadas (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e para 1,076x10³ Ω cm⁻² no filme LbL contendo 10 bicamadas (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ (Figura 27).

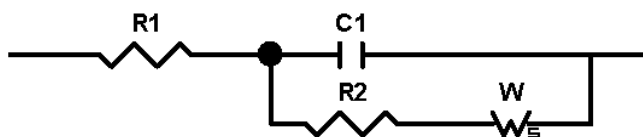
A maior quantidade de espécies químicas presentes nos filmes contendo mais bicamadas dificulta o acesso por difusão na superfície do eletrodo. Estes resultados corroboram com o que foi observado nas imagens de AFM (Figura 15), onde se verificou que os filmes com menos bicamadas mostraram maior homogeneidade com uma menor rugosidade decorrente a melhor distribuição das espécies na superfície do FTO. Também pode explicar as melhores respostas eletroquímicas observadas com o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na determinação do EE2. Este filme exibiu maiores valores de corrente de oxidação para EE2 (I_{pa} = 17,26 μA), em relação aos demais filmes contendo mais bicamadas, que se mostraram menos sensíveis (Figura 27).

Embora o filme contendo 3 bicamadas de $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ tenha se mostrado levemente mais resistivo que o FTO (Figura 26 (b)), os resultados eletroquímicos de voltametria, indicaram que a presença dos precursores AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ no filme, forneceu um incremento na corrente de oxidação da EE2 em cerca de $8,32 \mu\text{A}$, num potencial de 360 mV menos positivo, em relação ao eletrodo FTO ($I_{pa} = 8,97 \mu\text{A}$). Isto nos mostra a importância da modificação do eletrodo.

A análise dos valores de C1 observados na Tabela 16 nos permite verificar um pequeno aumento no valor de C com o aumento no número de bicamadas que passa de $7,962 \times 10^{-6} \text{ F}$ no filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ para $5,645 \times 10^{-4} \text{ F}$ no filme $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e $9,262 \times 10^{-3} \text{ F}$ no filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$. Os valores de C1 obtidos nos mostram que com o aumento da quantidade de espécies na superfície do FTO, aumenta-se também a capacidade do filme em agir como um meio onde se permite o alinhamento de íons (polarização do dielétrico).

A impedância de Warburg (W), analisada as baixas frequências, também é observada nos diagramas de Nyquist obtidos neste estudo. O fator W é representado por uma região linear a 45° do eixo real na representação de Nyquist (BARSOUKOV & MACDONALD, 2005) e está relacionado ao limite difusional da espécie eletroativa $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ presente na superfície dos filmes LbL. Desta forma, a partir dos diagramas de Nyquist obtidos, o modelo de circuito equivalente proposto se encontra na Figura 28.

Figura 28- Circuito equivalente proposto para os diagramas de Nyquist obtidos nos estudos utilizando os eletrodos FTO, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$, $(\text{AH}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_3$ na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvido em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , pH 7.



Este circuito contém a resistência do eletrólito ($R1$), um capacitor referente à dupla camada elétrica ($C1$), a resistência de transferência de carga ($R2$) e uma componente difusional W. Este modelo de circuito equivalente tem sido aplicado em vários trabalhos visando a investigação de processos existentes na superfície de filmes LbL (VYAS e WANG, 2010) Por exemplo, Vyas et al. (2010), investigando a condutividade de polímeros em filmes finos, atribuíram este mesmo circuito equivalente para o filme LbL $(\text{PPV}/\text{PSS})_3$ formado por poli (estireno sulfonado) (PSS) e poli (p-fenilenovinileno) depositados sobre eletrodo de ouro.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que a deposição alternada do ácido húmico como poliânion natural e do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ como um polycation sintético em diferentes substratos sólidos foi possível em função das diversas densidades de carga na cadeia destes polieletrólitos fracos e totalmente carregados nos valores de pH empregados (pH 7,9 para o AH e pH 2,9 o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$). A constatação da presença dos grupos ionizáveis foi confirmada pelo valor negativo de potencial zeta encontrado para o AH (-53 mV) que indicou a presença de grupos negativos na estrutura desta macromolécula. Pode estar havendo interação entre esses grupos negativos e os grupos positivos dos anéis piridínicos do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, cujo potencial zeta encontrado é de 173,33 mV.

A modificação da superfície do eletrodo pelo processo de automontagem por camadas alternadas foi um procedimento muito simples e rápido, viabilizando o preparo diário dos filmes LbL contendo AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Mesmo se tratando de moléculas de natureza complexas, a deposição do filme ocorreu independente do tipo do substrato, do tamanho e de sua topologia. A constatação da presença destes polieletrólitos nos filmes LbL construídos nas arquiteturas moleculares $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, foi obtida primeiramente por medidas de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Verificou-se que houve crescimento dos filmes formados pela deposição alternadas dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. No entanto, o crescimento foi mais linear para a arquitetura $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ devido à duas suposições, ou à interação mais efetiva entre o AH e o substrato do que a observada entre o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e o substrato, ou devido ao AH proporcionar mais cargas negativas para a interação do anel piridínio do SiPy^+Cl^- . Estas interações, grande parte eletrostática, são confirmadas pelos deslocamentos das bandas nos espectros de UV-Vis dos polieletrólitos depositados nos filmes LbL em relação às soluções.

A presença dos polieletrólitos AH e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ nos filmes LbL também foi confirmada por medidas de FTIR e Raman, onde observou-se nos espectros dos filmes, as principais bandas de absorção dos precursores e o desaparecimento de algumas bandas em função da presença das NPs-Pt nas cavidades do SiPy^+Cl^- . Verifica-se também que as bandas são mais intensas e definidas nos espectros do filme $(\text{AH/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ em relação ao filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_{30}$. Esta observação corrobora os resultados de UV-Vis, que mostraram que na arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, a partir de 12 bicamadas não há crescimento linear da absorbância em função do número de bicamadas.

As imagens de AFM revelaram um crescimento mais linear entre o número de bicamadas e a rugosidade de superfície para o filme LbL (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀. Isto indica que a quantidade de material depositada pode influenciar diretamente nos fenômenos de superfície como a quantidade de sítios ativos. A constatação da espessura média de cada bicamada em 2,6 nm mostra que os filmes são homogêneos e confirma a sua natureza nanoestruturada, com algum grau de interpenetração entre os polieletrólitos devido à natureza complexa do AH.

As medidas eletroquímicas indicaram as melhores respostas utilizando-se a voltametria por pulso diferencial. Dos sensores investigados, verificou-se melhores respostas na oxidação do EE2, utilizando o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Este eletrodo demonstrou eletrocatalise superior para a oxidação do EE2 (6,25 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) com correntes de oxidação mais intensas (I_{pa} = 17,26 µA) e baixos valores de potencial de pico (E_{pa} = 0,74 V) em relação ao substrato sem modificação, FTO (I_{pa} = 8,97 µA) com E_{pa} = 1,1 V). A sequência de deposição influenciou na intensidade da corrente de oxidação do EE2. Verificou-se que a intensidade de corrente de oxidação obtida com o filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ é maior (I_{pa} = 17,26 µA) do que para o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/AH)₃ (I_{pa} = 14,07 µA), fato que pode ser atribuído a presença das NPs-Pt que por estarem diretamente em contato com a solução de EE2, facilitam o processo de transferência de elétrons. Ao contrário, a presença de AH na parte externa, minimiza a capacidade das NPs-Pt em atuarem como mediadoras de elétrons na oxidação do EE2. Diferente do nosso filme, os melhores resultados eletroquímicos relatados na literatura são para filmes LbL com AH na parte externa, o que nos mostra que a natureza do polycation empregado é essencial na resposta eletroquímica.

Os parâmetros experimentais otimizados na determinação de EE2 foram o eletrodo (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ no eletrólito suporte NaH₂PO₄, 0,1 mol L⁻¹ em pH 7. Além disso, o aspecto da curva corrente-potencial obtida para a oxidação do EE2 em intervalos de potencial de 0 a 1,6 V é semelhante ao descrito para outros estrogênios em condições experimentais similares.

A espectroscopia de impedância eletroquímica indicou um aumento na resistência de transferência de carga com o aumento no número de bicamadas do filme (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n. Além disso, a análise dos diagramas de Nyquist nos revelou a grande contribuição da presença do AH na arquitetura do filme para aumentar a resistência de transferência de carga. Constatou-se que a interação da superfície dos filmes com o hormônio EE2, propiciou um aumento no valor de R₂ resistência proveniente do K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆].

Baseado no aumento da intensidade de pico obtidos nos espectros de UV-Vis, deslocamentos das bandas nas medidas de FTIR, o aumento do valor da corrente de pico proporcionado pela presença do AH e NPs-Pt nos filmes (AH/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, e diminuição da

resistência de transferência de carga, pode ser explicado pelo fato desta macromolécula ser constituída por grande quantidade de grupos funcionais como COOH, OH-fenólicos, OH-enólicos, OH-alcoólicos, C=O de quinonas e hidroxiquinonas, e cetonas, os quais disponibilizam maior número de sítios para ocorrerem as interações com o grupo piridínio do SiPy^+Cl^- . Diferente disto, quando se tem um filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{AH})_n$, a presença da grande macromolécula tende a bloquear a transferência de elétrons do analito até a superfície eletródica.

De uma forma geral, pode concluir que os resultados obtidos nesta dissertação atenderam a perspectiva de construção de um sensor eletroquímico contendo a macromolécula natural AH e o híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ para determinação do hormônio EE2. Isto pode ser firmado pelos resultados obtidos como a sensibilidade ($0,68 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{LD} = 1,06 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ igual a $3,52 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, estes resultados levam a uma perspectiva futura de aplicação deste sensor eletroquímico na determinação de estrogênios em amostras farmacêuticas e ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMI, R. F. V. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n° 5, p. 813-817, 2004.

ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. Uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n° 5, p. 1005-1014, 2007.

ALESSIO, P. **Sensores para sistemas líquidos diluídos combinando Raman amplificado em superfície (SERS) e língua eletrônica**. 168 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2012.

AMIR, S.; JOURAIPHY, A.; MEDDICH, A.; EL GHAROUS, M.; WINTERTON, P.; HAFIDI, M. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 524–529, 2010.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications. Second Edition, John Wiley& Sons, Inc., **Hoboken**, New Jersey, 2005.

BATISTA, R. C.; CORDEIRO, R.C.; MANZANIC, S.; SILVA, I. A.; ANGNES, L.; GILA, E. S. Remediação eletroquímica do 17 α -etinilestradiol sob diferentes regimes de agitação e força eletromotriz. **3rd International Workshop | Advances in Cleaner Production**. São Paulo – Brazil – May 18th-20nd – 2011.

BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; GALLAS, M. R. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, p. 1926-1933, 2009.

BECKER, A. L.; JOHNSTON, A. P. R.; CARUSO, F. Peptide nucleic acid films and capsules: assembly and enzymatic degradation. **Macromolecules Bioscience**, v.10, p. 488–495, 2010.

BERTRAND, P.; JONAS, A.; LASCHEWSKY, A.; LEGRAS, R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. **Macromolecules Rapid Communications**, v. 21, p. 319–348, 2000.

BILA, M. D.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n° 4, p. 523-530, 2003.

BILA, M. D.; DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências. **Química Nova**, v. 30, p. 651-666, 2007.

CAI, K.; RECHTENBACH, A.; HAO, J.; BOSSERT, J. ; JANDT, K. D. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. **Biomaterials**, v. 26, p. 5960–5971, 2005.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; MORAES, A. A.; RUMJANEK, V. M., OLIVARES, F. L. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Metodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN 13C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura⁽¹⁾. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 24, p. 741-750, 2000.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n°6, p. 964-969, 2004.

CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; SIQUEIRA, JR, J. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; NART, F. C.; OLIVEIRA, JR, O. N. Immobilization of Humic Acid in Nanostructured Layer-by-Layer Films for Sensing Applications. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5385-5389, 2005.

CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA Jr, O. N.; NART, F. C. Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 194-214, 2006.

CRESPILHO, F. N.; LOST, R. M. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p. 1-10, 2012.

DARAIN, F.; PARK, D. D.; PARK, J. S.; SHIM, Y. B. Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v.19, n°10, p. 1245–1252, 2004.

DHAMODHARAN, R.; MCCARTHY, T. J. Adsorption of alginic acid and chondroitin sulfate-A to amine functionality introduced on polychlorotrifluoroethylene and glass surfaces. **Macromolecules**, v. 32, p. 4106–4112, 1999.

DURAN, N.; CAPPARELLI, M.; L.H.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Artliber**, 1ª ed., p.131, São Paulo, 2006.

DURIGAN, M. A. B.; VAZ S. R.; ZAMORA, P. P. Degradação de poluentes emergentes por processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 35, n° 7, p. 1381-1387, 2012.

DECHER, G.; LVOV, Y.; SCHMITT J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films. **Thin Solid Films**, v. 244, p.772-777, 1994.

DECHER, G.; LEHR, B.; LOWACK, K.; LVOV, Y.; SCHMITT, J. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. **Biosensors Bioelectronics**. v. 9, p. 677–684, 1994.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v.277, p.1232-1237,1997.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J.B. **Multilayer Thin Films Sequential Assembly of Nanocomposite Materials**. 1. ed. Boschstr: Wiley-VCH, 2012.

DOLLISHI, F. R.; FATELEY, W. G.; BENTLEY, F. F. **Characteristic Raman frequencies of organic compounds**. Wiley-Interscience, New York, 1974.

EIRAS, C.; PASSOS, I. N. G.; BRITO, A. C. F.; SANTOS Jr, J. R. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, V. 30, p. 1158-1162, 2007.

FARIAS, R. F.; AIROLDI, C. O uso de sílica gel organofuncionalizada como agente sequestrante para metais. **Química Nova**, v. 23, p. 88, 2000.

FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; ALMEIDA, C. A. P.; ESTEVES, V. I.; SIERRA, M. D.; GRASSI, M. T. Remoção dos hormônios 17β - estradiol e 17α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, v. 34, n° 9, p. 1526-1533, 2011.

FERREIRA D. C. M., MENDES, R. K., KUBOTA, L. T. Kinetic Studies of HRP Adsorption on ds-DNA Immobilized on Gold Electrode Surface by EIS and SPR. **Journal Brazil Chemical, Society**. v. 21, n° 9, p. 1648-1655, 2010.

FERREIRA, A. R. **Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e sedimentos retirados da baía de Guaratuba-PR e avaliação do nível de poluição ambiental**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FIALHO, L. L.; SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMÕES M. L.; MARTIN-NETO, L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. **Bioresource Technolog**, v. 101, p.1927–1934, 2010.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO Jr., R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 54, p. 06-16, 2010.

FUJIWARA, S.T.; GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, R. V. S. Adsorption of FeCl_3 , CuCl_2 and ZnCl_2 on silsesquioxane 3-n-propylpyridinium chloride polymer film adsorbed on Al_2O_3 coated silica gel. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, p. 135-141, 2001.

GALESKA, I.; HICKEY, F. MOUSSY, D. KREUTZER, F. Characterization and Biocompatibility Studies of Novel Humic Acids Based Films as Membrane Material for an Implantable Glucose Sensor. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1249–1255, 2001.

GASPAROTTO, L. H. S.; ZUCOLOTTTO, V.; OLIVEIRA, JR, O. N. Nanostructured Films Based on Carbon Nanotubes and Cobalt for the Electrocatalytic Reduction of H_2O_2 . **Electrochemical Solid-State Letters**, v. 14, p. 21-23, 2011.

GHISELLI, G. e JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, R. V. S.; ALFAYA, A. A. S. **Preparation process of 3-n-propylpyridiniumsilsequioxane bonded to a silsesquioxane structure**. Patent INPI N° PI9803053-1, 1998.

HANDKE, M.; KOWALEWSKA, A. Siloxane and silsesquioxane molecules-precursors for silicate materials. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 79, p. 749-757, 2011.

HU, G.; TANG, B.; MIN, X. Synthesis and characterization of alternated (humic acid/ Fe^{3+})_n multilayer film on alumina fiber. **Surface & Coatings Technology**, v. 206, p. 3586-3594, 2012.

IM, J.E.; HAN, J. A.; KIM, B. K.; HAN, J. H., PARK, T. S.; HWANG, S.; CHO, S. I.; LEE, W.Y.; KIM, Y. R. Electrochemical detection of estrogen hormone by immobilized estrogen receptor on Au electrode. **Surface & Coatings Technology**. v. 205, p. 5275-5278, 2010.

JESUS C. G.; SANTOS, V.; CANESTRARO, D. C.; ZUCOLOTTI, V.; FUJIWARA, S. T.; GUSHIKEM, Y.; WOHNATH, K.; PESSÔA, C. A. Silsesquioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors. **Journal Nanoscience Nanotechnology**, v.11, p. 3499–3508, 2011.

JESUS, C. G.; FORTE, C. M. S.; WOHNATH, K.; PESSÔA, C. A.; SOARES, J. S.; FUJIWARA, S. T.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Electroanalytical Performance of (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅LbL Film for Detecting Promethazine Hydrochloride. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1814–1820, 2011.

JESUS, H. C.; COSTA, E. A.; MENDONÇA, A. S. F.; ZANDONADE, E. Distribuição de Metais Pesados em Sedimentos do Sistema Estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, n° 3, p. 378-386, 2004.

JOHNSTON, A. P. R. READ, E. S.; CARUSO, F. DNA multilayer films on planar and colloidal supports: sequential assembly of like-charged polyelectrolytes. **Nano Letters**. v. 5, p. 953–956, 2005.

KIM, J. S.; GRÄNSTROM, M.; FRIEND, R. H, DAIK, R.; FEAST, W. J.; JOHANSSON, N.; SALANECK, W. J. CACIALLI, F. Indium-Tin Oxide Treatments for Single and Double-Layer Polymeric Light-Emitting Diodes: The relation between the anode physical, chemical and morphological properties and the device performance . **Journal Applied Physics**, v. 84, p. 6859-6870, 1998.

LAURENT, D.; SCHLENOFF, J. B. Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. **Langmuir**, v. 13, p. 1552-1557, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 4ª edição, 2007.

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A. Hormônios Estrogênicos no Ambiente e Eficiência das Tecnologias de Tratamento para Remoção em Água e Esgoto. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.13, n° 4, p.123-131, 2008.

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A. Estrogênios em águas naturais da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v.33, n° 3, p. 639-643, 2010.

LEVENT, A. Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 21, p. 114–119, 2012.

LIN, X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Ptnano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 253–259, 2006.

LIU, W. C, YANG, C. C, CHEN, W. C, DAI, B. T, TSAI, M. S. The structural transformation and properties of spin-on poly(silsesquioxane) films by thermal curing. **J Non-Cryst Solids**. v. 311, p. 233-240, 2002.

LUCHO, A. M. S.; PISSETTI, F. L.; GUSHIKEM, Y. Al₂O₃-coated 3-*N*-propylpyridinium chloride silsesquioxane polymer film: preparation and electrochemical property study of adsorbed cobalt tetrasulfophthalocyanine. **Journal Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 251-256, 2004.

MACHADO, K. S. **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-Pr**. 2010. 102 f. Dissertação (Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MANAHAN, S. E. In: **Environmental Chemistry**, Lewis Publishers, Michigan, 5ª ed, 1991, p. 62-63.

MARTINEZ, N. A.; PEREIRA, S. V.; BERTOLINO, F. A.; SCHNEIDER, R. J.; MESSINA, G. A. e RABA, J. Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. **Analitica Chimica Acta**, v. 723, p. 27-32, 2012.

MELO Jr., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n° 9, p. 1872-1878, 2012.

MCADAM, E. J.; BAGNALL, J. P., KOH, Y. K. K.; CHIU, T. Y.; POLLARD, S.; SCRIMSHAW, J. N. L.; CARTMELL, E. Removal of steroid estrogens in carbonaceous and nitrifying activated sludge processes. **Chemosphere**, v. 81, p. 1–6, 2010.

NAGPAL, N. K.; MEAYS, C. L. Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 α -ethinylestradiol (EE2). **Ministry of Environment Province of British Columbia**. Technical Appendix, 2009.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química Nova**, v.88, p.65-71, 2003.

PEÑA-MÉNDEZ, E. M.; HAVEL, J.; PATOCKA, J. Humic substances. Compounds of still unknown structure: Applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 3. p. 13-24, 2005.

PÉREZ, R. L.; ESCANDAR, G. M. Spectrofluorimetric study of estrogen–cyclodextrin inclusion complexes in aqueous systems. **Analyst**, v. 138, p. 1239–1248, 2013.

PESSOA, G. P.; SANTOS, A. B.; SOUZA N. C.; ALVES, J. A. C.; NASCIMENTO, R. F. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n° 5, p. 968-973, 2012.

PETRONI, S. L. G.; PIRES, F. M. A.; MUNITA, C. S. Adsorção de zinco e cádmio em colunas de turfas. **Química Nova**, v. 23, 477-481, 2000.

PICCOLO, A.; CONTE, P.; PATTI, A. F. O-Alkylation of a lignite humic acid by phase-transfer catalysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** v.384, p. 994–1001, 2006.

QUINTANA, J. B.; CARPINTEIRO, J.; RODRIGUEZ, I.; LORENZO, R. A.; CARRO A. M. CELA, R. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1056, p. 179–185, 2004.

RAIMUNDO, C. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 126f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Setembro, 2007.

REIF, R.; SUÁREZ, S.; OMIL, F.; LEMA, J. M. Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. **Desalination**, v. 221, p. 511–517, 2008.

REIS FILHO, R. W. F.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n° 4, p. 817-822, 2006.

REIS FILHO, R. W. F.; SANTOS, R. L.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **Journal Brazil Society Ecotoxicology**. v. 2, p. 283-288, 2007.

SANTOS, V.; JESUS, C. G.; SANTOS, M.; CANESTRARO, C. D.; ZUCOLOTTI, V.; FUJIWARA, S. T.; GARCIA, J. R.; PESSÔA, C. A.; WOHNATH, K. Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL Films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal Nanoparticles Research**, v.14, p.1081-1092, 2012.

SANTOS, V.; SANTOS, M.; SANDRINO, B.; JESUS, C. G.; GARCIA, J. R.; FUJIWARA, S. T.; PESSÔA, C. A.; WOHNATH, K. LbL film with PtNPs as a Sensor of the Dopamine Encapsulated in Liposomes. **ECS Transactions**, v. 50, n° 48, p. 37-43, 2013.

SANTOS, V.; SANTOS, M.; JESUS, C. G.; FUJIWARA, S. T.; GARCIA, J. R.; PESSOA, C. A.; WOHNATH, K. The Role of a Layer-by-Layer Film Containing Pt Nanoparticle on the Performance of a Glucose Enzymatic Biosensor. **International Journal Electrochemical Science**, V.8, p. 10601 – 10620, 2013.

SARGENTINI Jr., E.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. K. ; SANTOS, A.; Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, p. 339, 2001.

SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 4, p. 33-48, 2011.

SILVA, W. T. L.; THOBIE-GAUTIER, C.; REZENDE, M. O. O.; EL MURR, N. Electrochemical Behavior of Cu(II) on Carbon Paste Electrode Modified by Humic Acid, Cyclic Voltammetry Study. **Electroanalysis**, v. 14, n° 1, p.71-77, 2002.

SHIRATONI, S. S.; RUBNER, M. F. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. **Macromolecules**, v. 33, n° 11, p. 4213–4219, 2000.

SANTOS, K. S.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, p.1999–2006, 2010.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. 3-Dimensional Models for Humic Acids and Soil Organic Matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, n° 11, p. 487-498, 1995.

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS. Disponível em: < <http://www.iqsc.usp.br>> Acesso em: 06 jan. 2014.

TORRES, N. T.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P.; ANDRADE, G. C. R. M.; FREGUGLIA, R. M. O.; TORNISIELO, V. L. Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. **IOSR Journal Engineering**, v. 2, p. 984-989, 2012.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, p. 1837-1842, 2010.

VEGA, D.; AGÜÍ, L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, G.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, p. 1031–1038, 2007.

VYAS, R. N.; WANG, B. Electrochemical Analysis of Conducting Polymer Thin Films. **International Journal Molecule Science**. v. 11, n° 4, p.1956-1972, 2010.

VILLIERS, M. M.; OTTO, D. P.; STRYDOM, S. J.; LVOV, Y. M. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews**. n° 63, p. 701–715, 2011.

VOIGT, A.; LICHTENFELD, H.; SUKHORUKOV, G. B.; ZASTROW, H.; DONATH, E.; BÄUMLER, H. MÖHWALD, H. Membrane filtration for microencapsulation and microcapsules fabrication by layer-by-layer polyelectrolyte adsorption. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 4037–4043, 1999.

WANG, P.; LI, Y.; HUANG, X.; WANG, L. Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid. **Talanta**, v. 73, p. 431– 437, 2007.

WISE, A.; BRIEN, A.; WOODRUFF, T. Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water? **Environmental Science Technology**, v.45, n°1, p. 51-60, 2011.

YANG, Y. H.; WANG, T. Fourier transform Raman spectroscopic characterization of humic substances. **Vibrational Spectroscopy**, v. 14, p. 105-112, 1997.

YUAN, S.; PENG, D.; HU, X.; GONG, J. Bifunctional sensor of pentachlorophenol and copper ions based on nanostructured hybrid films of humic acid and exfoliated layered double hydroxide via a facile layer-by-layer assembly. **Analitica Chimica Acta**, v. 785, p. 34-42, 2013.

YUAN, L.; ZHANG, J.; ZHOU, P.; CHEN, J.; WANG, R.; WEN, T.; LI, Y.; ZHOU, X.; JIANG, H. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted membranes at platinum nanoparticles-modified electrode for determination of 17 β -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 29, p. 29-33, 2011.