



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN



ALYSON SANTOS DE MEDEIROS

**ELETROANÁLISE DO ESTROGÊNIO SINTÉTICO Z,Z-DIENESTROL EM
TILÁPIA-DO-NILO (*Sarotherodon niloticus*) UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

MOSSORÓ-RN

2018

ALYSON SANTOS DE MEDEIROS

ELETROANÁLISE DO ESTROGÊNIO SINTÉTICO Z,Z-DIENESTROL EM
TILÁPIA-DO-NILO (*Sarotherodon niloticus*) UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO

Dissertação apresentada à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais, na linha de pesquisa de Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mielle B. F. Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Suely S. L. Castro

MOSSORÓ-RN

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Catálogo da Publicação na Fonte.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

M488e Medeiros, Alyson Santos de
ELETROANÁLISE DO ESTROGÊNIO SINTÉTICO
Z,Z-DIENESTROL EM TILÁPIA-DO-NILO (*Sarotherodon
niloticus*) UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE
DOPADO COM BORO. / Alyson Santos de Medeiros. -
Mossoró-RN, 2018.
51p.

Orientador(a): Prof. Dr. Thiago Mielle Brito Ferreira
Oliveira.

Coorientador(a): Profa. Dra. Suely Souza Leal de
Castro.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-
Graduação em Ciências Naturais). Universidade do
Estado do Rio Grande do Norte.

1. Aquicultura. 2. Estrogênios sintéticos. 3. Z,Z-
Dienestrol. 4. Eletrodo de diamante dopado com boro. 5.
Determinação eletroanalítica.. I. Oliveira, Thiago Mielle
Brito Ferreira. II. Universidade do Estado do Rio Grande
do Norte. III. Título.

ALYSON SANTOS DE MEDEIROS

ELETROANÁLISE DO ESTROGÊNIO SINTÉTICO Z,Z-DIENESTROL EM
TILÁPIA-DO-NILO (*Sarotherodon niloticus*) UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO

Dissertação apresentada à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais, na linha de pesquisa de Tecnologias Ambientais.

Aprovado em: 18/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mielle B. F. Oliveira (UFCA)

Examinadora: Prof.^a Dr.^a Janete Jane Fernandes Alves (UERN)

Examinador: Prof.^a Dr.^a Cláudio Lopes de Vasconcelos (UERN)

Examinadora: Prof.^a Dr.^a Taísa Cristine de Moura Dantas (UFPI)

Dedico este mestrado, primeiramente, a Deus, por me abençoar no decorrer da minha carreira discente e profissional. Seu fôlego de vida em mim foi o sustento e deu-me coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades. À minha noiva, por me apoiar bastante nas horas em que necessito, estando ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, que ofereceram toda a força necessária à minha formação, me dando um suporte educacional e humano digno e extraordinário.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, minha mente e estar sempre ao meu lado; por ser o maior mestre que alguém já conheceu.

Aos meus pais, pois tudo que sou hoje é proveniente da educação que recebi deles. O meu pai, Luiz Neto, guerreiro e batalhador, sempre me ensinando a honrar e viver com dignidade. A minha mãe, Maria Aparecida, heroína do mundo real que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, sempre mostrando os caminhos corretos da vida.

À minha noiva, Wilyana Oliveira, por ter sido sempre o pilar da minha vida; por ter acalmado meu coração quando desesperei e achei que não iria conseguir; por me fortalecer sempre;

Ao professor e orientador Thiago Mielle e à professora coorientadora Suely Castro, por toda paciência e atenção destinada a mim; por todo conhecimento durante esses anos; por todo o companheirismo nos momentos de resolver os problemas; pela amizade e pelos conselhos; muito obrigado!

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. A palavra mestre nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais, sem nominar, terão os meus eternos agradecimentos.

À coordenação do PPGCN, por todo apoio durante o mestrado.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa do LEQA, por compartilharem conhecimento e me criticarem construtivamente quando necessário.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A aquicultura está entre as atividades econômicas que mais crescem em muitos países, particularmente no Brasil. Isso é uma consequência da constante e crescente procura por organismos aquáticos, tais como peixes, moluscos, crustáceos, répteis, entre outros, destinados para diferentes fins, principalmente, para a alimentação humana. Para atender estas demandas, muitos aquicultores fazem uso indiscriminado de estrogênios sintéticos, como é o caso do Z,Z-Dienestrol (DNL), com o intuito de induzir a reprodução acentuada dos organismos tratados, embora também sejam capazes de afetar o metabolismo dessas espécies e dos consumidores envolvidos na cadeia alimentar, mesmo em baixas concentrações. Tendo em vista a elevada demanda brasileira por Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*), tanto para o mercado interno quanto externo, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método eletroanalítico capaz de detectar baixos níveis de DNL na biomassa desta espécie, utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) como superfície de trabalho. Os resultados obtidos por voltametria cíclica indicaram que o estrogênio em estudo apresenta alta reatividade em meio ácido, mostrando um processo de oxidação irreversível sobre EDDB pré-ativado catodicamente. Os produtos da reação redox adsorvem sobre a área ativa do dispositivo, mas a elevada resistência à passivação do material eletrodico possibilita a renovação da superfície pela simples agitação mecânica do meio. Utilizando voltametria de onda quadrada sob condições otimizadas (EDDB pré-ativado catodicamente; solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) como eletrólito; 60 s de agitação entre as medidas; 150 Hz de frequência com incremento de 2 mV; e amplitude dos pulso de 30 mV), foi possível detectar traços de DNL (limite de detecção de $5,43 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) com alta correlação dos dados ($r^2 = 0,9987$), precisão e exatidão das medidas (desvio padrão relativo abaixo de 13,0 %). O método foi aplicado com êxito na eletroanálise de DNL em Tilápia-do-Nilo, após fortificação da biomassa ($5,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$ e $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e extração do conteúdo estrogênico pelo método *QuEChERS*. Os elevados valores de recuperação (88,5 - 96,2 %) atestam a credibilidade do método eletroanalítico proposto para o possível controle de qualidade de DNL em produtos da aquicultura.

Palavras chaves: Aquicultura; Estrogênios sintéticos; Z,Z-Dienestrol; Eletrodo de diamante dopado com boro; Determinação eletroanalítica.

ABSTRACT

Aquaculture is among the fastest growing economic activity in many countries, particularly in Brazil. This is a consequence of the constant and growing demand for aquatic organisms, such as fish, mollusks, crustaceans, reptiles, among others, which are destined for different purposes, mainly for human consumption. In order to meet these demands, many fish farmers make indiscriminate use of synthetic estrogens, such as Z,Z-Dienestrol (DNL), in order to induce high reproduction of the treated organisms, although they are also capable of affecting the metabolism of these species and other consumers in the food chain, even at low concentrations. Considering the high Brazilian demand for Nile Tilapia (*Sarotherodon niloticus*), both for the internal and external markets, this work aims to develop an electroanalytical method to detect trace concentrations of DNL in the biomass of these species, using boron-doped diamond electrode (BDDE) as working surface. The results obtained by cyclic voltammetry indicated high reactivity of the estrogen in acid medium, showing an irreversible oxidation process on cathodically pre-activated BDDE. The products of the redox reaction fouling the active area of the device, but the high resistance to the passivation of the electrodic material allows the renovation of the surface through simple mechanical agitation of the medium. Using square-wave voltammetry under optimized conditions (cathodically pre-activated BDDE; Britton-Robinson buffer solution (pH = 2.0) as electrolyte; 60 s of stirring between measurements; 150 Hz of frequency with 2 mV of increment; and 30 mV of pulse amplitude), it was possible analyzing DNL at low concentrations (detection limit of 5.43×10^{-8} mol L⁻¹) with high data correlation ($r^2 = 0.9987$), precision and accuracy of the measurements (relative standard deviation below 13.0%). The method was successfully applied for the electroanalysis of DNL in Nile Tilapia, after biomass spiking (5.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} and 9.0×10^{-6} mol L⁻¹) and extraction of the estrogenic content by the QuEChERS method. High recovery values were achieved (88.5 - 96.2%) and attested the credibility of the proposed electroanalytical method for the possible quality control of DNL in aquaculture products.

Key words: Aquaculture; Synthetic estrogens; Z,Z-Dienestrol; Boron-doped diamond electrode; Electroanalytical determination.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

DES – Dietilestilbestrol

SHBG – Síntese Hepática da Globulina de Ligação ao Hormônio Sexual

TBG – Globulina de Ligação à Tireoide

FSH – Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotropina

VC – Voltametria Cíclica

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

LDs – Limites de Detecção

SPR – Ressonância de Plasma de Superfície

CVD – Chemical Vapor Deposition

HPHT – High – Pressure/ High Temperature

DNL – Dienestrol

EDDB – Eletrodo Diamante Dopado com Boro

I_p – Corrente de Pico

E_p – Potenciais de Pico

LQ - Limites de Quantificação

DP - Desvio-Padrão

DPR – Desvio-Padrão Relativo

α – Amplitude

HEX – Hexestrol

VTG - Síntese da Proteína Vitelogenina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do estrogênio Z,Z-Dienestrol (DNL).	19
Figura 2 - Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada c) voltamograma obtido para um sistema reversível	20
Figura 3 - Representação Esquemática da voltametria de onda quadrada.	21
Figura 4 - Distribuição aleatória dos átomos de boro (bolas vermelhas) em um filme de diamante dopado (átomos de carbono – bolas pretas).	24
Figura 5 - Representação esquemática da célula eletroquímica.	27
Figura 6 - Etapas envolvidas no processo de extração do DNL da biomassa de Tilápia-do-Nilo (<i>Sarotherodon niloticus</i>) por meio do método QuEChERS.	31
Figura 7 - Comportamento eletroquímico de $K^3[Fe(CN)_6]$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, antes (em azul) e após (em preto) aplicar $-0,3 \text{ V}$ sobre EDDB por 30 s.	32
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, utilizando velocidades de varredura de 50 mV s^{-1} , em meio de solução-tampão Britton-Robinson ajustada a diferentes valores de pH.	34
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, empregando diferentes velocidades de varredura e utilizando solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) como eletrólito suporte.	35
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, empregando velocidades de varredura de 100 mV^{-1} e utilizando solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) como eletrólito suporte.	36
Figura 11 - Componentes de corrente da voltametria de onda quadrada obtidas na oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) e aplicando-se $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	37
Figura 12 - Efeito da frequência de aplicação dos pulsos (10–250 Hz) sobre as correntes e potenciais de pico observados para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)	

sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	38
Figura 13 - Efeito da amplitude dos pulsos de potencial (5–50 mV) sobre as correntes e potenciais de pico observados para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	39
Figura 14 - Efeito do incremento dos pulsos de potencial (2–7 mV) sobre as correntes e potenciais de pico observados para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	40
Figura 15 - (A) Voltamogramas de onda quadrada do DNL ($2,30 \times 10^{-7}$ a $9,69 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) registrados para a sua oxidação sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $f = 150$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Curva analítica obtida nas mesmas condições descritas em “A”......	41
Figura 16 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em experimentos de recuperação do DNL ($1,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $f = 150$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Curva analítica obtida pelo método da adição de padrão, seguindo os mesmo critérios descritos em “A”......	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Aquicultura	15
2.2. Utilização de hormônios na aquicultura	17
2.3. Z,Z-Dienestrol.....	18
2.4. Métodos eletroanalíticos	19
2.5. Determinação eletroanalítica de hormônios	21
2.6. Eletrodo de diamante dopado com boro	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Geral:	26
3.2. Específicos:	26
4. METODOLOGIA	27
4.1. Reagentes e soluções	27
4.2. Equipamentos.....	27
4.3. Limpeza e pré-ativação do eletrodo de trabalho	28
4.4. Comportamento redox do z,z-dienestrol.....	28
4.5. Curva analítica e figuras de mérito	29
4.6. Aplicação da metodologia	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Pré-tratamento catódico do eletrodo de trabalho	32
5.2. Efeito do pH sobre o processo redox do dienestrol	33
5.3. Efeito da velocidade de varredura sobre o processo redox do dienestrol.....	34
5.4. Otimização de parâmetros eletroanalíticos	36
5.5. Curva analítica e figuras de mérito	40
5.6. Aplicação do método	42
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura está entre as atividades primárias do agronegócio que mais crescem no mundo (PEGADO, 2004). No Brasil, esta tendência se constitui pelo enorme potencial socioeconômico e das excepcionais condições edafo-climáticas para este ramo, o que justifica seu crescimento exponencial nos últimos anos. Segundo estimativas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), no período 2003-2009, a taxa de crescimento anual do cultivo de animais em cativeiro vinha se destacando e atingindo a média de 4,6%, enquanto que aquela obtida com a pesca continental convencional chegava a 2,9% (FAO, 2010; ROCHA *et al*, 2013).

Na verdade, o país ainda está muito aquém de seu potencial produtivo e acredita-se que brevemente atingirá a marca de vinte milhões de toneladas de pescados ao ano, atendendo não apenas ao mercado consumidor interno, mas também a uma demanda externa crescente. Projeções da FAO apontam que, até 2030, a demanda por pescados no mundo deva crescer em quarenta milhões de toneladas (FAO, 2010).

Todavia, para atender a crescente demanda gastronômica por organismos marinhos (peixes, moluscos, crustáceos, répteis, anfíbios, plantas, entre outros), os aquicultores, em muitos casos, fazem uso indiscriminado de substâncias xenobióticas, a exemplo dos hormônios/estrogênios sintéticos (*Hexestrol*, *Dienestrol*, *Dietilestilbestrol*, entre outros), que induzem o crescimento e/ou reprodução acentuada das populações nos diferentes cultivos, mas que também afetam o metabolismo das espécies cultivadas, além de serem potencialmente tóxicos para os consumidores envolvidos na cadeia trófica (EDWARDS 2015; LIMA, 2012; OLIVEIRA 2013). A gravidade deste problema tem impulsionado debates científicos em todo o mundo com o propósito de buscar soluções ou medidas paliativas para esta questão.

As preocupações vão desde os riscos de desequilíbrio ambiental aos prejuízos com a saúde pública. Muitos desses compostos podem desregular as funções endócrinas dos seres vivos, sendo conhecidos como desreguladores ou disruptores endócrinos pois possuem a capacidade de simular ou inibir a atividade hormonal normal dos animais, incluindo os homens (HAITHAM, ABO-AL-ELA 2018). O sistema endócrino nos organismos é estimulado com baixas concentrações de hormônios, portanto apesar de encontrados em concentrações traços (ng/L) no meio ambiente, esses contaminantes

emergentes têm atraído a atenção da comunidade científica em virtude de tais concentrações já serem significativas, podendo causar efeitos adversos aos organismos expostos devido suas propriedades carcinogênicas e estrogênicas. Os estrogênios sintéticos apresentam caráter bioacumulador, biomagnificador e biotransformador, representando um sério risco à saúde daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar, ou seja, os humanos (OLIVEIRA, 2013; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

Vale ressaltar que a produção de peixes no Brasil é baseada, principalmente, em regimes intensivos e semi-intensivos, sustentada majoritariamente por pequenos produtores. Em ambos os casos, as culturas são desenvolvidas em tanques artesanais escavados, onde os animais são tratados com xenobióticos durante todo o período de cultivo (OSTRENSKY *et al.*, 2008). Por exemplo, existem métodos de prevenção de doenças que incluem a adição de antibióticos na ração dos animais e boa parte destes princípios ativos e de seus metabólitos são disseminados nas águas dos criadouros. Deste modo, outra grande preocupação ambiental está na toxicidade dos efluentes dessas atividades após serem lançados nos corpos receptores, em virtude da ausência de práticas de manejo e/ou tratamento adequadas (ISMAIL , WEE , ARIS 2017).

Os peixes são normalmente considerados como bons bioindicadores para avaliação dos efeitos de possíveis contaminações, por estarem localizados no topo da teia trófica aquática e por acumularem substâncias tóxicas, provenientes da água e também através de sua dieta, nos seus tecidos. Nos peixes, o fígado desempenha um papel importante nas funções vitais, como no metabolismo, transformação, acúmulo e excreção de contaminantes. Além disso, o órgão é responsável pelo metabolismo de proteínas e lipídeos, armazenamento e produção de glicose e outros nutrientes (BALULA, 2011).

O fígado dos peixes, assim como dos outros vertebrados, é a maior glândula do corpo, sendo responsável pela execução de muitas atividades vitais e pela fisiologia do animal. Está localizado na cavidade celomática e é basicamente formado por hepatócitos, células com alto potencial mitótico cuja função é de síntese, secreção, armazenamento, biotransformação e metabolismo (Costa et al. 2012). De forma geral, os hepatócitos realizam a metabolização de substâncias endógenas e exógenas, produção de bile, que posteriormente é direcionada para a vesícula biliar, produção de proteínas essenciais do plasma e fatores de coagulação e armazenamento de substâncias

como aminoácidos, lipídeos, glicogênio e ferro (Menke et al. 2011). Além disso, outro importante papel do fígado é que ele serve como indicador do estado nutricional e fisiológico dos peixes (Bombonato et al. 2007). Devido suas funções de metabolização como bioindicador de poluição ambiental nesta espécie. A partir da contextualização da relevância do fígado para utilização do mesmo como matriz das análises da espécie em questão tendo em vista que é um dos principais pontos que o material (estrogênios) fica concentrado é no fígado, pois é lá que ocorre a metabolização. Pode-se manusear outra parte do peixe como matriz, porém optamos por utilizar uma parte que não seria comestível, que não iria ser usado para consumo visando um reaproveitamento e/ou sustentabilidade de uma parte descartável do peixe.

O monitoramento desses compostos vem sendo feito por métodos espectroscópicos e/ou cromatográficos, apesar de apresentarem limitações quanto à sensibilidade, custo e tempo de análise (LIMA, 2012; BAHADIR, SEZGINTÜRK, 2015; GUEDES-ALONSO, SOSA-FERRERA e SANTANA-RODRÍGUEZ, 2017; PALI *et al.*, 2017). Para superar estas dificuldades, muitos pesquisadores têm utilizado diferentes métodos eletroanalíticos que, além de contornar os problemas supracitados, também apresentam possibilidade de miniaturização, simplicidade operacional e potencialidade para aplicações *in loco* (OLIVEIRA, 2013; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Sendo assim, com os avanços na área de materiais condutores, superfícies eletródicas cada vez mais eficientes e versáteis passaram a ser utilizadas em estudos eletroanalíticos, a exemplo do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) que, além de possuir excelente condutividade e resistência mecânica, também apresenta ampla faixa de potenciais de trabalho e baixa susceptibilidade à passivação da superfície ativa por produtos da reação redox (PORTELA, 2008).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aquicultura

Segundo Luchesse e Batalha (2003), a aquicultura pode ser definida uma produção que envolve a manipulação de organismos aquáticos (peixes, crustáceos, moluscos e algas) em alguma fase de seu ciclo de vida. O mercado global de produtos oriundos das atividades aquícolas tem mostrado expansão sem precedentes. Já em 2013, o consumo de pescados aproximou-se de 20 kg por habitante ao ano, com produção estimada em mais de 160 milhões de toneladas (ROCHA *et al.*, 2013; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

Tamanho crescimento tem elevado a aquicultura ao posto de maior negócio do setor primário do mundo, superando a produção anual de soja (duas vezes maior), gado (sete vezes maior) e frango (nove vezes maior) para abate. O Brasil é o segundo maior exportador do segmento aquícola, mas contribui com apenas 0,6% da produção mundial nesse setor; um número que vai de encontro ao forte potencial do país para o desenvolvimento de tais atividades (NADARAJAH, FLAATEN, 2017). Esse quadro também mostra a importância das políticas de incentivo para definir estratégias e oportunidades de negócio, gerando emprego e renda para a população, além de agregar valor às riquezas naturais do país, particularmente da Região Nordeste, onde este mercado cresce em ritmo acelerado (ROCHA *et al.*, 2013).

A aquicultura é responsável pela produção de peixes e outros recursos aquáticos, para fins variados. Embora o principal objetivo da piscicultura (criação de peixes) seja a comercialização de pescado como recurso alimentício (incluindo seus ovos), estes animais também são cultivados para uso esportivo (pesca esportiva; também são utilizados como isca) e ornamental (aquários). Além dos peixes, a aquicultura também foca na produção de algas e outras plantas marinhas (*Algicultura*), utilizadas na alimentação e elaboração de medicamentos farmacêuticos; moluscos, como ostras e mexilhões (*Malacocultura*); e crustáceos, dentre os quais destaca-se o camarão (*Carcinicultura*). Estes animais podem ser cultivados em ambiente natural como lagos, lagoas e o próprio oceano, como também em tanques artificiais construídos pelo homem. Entre as metodologias utilizadas para produção aquícola, pode-se citar o uso de

viveiros escavados no solo (reservatórios que permitem a entrada e saída de água), tanques-rede ou gaiola flutuante, e o cultivo em espínel e balsas.

Segundo Rocha *et al.* (2013), a prática da piscicultura brasileira é dividida em três tipos: (I) extensiva, que utiliza grandes reservatórios naturais ou artificiais, onde a densidade populacional de peixes é baixa e a sua alimentação e reprodução não são controladas; (II) semi-extensiva, que segue raciocínio similar ao anterior, mas com um controle maior da alimentação e da reprodução; (III) intensiva, que utiliza tanques e reservatórios construídos para obter um máximo de peixes por unidade de área, utilizando controle da alimentação e reprodução.

Com a expansão do setor, novas estratégias passaram a ser estudadas visando a sustentabilidade nas instalações e funcionamento dos empreendimentos: conservação da mata ciliar, minimização da contaminação em áreas adjacente à produção, controle dos princípios ativos e agentes tóxicos utilizados nas culturas, entre outros (NADARAJAH, FLAATEN, 2017). Essa mesma preocupação permeou os debates por ocasião da aprovação no Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), evidenciados na resolução nº 312/2002, que dispõe sobre o licenciamento ambiental dos empreendimentos de piscicultura na zona costeira (PEGADO, 2004). O manejo inadequado da aquicultura propicia o aumento de nutrientes na água dos tanques de criação de peixes, promovendo a eutrofização artificial dos mesmos, impactando negativamente a biota (ARANA, 2004; MONTAGNOLLI *et al.*, 2004). Mesmo diante de tantos riscos, o Brasil ainda não contém uma lei específica que regulamente os níveis máximos possíveis dessas substâncias na aquicultura.

Sobre a qualidade da água na piscicultura, Kubitzka (1998) afirmou que a produtividade do pescado está inteiramente ligada às condições do habitat que o animal cresce. A qualidade da água, alimentação e técnicas de criação melhoram o desenvolvimento das culturas, prevenindo doenças, aumentando a produção e o lucro (AYROZA *et al.*, 2011). De acordo com Tavares (1994), que estudou a limnologia aplicada à aquicultura, os processos que ocorrem na água estão intimamente ligados, não podendo ser vistos como processos independentes, uma vez que na água seus efeitos atuam de forma dinâmica e simultânea. Para isso, o controle de substâncias excipientes nos criadouros deve ser feito de forma rigorosa. A relação entre efeito e exposição de animais a interferentes endócrinos depende da forma e/ou tempo de exposição a esses interferentes endócrinos e dosagem, influenciando diretamente nos efeitos causados. Os interferentes endócrinos podem induzir em peixes a síntese da

proteína vitelogenina (VTG), um marcador utilizado para avaliação de atividade estrogênica no organismo. O aumento de VTG no plasma sanguíneo de um organismo é considerado evidência de exposição a substâncias estrogênicas, promovendo o aumento da taxa de crescimento de animais, apresentando efeito anabolizante semelhante ao dos esteroides. Esses estrogênios também apresentam grande risco à saúde dos humanos, uma vez que estão relacionados a uma série de desordens metabólicas, incluindo o desenvolvimento de carcinomas (EDWARDS 2015; LIMA, 2012; OLIVEIRA 2013). São exemplos de estrogênios com ação anabolizante: trans-dietilestilbestrol, dienestrol e o hexestrol.

2.2. Utilização de hormônios na aquicultura

Certos compostos utilizados nos criadouros com a função de aumentar o tamanho e massa corporal, promover o controle de população ou para estimular a reprodução das espécies, também podem afetar o sistema endócrino de organismos superiores, limitando e/ou bloqueando funções metabólicas vitais à vida (FALONE, 2007). Pesticidas, hormônios sintéticos e antibióticos são exemplos desta ameaça que, por sua vez, vem sendo utilizado de forma indiscriminada em muitos cultivos (ISMAIL, WEE e ARIS, 2017).

Em linhas gerais, os desreguladores endócrinos podem ser definidos como substâncias exógenas ou progênios secundários que causam efeitos adversos à saúde de um organismo, interferindo em sua homeostase e processo de desenvolvimento (GUIMARÃES, 2008; KAVLOCK, *et al.* 1996; WAISSMANN, 2002). Muitas destas substâncias também são persistentes no meio ambiente, acumulam-se no solo e no sedimento de rios, e são facilmente transportadas a longas distâncias pela atmosfera. Acumulam-se ao longo da cadeia trófica, representando um sério risco à saúde dos seres humanos que se encontram no topo da cadeia alimentar (MEYER *et al.*, 1999).

A exemplo dessas substâncias temos o Dietilestilbestrol (DES) aparece nos primeiros relatos de substâncias químicas com ação disruptora. Este composto estava presente em medicamentos anticoncepcionais usados por mulheres entre os anos 50 e 70. Anos mais tarde, sua relação com o surgimento de câncer e desordens no sistema reprodutor das pacientes e proles desencadeou sua proibição em muitos países (COLBORN *et al.*, 2002; OLEA *et al.*, 2002). A cada ano, a quantidade de substâncias

com ação desreguladora aumenta e algumas delas podem ser encontradas em trabalhos de revisão reportados na literatura (ISMAIL, WEE e ARIS, 2017; LIU *et al*, 2017)

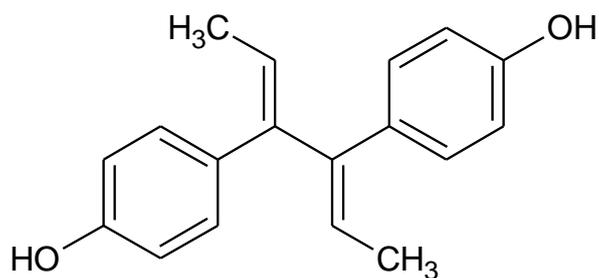
Na piscicultura, a maior aplicação está na produção de populações monosexo de *Tilápias*, em grande parte mediante o emprego de hormônios esteróides (LIAN, LI, JIANG, 2017). A técnica de produção mais utilizada é a reversão sexual, mas dúvidas e equívocos sobre tais aplicações ainda persistem, principalmente quanto ao tipo de hormônio esteroidal empregado no controle, efeitos colaterais na produção e efeitos deletérios nos consumidores. Ao que tudo indica, a produção de populações monosexo, por meio de "super-reprodutores" (super-machos e super-fêmeas), bem como o controle da fertilidade através de poliploides (situação genética de núcleo celular, célula, ou organismo, em que há mais de dois conjuntos de cromossomas homólogos) estão entre os métodos mais utilizados, embora muitas dúvidas de cunho biotecnológico ainda persistam e limitem a difusão das técnicas para outras espécies do setor piscicultor.

2.3. Z,Z-Dienestrol

O Z,Z-Dienestrol (DNL) é um estrogênio sintético não-esteroidal amplamente utilizado como anabolizante em muitos setores da aquicultura, particularmente na piscicultura em cativeiro. Assim como outras substâncias da família dos etilbenos, o DNL difunde-se passivamente em direção às células alvo de tecidos complexos, interagindo mimeticamente com um receptor de proteínas do sistema endócrino dos seres vivos, afetando o equilíbrio da transcrição genética na síntese proteica após a ligação ao DNA. A estrutura química deste composto está contemplada na Figura 1.

No organismo, os estrogênios aumentam a síntese hepática da globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG), globulina de ligação à tireoide (TBG), entre outras proteínas séricas, suprime a ação do hormônio folículo-estimulante (FSH) da hipófise anterior. A combinação de um estrogênio com uma progestina também suprime o sistema hipotálamo-hipofisário, diminuindo a secreção de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (HONG *et al*, 2015).

Figura 1 - Estrutura química do estrogênio Z,Z-Dienestrol.



Fonte: Autoria própria.

O DNL é administrado para as culturas como aditivo em rações comerciais. A presença deste composto na biomassa das espécies (ou mesmo no meio de cultura onde habitam) acarreta a contaminação indireta dos seres que venham a se alimentar das mesmas, o que reforça a importância no controle de qualidade do conteúdo estrogênico presente nessas culturas (HE *et al*, 2016).

2.4. Métodos eletroanalíticos

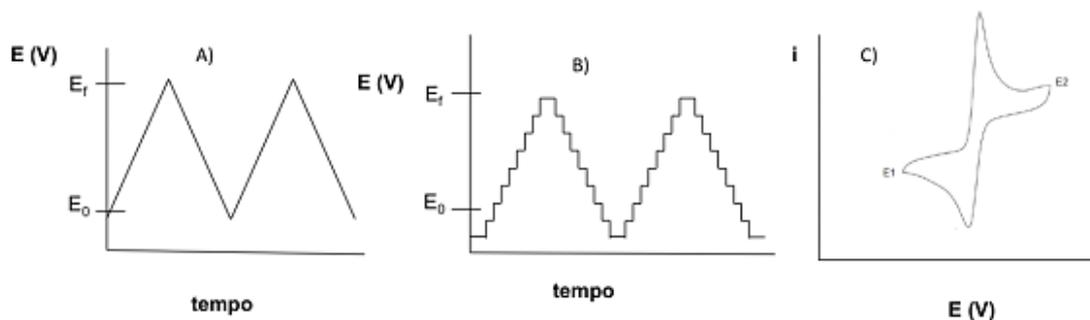
Normalmente, os procedimentos analíticos para hormônios requerem etapas complexas de tratamento prévio das amostras e separações cromatográficas, que os tornam demasiadamente laborosos e dispendiosos (Bahadir e Sezgintürk, 2015). Como alternativa, os métodos eletroanalíticos estão recebendo grande destaque por permitir o desenvolvimento de metodologias altamente sensíveis, simples, rápidas, com baixo custo operacional e robustas para a aplicação em amostras coloridas ou com partículas sólidas dispersas (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Os métodos eletroanalíticos relacionam medidas de parâmetros elétricos (corrente, potencial e carga, por exemplo) com variáveis associadas a reações redox ocorridas na interface do eletrodo de trabalho (WANG, 1994; SKOOG *et al.*, 1998).

As técnicas voltamétricas estão entre as mais utilizadas por possibilitarem a aquisição de informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química a partir do registro de curvas (voltamogramas) de corrente-potencial em função do tempo. As medidas são feitas em células eletrolíticas constituídas por, pelo menos, dois eletrodos (eletrodo indicador e eletrodo de referência), que permitem acompanhar as variações nos parâmetros eletroanalíticos relacionados ao evento redox de interesse. Como

exemplos, podemos citar a voltametria linear, cíclica, pulso normal, pulso diferencial, onda quadrada, multi-pulsos, técnicas de redissolução *stripping*, entre outras (LI e HU, 2013; JOVANOVSKI, HOČEVAR e OGOREVC, 2017).

Do ponto de vista qualitativo, a voltametria cíclica (VC) está entre as técnicas mais relevantes e amplamente empregadas em estudos eletroanalíticos (AHMAD e ALGHAMDI, 2010). Pode ser utilizada para fornecer informações sobre a termodinâmica das reações, detecção de intermediários e reações paralelas, reversibilidade dos processos, cinética reacional, mecanismos de transporte de massa, entre outros (JOVANOVSKI, HOČEVAR e OGOREVC, 2017). Nas medidas obtidas por VC, a resposta de corrente (Amperes) em um eletrodo de trabalho é obtida a partir da aplicação de um potencial (Volts) na forma de uma onda triangular, onde é realizada uma varredura no sentido direto e, posteriormente, no sentido inverso. Assim, todos os processos de oxidação e redução podem ser observados em um único ciclo de potencial (BARD & FAULKNER, 2004).

Figura 2 - Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada c) voltamograma obtido para um sistema reversível

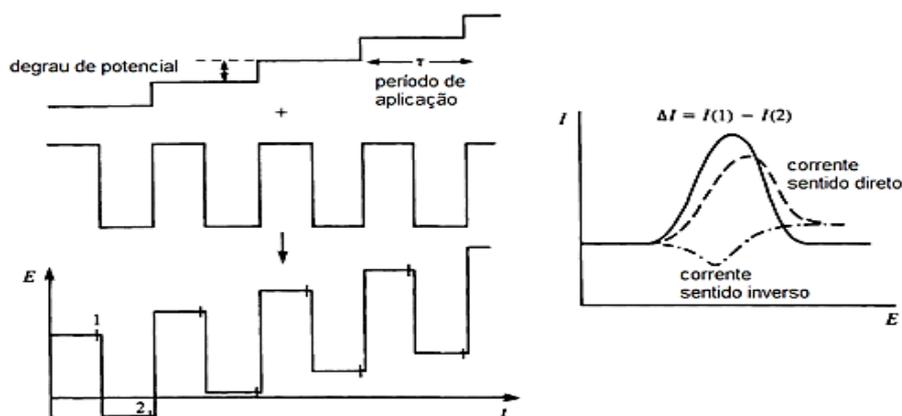


Fonte: Adaptado de <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/viewFile/380/345>.

Em termos de quantificação, as voltametrias de pulso são mais adequadas por minimizarem os efeitos indesejáveis das correntes capacitivas, necessárias para reestabelecer o equilíbrio de cargas na dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução (OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985). Como exemplo, podemos citar a voltametria de onda quadrada (VOQ), que utiliza um modelo de aplicação dos pulsos similar à voltametria de pulso diferencial, mas utilizando pulsos simétricos e simultâneos no sentido direto e reverso da varredura de potencial, o que contribui para o aumento na sensibilidade das medidas (SKOOG *et al.*, 1998). A utilidade desta técnica

vem sendo atestada para a determinação de baixos níveis de fármacos, pesticidas, nutrientes, proteínas, nucleotídeos, entre várias outras substâncias de interesse biológico e ambiental (OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985; SOUZA *et al.*, 2004; USLU, OZKAN, 2011).

Figura 3 - Representação Esquemática da Voltametria de Onda Quadrada.



Fonte: Adaptado de <http://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/viewFile/380/345>.

2.5. Determinação eletroanalítica de hormônios

A sensibilidade e versatilidade das técnicas eletroanalíticas supracitadas é inquestionável, mas a complexidade estrutural dos hormônios e as baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) em que são encontrados nas matrizes pode demandar etapas prévias de extração, derivatização e pré-concentração do analito. Santos (2013) desenvolveu um procedimento de varredura polarográfica para a determinação de estradiol e estriol sobre um eletrodo de gota pendente de mercúrio em urina de mulheres grávidas. Após a derivatização do analitos por nitração e empregando voltametria de onda quadrada, o método foi aplicado com êxito, alcançando limites de detecção (LDs) de $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para estradiol e $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para estriol.

Yang *et al.* (2009) modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono dispostos em múltiplas camadas para a determinação de estrona em formulações farmacêuticas. Utilizando o processo de oxidação irreversível do hormônio estrogênico (+0,58 V vs. SCE), registrado por voltametria cíclica, obteve-se LD = $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, atestando a sensibilidade do procedimento.

Jin e Lin (2005) utilizaram eletrodo de grafite modificado com carbamilcolina para a determinação simultânea de 17β -estradiol, estrona e estriol. Como os três picos de oxidação foram encontrados no potencial de +0,55 V (vs. SCE), os níveis encontrados por voltametria ciclica foram denominados de estrógenos totais. A faixa linear das concentrações individuais destes hormônios foram de $4,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5}$ para 17β -estradiol, $3,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-5}$ para estrona e $5,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para estriol. Os autores não fazem menção quanto aos limites de detecção e quantificação obtidos. O método foi aplicado com êxito para a quantificação desses hormônios em soro sanguíneo de mulheres gestantes.

Lin e Li (2006) desenvolveram um método para detectar estrona, 17β -estradiol e estriol em soro sanguíneo de humanos, utilizando VOQ e um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanoclusters de platina e nanotubos de carbono. A análise de estrógenos totais foi acompanhada pelo pico de oxidação registrado em +0,43 V (vs. SCE). Analisando cada estrogênio individualmente, obteve-se LD = 840 nmol L⁻¹ para estrona, LD = 620 nmol L⁻¹ para estriol e LD = 180 nmol L⁻¹ para 17β -estradiol.

Moraes *et al.* (2011) observaram o comportamento eletroquímico do esteróide progesterona, utilizando VC e um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de cobalto. Os autores mostraram que o pico de redução de Co(IV)/Co(III) foi inibido na presença do hormônio, sendo assim utilizado como pico analítico. O procedimento proposto foi reprodutível e robusto, possibilitando a detecção de progesterona (LD = $1,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) em fluidos biológicos.

Fernández *et al.* (2009) estudaram a adsorção da progesterona em carbono vítreo, utilizando VOQ como técnica assistiva. Um pico de redução foi obtido em -1,65 V (pH 8,0) após pré-concentração do hormônio em potencial de circuito aberto. Os autores mostraram uma dependência da adsorção da progesterona com o aumento da temperatura e sugeriram a isoterma de Frumkin para explicar os resultados obtidos. Valores de energia livre de Gibbs, entalpia e entropia da adsorção também foram calculados e empregados para explicar a forte adsorção molecular sobre o eletrodo de trabalho. O LD obtido foi de (LD = 3×10^{-5} mol L⁻¹).

Xu *et al.* (2005) desenvolveram um biossensor eletroquímico para a determinação progesterona em leite bovino. O sensor foi fabricado pela imobilização de um anticorpo monoclonal de anti-progesterona sobre eletrodos de carbono impresso. Os

ensaios foram acompanhados por medidas colorimétricas e voltamétricas, de modo que o biossensor mostrou grande precisão nas medidas entre 1,0 – 5,0 ng /mL do analito.

Na verdade, há uma pequena variedade de dispositivos disponíveis para a eletroanálise de um número reduzido de estrogênio sintéticos e naturais. Alguns sensores também requerem agentes modificadores caros e que, em alguns casos, necessitam de mais estudos para aprimoramento na precisão das medidas. O número de matrizes estudadas também é limitado e nenhum trabalho foi direcionado para o controle de qualidade de produtos da aquicultura até o momento.

2.6. Eletrodo de diamante dopado com boro

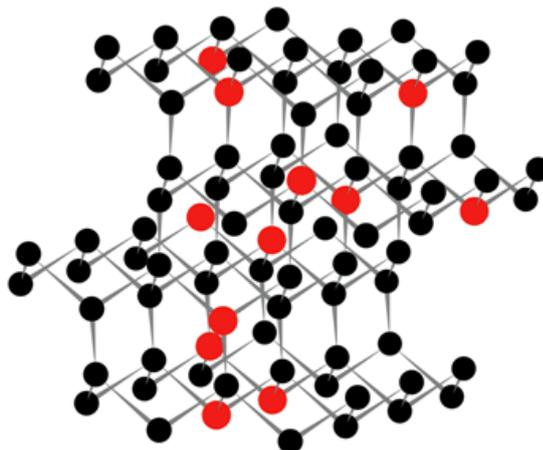
Dispositivos eletroquímicos que podem ser bastante proeminentes em estudos eletroanalíticos com hormônios são os eletrodos de diamante dopado, em função de propriedades singulares desses materiais, que inclui a ampla janela eletroquímica de potencial entre as reações de desprendimento de hidrogênio e oxigênio em meio aquoso; alta estabilidade química e mecânica; alta resistência contra a corrosão em ambientes quimicamente agressivos; estabilidade de sinal; resistência à adsorção de reagentes e/ou produtos da reação; além de baixa contribuição de correntes capacitivas (PLESKOV, 2002; PEDROSA, CODOGNOTO e AVACA, 2003).

Quanto ao dopante, diferentes compostos podem ser utilizados, tais como enxofre, nitrogênio, fósforo e lítio, mas o boro e seus derivados despontam como os mais utilizados (BARROS *et al.*, 2005). A dopagem deste alótropo do carbono é necessária devido ao seu grande *gap* de energia (quantidade de energia necessária para que o elétron efetue essa transição) é ($> 5,0$ eV), que o torna isolante e inadequado para ser usado como um material eletródico em sua forma pura. A dopagem com átomos de boro introduz um nível aceitador de elétron no *gap* de energia localizado a aproximadamente 0,35 eV acima da banda de valência.

O boro é um elemento trivalente que, quando incorporado á rede cristalina tetraédrica do diamante, estabelece três ligações B–C (Figura 2). Como os três elétrons de valência do boro são compartilhados entre quatro átomos de carbono, ocorre a formação de uma lacuna; instabilidade de cargas. Esta desordem causada na rede cristalina é o que provoca o efeito de condutividade, sendo que o aumento da desordem favorece a sobreposição das bandas de energia (SWART, 2004). Em síntese, a lacuna se

comporta como um portador de carga positiva quando um elétron de valência de um átomo vizinho se desloca, preenchendo esta lacuna.

Figura 4 - Distribuição aleatória dos átomos de boro (bolas vermelhas) em um filme de diamante dopado (átomos de carbono – bolas pretas).



Fonte: Adaptado de <http://diamond.maydaysur.org/lattice-structure-of-diamond/>

O processo de dopagem consiste em substituir átomos de carbono na estrutura cristalina do diamante por átomos de boro, para garantir a condutividade elétrica (LUONG *et al.*, 2009). As aplicações dos filmes de diamante dopado com boro podem ganhar dimensões ainda maiores, dependendo da técnica de crescimento dos filmes. Os dois métodos mais empregados para a síntese do diamante são a deposição química a partir da fase vapor (*Chemical Vapor Deposition* - CVD) e o crescimento a alta pressão/alta temperatura (*High – Pressure/ High Temperature* - HPHT). O processo que mais se assemelha com a formação do diamante natural é o HPHT, porém o método mais utilizado para a síntese dos filmes de diamante em série é o CVD, que permite produzir filmes finos de diamante sintéticos sobre diferentes substratos (silício, tungstênio, molibdênio, titânio, grafite, carbono vítreo, além do próprio diamante), a partir de reagentes gasosos (SARTORI, 2009; SPEARKS e DISMUKES, 1994). A concentração do boro determina a resistência específica de um filme de DDB e o substrato a ser escolhido para a confecção do eletrodo é outro fator importante, pois o melhor substrato é aquele que possui boa resistência mecânica e coeficiente de dilatação parecido com o filme do diamante, para não ocorrerem eventuais rachaduras após a retirada do eletrodo do reator.

Sobre as propriedades eletroquímicas deste material, Gajewski *et al.* (2009) mostraram que o aumento da concentração de átomos de boro nos filmes de diamante causa mudanças no mecanismo de transporte eletrônico. Mesmo para os filmes com baixa concentração de boro ($<10^{19} \text{ cm}^{-3}$), o transporte de elétrons é favorecido e ocorre através das lacunas na banda de valência, que surgem como contribuição do boro substitucional ionizado. Nesladeck *et al.* (2009) mostraram que eletrodos altamente dopados com boro ($3,0 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$) podem apresentar uma supercondutividade e uma magnetoresistência positiva. Fisher *et al.* (2004) compararam filmes de diamante com diferentes dopagens e concluíram que estes possuíam desempenho eletroanalítico similar em termos de amplitude da janela de potencial, baixa contribuição das correntes de fundo e favorecimento ao transporte de carga. May *et al.* (2008) estudaram a relação existente entre a morfologia do filme, a condutividade e o nível de dopagem, sugerindo que a fabricação de eletrodos com condutividades e rugosidade controlada podem torná-los excelentes candidatos como supercondutores. Todos esses fatores possibilitam novas oportunidades de investigação eletroquímica com moléculas e grupos de moléculas distintas, a exemplo dos estrogênios sintéticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para detectar e quantificar o estrogênio sintético DNL, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro como superfície eletródica, visando a aplicação deste procedimento no controle de qualidade deste composto em produtos da aquicultura.

3.2. Específicos:

- Estudar o comportamento eletroquímico do *DNL* sobre eletrodo de diamante dopado com boro, antes e após etapas de polarização anódica e catódica;
- Compreender (a reversibilidade, processos de transporte de massa e transferência de carga) ocorridos na interface eletrodo/solução;
- Otimizar o procedimento eletroanalítico, (com base em técnicas voltamétricas), visando a detecção do referido estrogênio desde níveis traço;
- Aplicar o procedimento proposto para a eletroanálise de DNL na biomassa de Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*).

4. METODOLOGIA

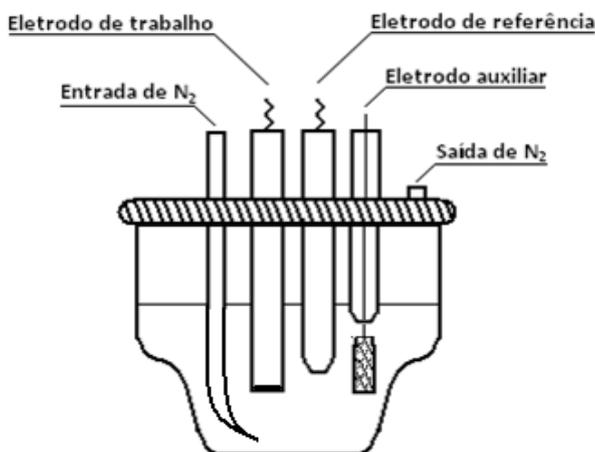
4.1. Reagentes e soluções

Para o desenvolvimento da metodologia, todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica e suas respectivas soluções preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), a partir da dissolução de quantidades adequadas do reagente sem prévia purificação. A solução-estoque de DNL ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada com padrão de alta pureza (99,5 %) da *Sigma-Aldrich*. Assim como o ácido sulfúrico (95-99 %), utilizado na limpeza e ativação do eletrodo de trabalho; o ácido clorídrico e hidróxido de sódio, utilizados no ajuste de pH das soluções eletrolíticas; e os ácidos bórico (99,5 %), fosfórico (85,0 %) e acético (99,7 %), utilizados na preparação da solução tampão *Britton-Robinson*, que foi empregada como eletrólito suporte, foram adquiridos da *Vetec*.

4.2. Equipamentos

As medidas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato μ -Autolab III, fabricado pela Metrohm – Pensalab. O sistema eletroquímico foi conectado a uma célula eletroquímica convencional (5,0 mL) composta por três eletrodos: (i) EDDB ($5,00 \text{ mm}^2$ e dopagem de 8000 ppm) pré-ativado catodicamente como dispositivo de trabalho, (ii) eletrodo auxiliar de platina ($10,0 \text{ mm}^2$) e (iii) eletrodo de prata/cloreto de prata ($\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$) como referência (Figura 3).

Figura 5 - Representação esquemática da célula eletroquímica.



Fonte: Adaptado de Paiva, 2017.

Quando se fez necessário o ajuste de pH do eletrólito suporte, o procedimento foi acompanhado por potenciometria direta, utilizando um medidor multiparamétrico *Orion 5Star*, da *Thermo Electron Corporation*, acoplado a um eletrodo H⁺/íon-seletivo. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura adquirida de um sistema PurelabMili-Q, fabricado pela *Analítica*.

4.3. Limpeza e pré-ativação do eletrodo de trabalho

Antes de iniciar os estudos eletroanalíticos do DNL sobre o EDDB, foi realizada a limpeza e pré-ativação da superfície de trabalho. Ambas as etapas foram condizidas por via eletroquímica, partindo da aplicação de um potencial de +0,30 V por 60 s, em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹; um potencial suficientemente elevado para promover a evolução de O_{2(g)} sobre o EDDB e, conseqüentemente, renovar sua superfície ativa para os estudos posteriores. Em seguida, foi feito um pré-tratamento cátodico do dispositivo, aplicando-se -0,3 V por 30 s, a utilização do pré-tratamento cátodico incrementa a reprodutibilidade e o valor da constante de velocidade de transferência de carga, em relação aos preparados com superfícies oxidadas facilitando o transporte de cargas na interface eletrodo/solução (GARSELLINI *et al*, 2011) porém o pré-tratamento cátodico apresenta uma perda de reversibilidade para o sistema reversível em função do tempo de exposição ao ar, reforçando assim a necessidade de se voltar a fazer o procedimento todos os dias antes dos experimentos para obter resultados reprodutíveis e confiáveis. As melhorias obtidas com estas etapas, em termos de intensidade das correntes de pico (I_p), deslocamento dos potenciais de pico (E_p), alargamento/potencial de pico a meia-altura ($E_{p1/2}$), ruído do sinal e perfil voltamétrico, foram investigadas por VC a 50 mV s⁻¹, usando K₃[Fe(CN)₆] 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ como mediador redox em KCl 0,5 mol L⁻¹.

4.4. Comportamento redox do z,z-dienestrol

O comportamento redox do DNL (1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹) sobre EDDB foi investigado antes e após a polarização catódica do dispositivo, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (0,04 mol L⁻¹) ajustada a pH 2,0, utilizando VC a 50 mV s⁻¹. Os dados obtidos fundamentaram as discussões em torno da reversibilidade, caráter adsorptivo e cinética eletródica, utilizando os critérios de diagnósticos da técnica. Em seguida, o pH da solução eletrolítica foi ajustado (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 e 9,0) na

perspectiva de compreender o caráter próton-dependente da molécula em estudo, mantendo-se as demais condições mencionadas anteriormente. Por último, a velocidade de varredura (v) também foi alvo de investigação (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 mV s^{-1}), para entender de que maneira o registro de correntes faradáicas poderia ser positivamente afetado a partir da variação deste parâmetro. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados com soluções previamente desaeradas com $\text{N}_{2(\text{g})}$ durante 60 s, a fim de promover a agitação do meio e renovar a superfície do eletrodo pela remoção de produtos fracamente adsorvidos.

4.5. Curva analítica e figuras de mérito

A quantificação do DNL foi feita por VOQ, após otimizar os parâmetros que afetam a sensibilidade analítica desta técnica: frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f ; 10 – 200 s^{-1}), amplitude dos pulsos (a ; 5 – 60 mV) e incremento de potencial (ΔE_s ; 2 – 6 mV). A curva analítica foi construída a partir da correlação das sucessivas adições do DNL ($5,00 \times 10^{-7}$ a $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com os respectivos valores de I_p , fazendo uma varredura de potencial entre 0,8 e 1,2 V, em meio de solução-tampão Britton-Robinson ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) ajustada a pH 2,0. Os dados da curva de regressão linear, obtidos pela média aritmética (\bar{x}) entre três medidas realizadas para cada concentração, foram utilizados para os cálculos das figuras de mérito.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados pela relação entre o desvio-padrão (DP) dos interceptos (a) e a média das inclinações (\bar{b}) das curvas analíticas, conforme indicado nas seguintes equações:

$$\text{LD} = 3 \times \frac{\text{DP}_a}{\bar{b}} \quad (1)$$

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{\text{DP}_a}{\bar{b}} \quad (2)$$

A precisão da metodologia foi avaliada por testes de repetibilidade feitos no mesmo dia (*intraday*; $n = 10$) e em dias diferentes (*interday*; $n = 5$), utilizando o desvio-padrão relativo (DPR) das medidas, expresso em porcentagem:

$$\% \text{DPR} = \left(\frac{\text{DP}}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Para avaliar a exatidão da metodologia desenvolvida, foram feitas análises de recuperação de DNL na biomassa de peixes comumente tratados com este estrogênio. A porcentagem de recuperação (%R), obtida a partir do método da adição de padrão, foi calculada utilizando-se a Equação 4:

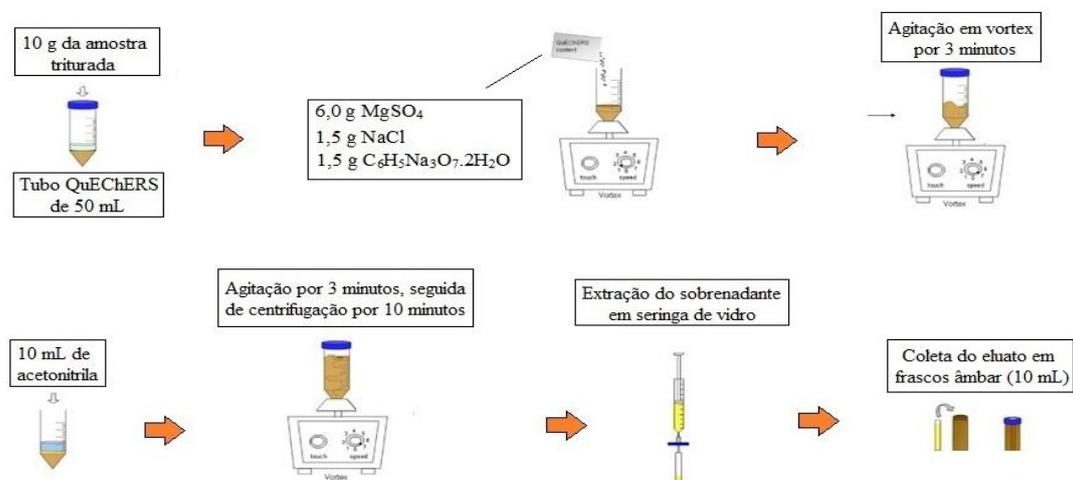
$$\%R = \left(\frac{[\text{DNL}]_{\text{Recuperada}}}{[\text{DNL}]_{\text{Adicionada}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde $[\text{DNL}]_{\text{Recuperada}}$ e $[\text{DNL}]_{\text{Adicionada}}$ corresponde aos valores de concentração identificados e adicionados à matriz, respectivamente.

4.6. Aplicação da metodologia

A aplicabilidade da metodologia desenvolvida foi avaliada por meio de testes de detecção e quantificação do analito em cobaias de Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*), uma espécie bastante explorada no mercado aquícola brasileiro, tanto para importação quanto exportação. As amostras de peixe foram adquiridas no comércio local da cidade de Mossoró – RN. Os ensaios foram realizados em extratos orgânicos obtidos do fígado das cobaias, por ser este o órgão responsável pela metabolização das substâncias química as quais as culturas estão expostas. Para fins de aplicação do método, foi feita uma contaminação artificial com este estrogênio nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$ e $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para cada 10 g do material a ser analisado. A amostra foi moída e submetida ao processo de extração pelo método *QuEChERS* (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), conforme descrito na Figura 6. As análises de recuperação foram feitas pelo método da adição de padrão, utilizando os extratos obtidos em acetonitrila como porção representativa da amostra. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e na temperatura de 20 °C, sendo que o resultados foram expressos como média aritmética.

Figura 6 - Etapas envolvidas no processo de extração do z,z-dienestrol da biomassa de Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*) por meio do método QuEChERS.



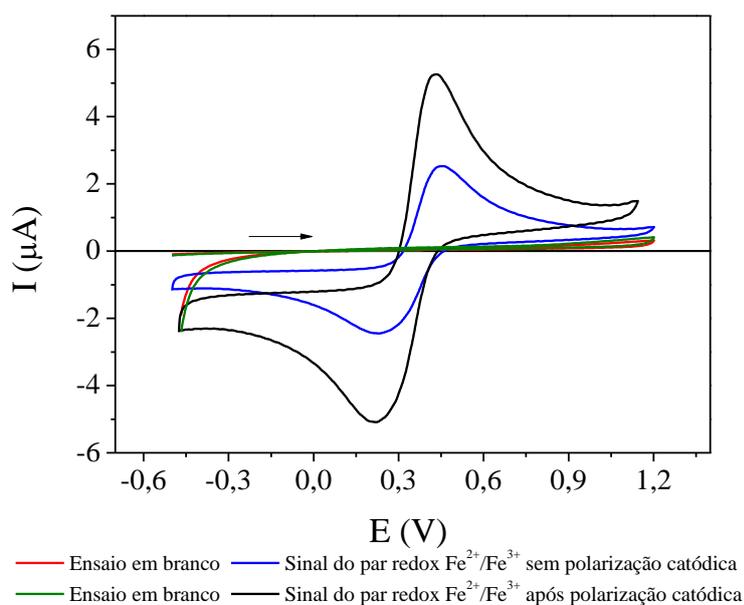
Fonte: Adaptado de Nerli, Christiansen e Deribe (2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento catódico do eletrodo de trabalho

Seguindo recomendações acerca das melhorias proporcionadas pelo pré-tratamento catódico do EDDB para fins eletroanalíticos (MOURA *et al.*, 2015), o primeiro passo deste estudo foi avaliar este efeito para a sonda redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando-se $-0,3 \text{ V}$ por 30 s, após as etapas de limpeza e pré-ativação da superfície de trabalho. Os resultados obtidos por VC a 50 mV s^{-1} mostraram que, de fato, a polarização catódica da superfície contribuiu para a diminuição na resistência a transferência de carga, uma vez que o sinal eletroanalítico do par redox $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ aumentou em mais de duas vezes em comparação ao registrado antes do referido tratamento, conforme constatado na Figura 7. Acredita-se que este efeito esteja associado com a maior hidrofobicidade da superfície causada pela formação de terminações apolares com hidrogênio formadas durante o processo eletrolítico, que facilita o transporte de cargas na interface eletrodo/solução (GARBELLINI, *et al.*, 2011).

Figura 7 - Comportamento eletroquímico de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, antes (em azul) e após (em preto) aplicar $-0,3 \text{ V}$ sobre EDDB por 30 s.



Fonte: Autoria própria.

O perfil voltamétrico foi representado por um pico anódico (+0,53 V) e outro catódico (+0,28 V) de igual intensidade, relacionados às mudanças no estado de oxidação do ferro ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$) presente no complexo metálico. Apesar de se tratar de um processo totalmente reversível, observou-se uma separação entre os picos de oxidação e redução acima da ideal para este tipo de sistema, que pode estar associada à resistividade atrelada ao próprio material eletrodico (MOURA *et al.*, 2015).

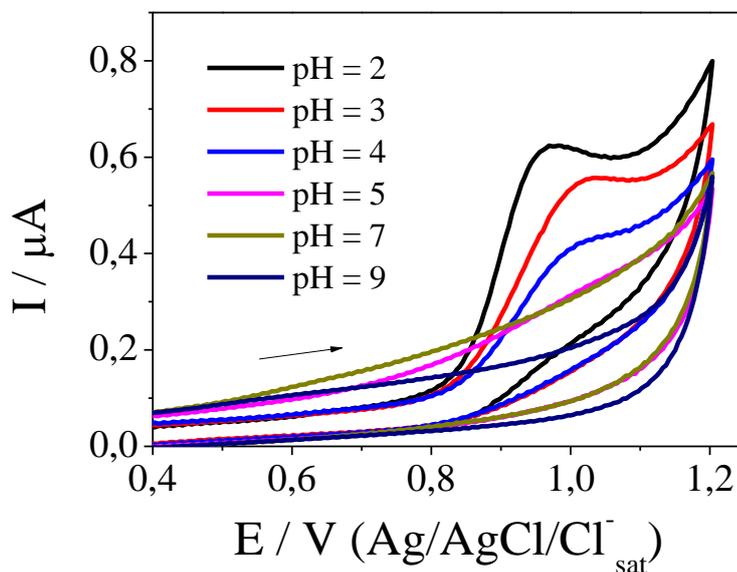
Considerando que a proposta principal deste trabalho estava centrada na quantificação do estrogênio DNL em produtos da aquicultura e sabendo que o aumento do sinal analítico é fundamental para detectar concentrações-traço desta substância, o tratamento catódico (-0,3 V por 30 s em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}) sobre EDDB foi padronizado nas demais etapas de desenvolvimento do método eletroanalítico.

5.2. Efeito do pH sobre o processo redox do dienestrol

Ciente do caráter próton-dependente da molécula de DNL, o comportamento eletroquímico do analito ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) sobre EDDB foi avaliado em ampla faixa de pH (2 – 10), utilizando solução-tampão Britton-Robinson como eletrólito. Os resultados obtidos por VC à 50 mV s^{-1} , apresentados na Figura 8, mostram que a elevação do pH proporciona um abaixamento significativo dos valores de I_p , paralelo ao deslocamento não-linear de E_p para valores mais positivos e aumento de $E_{p/2}$. Pode-se observar que, para valores de pH ≥ 5 , o sinal eletroanalítico do DNL já não era perceptível nas condições em que os experimentos foram realizados, possivelmente pelo fato do produto da hidrólise do composto, que passa a ser majoritário à medida em que o meio se torna mais alcalino, não ser tão reativo sobre o EDDB quanto o seu análogo protonado.

Para os ensaios eletroanalíticos é desejável que o pico referente ao processo redox de interesse seja intenso o suficiente para detectar baixas concentrações do analito (elevados valores de I_p), com alta resolução/seletividade (baixos valores de $E_{p/2}$) e em regiões de potencial menos susceptíveis a ocorrência de reações redox paralelas de possíveis interferente (neste casos, valores de E_p menos positivos). Assim, a condição que melhor satisfaz esses requisitos foi registrada em pH = 2,0 que, por sua vez, foi padronizada nos experimentos posteriores.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, utilizando velocidades de varredura de 50 mV s^{-1} , em meio de solução-tampão Britton-Robinson ajustada a diferentes valores de pH.

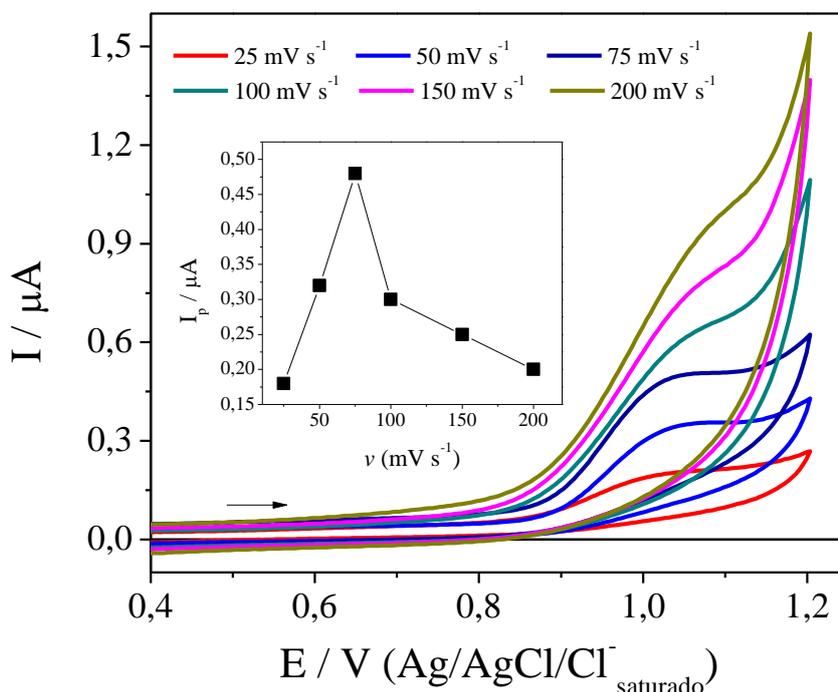


Fonte: Autoria própria.

5.3. Efeito da velocidade de varredura sobre o processo redox do dienestrol

Com o intuito de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte de massa do DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) sobre EDDB, o sinal eletroanalítico foi investigado por VC, empregando diferentes velocidades de varredura de potencial (v de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1}) e utilizando solução-tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 2,0$) como eletrólito suporte. De acordo com os dados apresentados na Figura 9, o aumento de “ v ” proporcionou um leve deslocamento de E_p para valores mais positivos e um aumento linear de I_p até $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, indicando que o processo de transporte de massa do estrogênio na interface entre o eletrodo e a solução eletrolítica ocorre com cinética moderadamente lenta e que a etapa limitante da velocidade da reação envolve um processo de transferência eletrônica, possivelmente relacionado com a adsorção dos produtos de eletrólise sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Somando-se aos critérios de diagnóstico da voltametria cíclica supracitados, independente da velocidade de varrimento empregada, um único pico foi registrado para a oxidação do DNL sobre EDDB, classificando-o como sendo de natureza irreversível.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, empregando diferentes velocidades de varredura e utilizando solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) como eletrólito suporte.

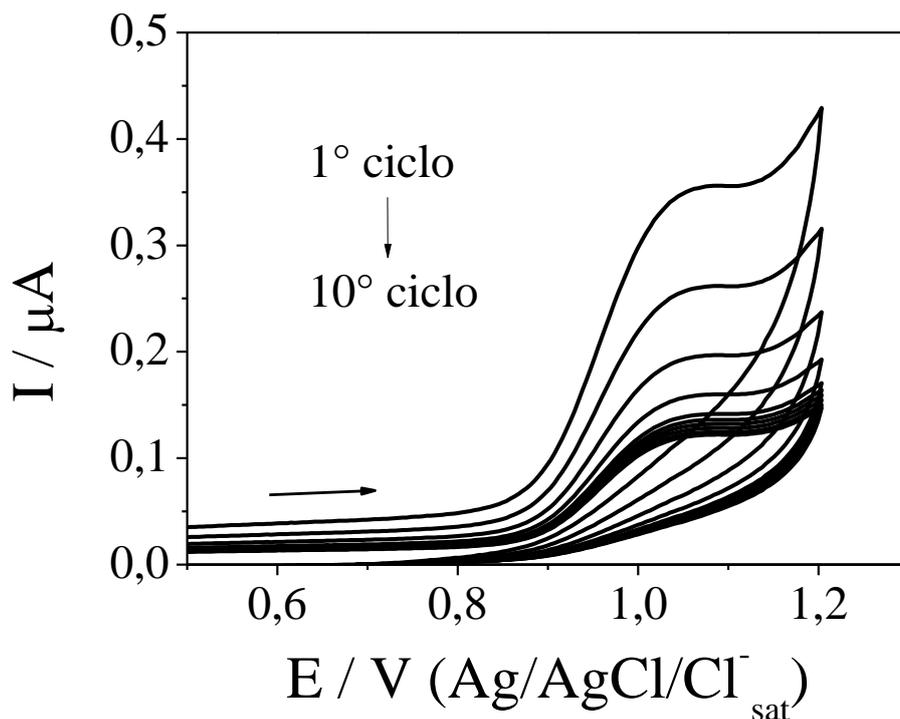


Fonte: Autoria própria.

Observando a equação de regressão linear que descreve a relação entre o logaritmo das correntes de pico em função do logaritmo das velocidades de varredura ($\log I_p$ vs. $\log v$) registradas até 100 mV s^{-1} , constatou-se uma inclinação próxima da unidade ($b \approx 0,94$; $r^2 = 0,9998$), que é característico de processos redox controlados por adsorção. Esse resultado também pode ser confirmado pelo conjunto de voltamogramas cíclicos consecutivos apresentados na Figura 10, que revelam uma diminuição de, aproximadamente, 61% do sinal inicial até o quinto ciclo de varredura. A princípio, este resultado seria uma limitação para a eletroanálise do composto em questão porque a passivação da superfície do eletrodo de trabalho por produtos da reação requer uma etapa prévia de polimento (mecânico, químico ou eletroquímico) antes de cada medida, visando a renovação da área ativa. Em muitos casos, esses procedimentos prejudicam a repetibilidade das medidas, aumentam o tempo de análise e o risco de contaminação da célula eletroquímica. Todavia, em virtude da resistência à passivação apresentada pelo EDDB, foi observado que a interação entre os produtos da reação e a superfície eletródica de trabalho não era tão efetiva, de modo que a simples agitação do meio por um período de 60s já era suficiente para garantir a renovação da área ativa. Vale

ressaltar que a resistência à passivação por produtos da reação redox é uma característica dos eletrodos de diamante dopado, independente de se trabalhar ou não com o pré-tratado catódicamente (FISHER *et al.*, 2004; NESLADECK *et al.*, 2009).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, empregando velocidades de varredura de 100 mV $^{-1}$ e utilizando solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) como eletrólito suporte.



Fonte: Autoria própria.

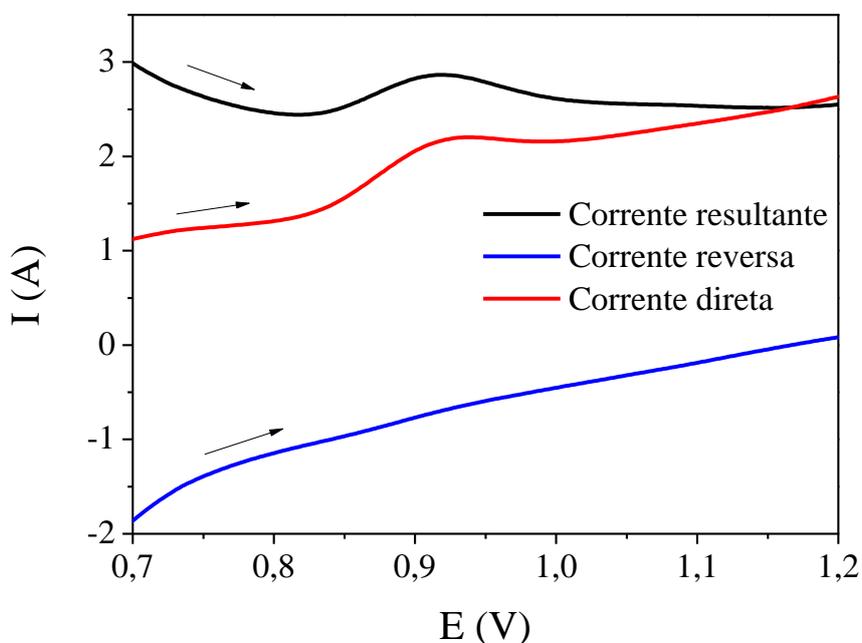
5.4. Otimização de parâmetros eletroanalíticos

Na voltametria de onda quadrada (VOQ), a forma da curva de corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (incremento do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura a (amplitude do pulso de potencial), medidos a uma dada frequência (f) ao longo do tempo. A variação de potencial é feita na forma de uma onda, registrada sobre uma rampa gradiente de potencial na forma de escada, gerando um pico simétrico que pode ser utilizado com sucesso para determinações eletroanalíticas (DE SOUZA, MACHADO E AVACA, 2003). As correntes resultantes são medidas ao final dos pulsos direto e reverso, de modo que a intensidade da corrente resultante apresenta

excelente sensibilidade e alta rejeição de correntes capacitivas, tornando-se mais sensível que as demais técnicas não-pulsadas. Sendo assim, optou-se por utiliza-la como técnica eletroanalítica neste trabalho, a fim de quantificar baixas concentrações do DNL sobre EDDB.

Como pode-se observar na Figura 9, a componente de corrente resultante da VOQ, referente à oxidação do DNL sobre EDDB, possui a mesma intensidade e encontra-se no mesmo sentido da componente de corrente direta, enquanto que a componente reversa permanece nula.

Figura 11 - Componentes de corrente da voltametria de onda quadrada obtidas na oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0) e aplicando-se $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

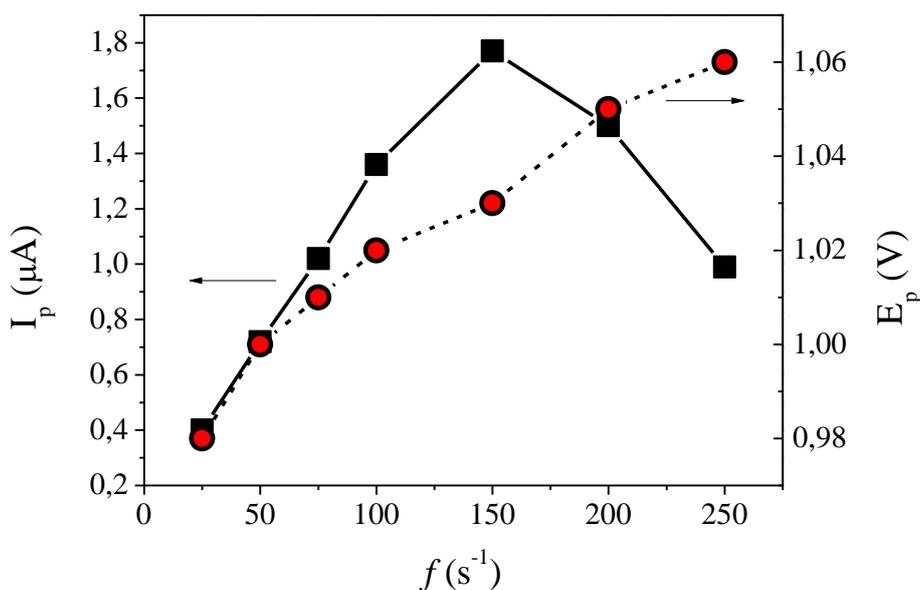


Fonte: Autoria própria.

Observou-se ainda uma diminuição de I_p e deslocamento de E_p para valores mais positivos após varreduras consecutivas de potencial, caracterizando a referida reação como sendo irreversível e com indícios de adsorção dos produtos formados, corroborando os resultados obtidos por VC. Como a componente resultante apresentou menor variação na linha de base e perfil voltamétrico mais definido, a mesma foi utilizada na otimização dos parâmetros que controlam a resposta eletroquímica na VOQ (f , a e ΔE_s) e construção das curvas analíticas.

A frequência de aplicação dos pulsos é considerado um dos parâmetros mais críticos da VOQ, por estar diretamente relacionada com a velocidade efetiva de varrimento, por meio do produto com o incremento de varredura de potencial ($v = f \times \Delta E_s$), controlando boa parte dos efeitos desejáveis para uma medida eletroanalítica eficiente. Neste trabalho, a frequência de aplicação dos pulsos foi investigada no intervalo entre 10 e 250 Hz (Figura 10), onde constatou-se aumento linear de I_p até $f = 150$ Hz e diminuição expressiva em valores mais elevados desta variável, o que denota cinética relativamente lenta do DNL sobre EDDDB. O deslocamento de E_p para regiões mais positivas decorre da passivação da superfície por produtos da reação redox.

Figura 12 - Efeito da frequência de aplicação dos pulsos (10–250 Hz) sobre as correntes e potenciais de pico observado para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) sobre EDDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.

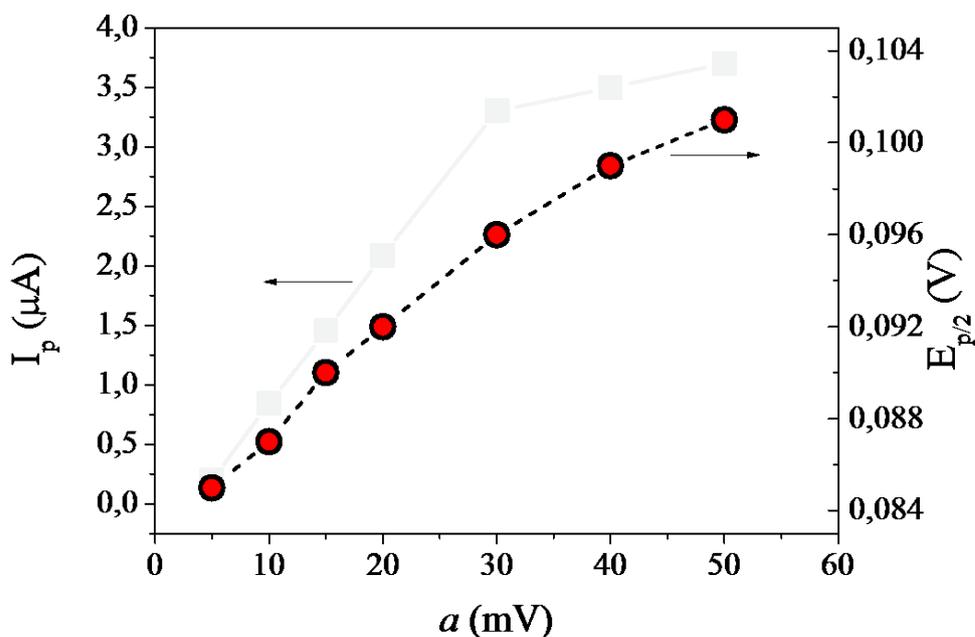


Fonte: Autoria própria.

Em relação à amplitude, avaliada entre 5 e 50 mV, também se observou ganho de corrente ao aumentar esta variável até $a = 30$ mV, permanecendo praticamente constante em valores mais elevados, conforme pode ser constatado na Figura 11. Todavia o aumento nos valores de “ a ” também acarretou alargamento no perfil voltamétrico do processo, implicando em aumento de $\Delta E_{p/2}$ e perda de seletividade em

relação à possíveis interferentes que possam ser eletroativos sobre EDDB, especialmente aqueles que se oxidam em potencias próximos ao do DNL.

Figura 13 - Efeito da amplitude dos pulsos de potencial (5–50 mV) sobre as correntes e potenciais de pico observado para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

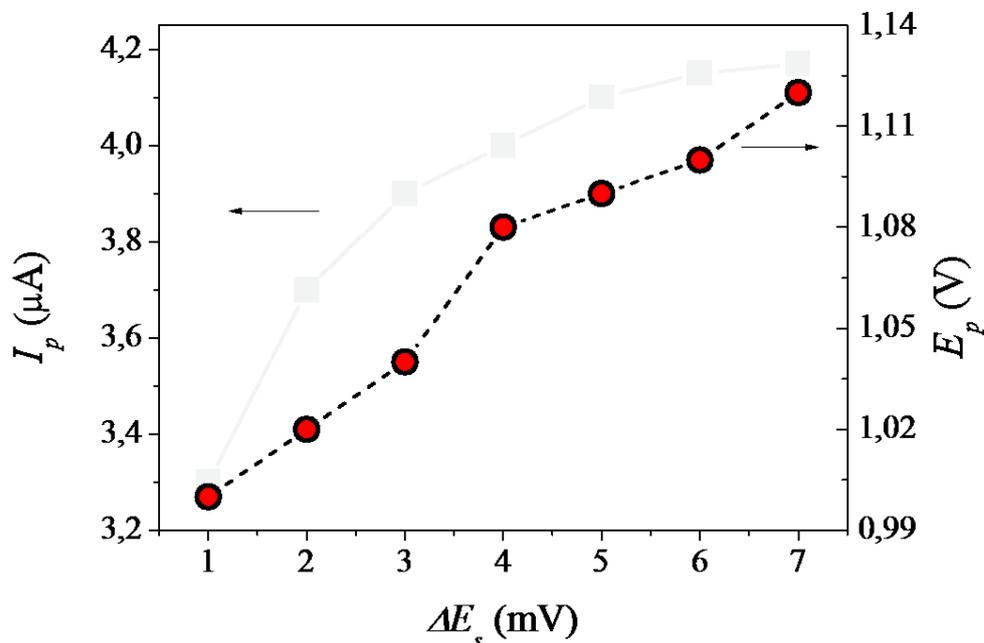


Fonte: Autoria própria.

No caso do incremento de potencial, estudado entre 1 e 7 mV (Figura 12), houve aumento não linear de I_p em toda a faixa avaliada, mas acima de $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ o ruído do sinal tornou-se muito expressivo, prejudicando o perfil voltamétrico da reação redox de interesse e dificultando o tratamento estatístico dos dados. Outro fator indesejável foi que o aumento de ΔE_s também favoreceu o deslocamento de E_p para potencias mais próximos da evolução de oxigênio que, além de diminuir a seletividade do método também dificultou a repetibilidade das medidas.

Diante do exposto, para a construção da curva analítica e aplicação da metodologia proposta para avaliar o teor do estrogênio de trabalho em amostras de peixes, utilizou-se EDDB aliado à VOQ nas seguintes condições operacionais: $f = 150 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

Figura 14 - Efeito do incremento dos pulsos de potencial (2–7 mV) sobre as correntes e potenciais de pico observado para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: Autoria própria.

5.5. Curva analítica e figuras de mérito

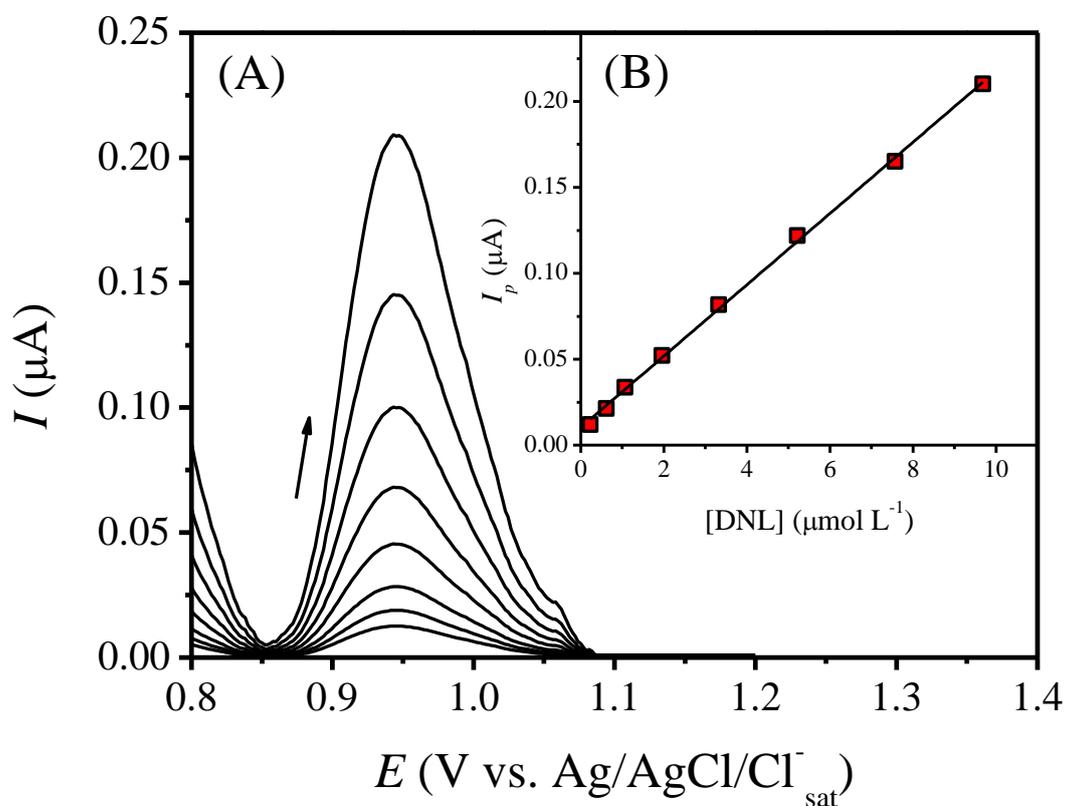
Para a quantificação do processo DNL sobre EDDB, foram construídas curvas analíticas a partir de sucessivas adições do estrogênio de trabalho à célula eletroquímica, de modo que a intensidade do processo de oxidação da molécula foi registrado sob condições otimizadas (EDDB pré-ativado catodicamente; solução-tampão Britton-Robinson ajustada a pH = 2,0; $f = 150 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$). Seguindo este raciocínio, conforme pode ser observado na Figura 13A, o aumento na concentração do analito proporcionou aumento nos valores de I_p , possibilitando a quantificação direta do DNL em uma ampla faixa de concentração.

A curva analítica resultante (Figura 13B) mostrou a possibilidade de quantificar DNL sobre EDDB em ampla faixa de concentração do analito ($2,30 \times 10^{-7}$ a $9,69 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), cuja linearidade desta relação pode ser descrita pela seguinte equação de regressão:

$$I_p (\mu\text{A}) = 0,010 + 0,021 \times [\text{DNL}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (5)$$

O coeficiente de correlação linear encontrado foi próximo da unidade ($r^2 = 0,9987$), indicando que o modelo matemático explica boa parte da variância dos dados e que o mesmo pode ser utilizado com credibilidade para inferir a concentração de DNL em amostras desconhecidas.

Figura 15 - (A) Voltamogramas de onda quadrada do DNL ($2,30 \times 10^{-7}$ a $9,69 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) registrados para a sua oxidação sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $f = 150$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Curva analítica obtida nas mesmas condições descritas em “A”.



Fonte: Autoria própria.

Utilizando o desvio padrão dos diferentes valores do coeficiente linear e a média aritmética do coeficiente angular, conforme instruído no “Item 4.5”, foi possível estimar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método eletroanalítico como sendo $5,43 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,81 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente, demonstrando a elevada sensibilidade do método proposto para a quantificação do estrogênio em amostras reais, mesmo em níveis-traço.

A precisão do método foi avaliada em termos de ensaios de repetibilidade do DNL ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre EDDB, feitos no mesmo dia (*intraday*) e em dias

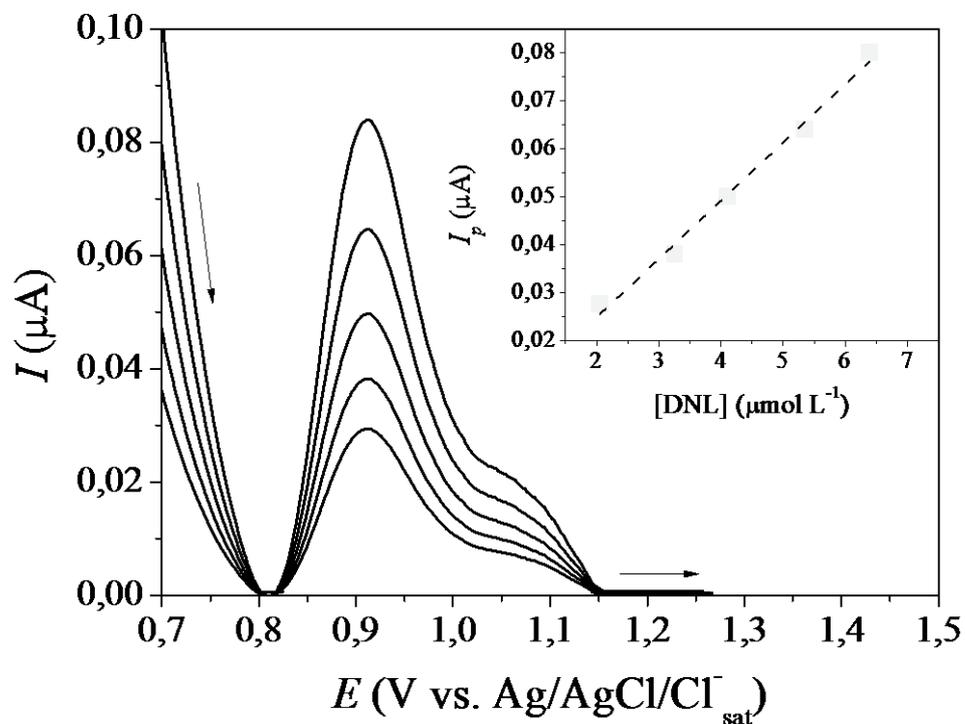
diferentes (*interday*) com um mesmo dispositivo, sendo que os resultados foram expressos em termos de desvio-padrão relativo (DPR) das medidas. Os valores DPR obtidos para as medidas *intraday* (4,71%) foram inferiores àqueles obtidos no procedimento *interday* (9,73%), possivelmente ocasionados por erros aleatórios que se estabeleceram nos diferentes momentos em que as medidas foram realizadas. Todavia, verificou-se que esta diferença não proporcionou grande variância no valor médio dos dados, sugerindo que a precisão do método foi garantida mesmo em baixas concentrações do analito.

Quanto à exatidão, analisada pela repetição do mesmo protocolo eletroanalítico supracitado para a determinação de DNL ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB, mas feito por três diferentes analistas, foi identificado um DPR = 12,5%, grande similaridade no perfil voltamétrico e pequenas alterações na linha de base das medidas, denotando elevada acurácia e confiabilidade do método para possíveis aplicações na eletroanálise de DNL em amostras complexas.

5.6. Aplicação do método

Diante da elevada sensibilidade eletroanalítica do EDDB para a quantificação do DNL, a performance do procedimento então desenvolvido foi avaliada como alternativa para o controle de qualidade deste estrogênio em amostras de Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*). Após a contaminação artificial das cobaias ($5,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$ e $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) para fins de validação do método, uma massa total de 10 g da amostra foi tratada pelo método *QuEChERS*. A análise direta não foi possível em nenhuma das amostras, independente do nível de fortificação, possivelmente devido à variedade de compostos orgânicos presentes no extrato e que também se oxidam sobre o EDDB, concorrendo com o DNL pelos sítios ativos do eletrodo de trabalho. Deste modo, para aumentar a sensibilidade do método, a eletroanálise do EDDB foi feita pelo método da adição de padrão. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos para os experimentos de recuperação do DNL sobre EDDB, a um nível de fortificação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Em geral, os valores percentuais de recuperação variaram entre 88,5% ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e 96,2% ($9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), que são valores considerados adequados para os níveis de fortificação trabalhados. Esses dados também atestam a credibilidade do método eletroanalítico proposto para o controle de qualidade de DNL em produtos da piscicultura, a exemplo da Tilápia-do-Nilo.

Figura 16 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em experimentos de recuperação do DNL ($1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre EDDB pré-ativado catodicamente, em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $f = 150 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Curva analítica obtida pelo método da adição de padrão, seguindo os mesmos critérios descritos em "A".



Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÕES

O estrogênio sintético DNL sofre processo de oxidação irreversível sobre EDDB pré-ativado catodicamente, sendo que tal reatividade se torna mais evidente em meio ácido, particularmente em pH = 2,0. Os estudos com VC, realizados em diferentes velocidades de varredura, comprovaram que os produtos desta reação redox adsorvem sobre a superfície do eletrodo de trabalho, mas a resistência à passivação singular do diamante dopado com boro possibilitou que a simples agitação mecânica do meio (período de 60 s) fosse suficiente para renovar a área ativa, recuperando o sinal eletroanalítico e garantindo elevada sensibilidade, precisão e acurácia das medidas.

Aliando as melhores condições experimentais (EDDB pré-ativado catodicamente; solução-tampão Britton-Robinson a pH = 2,0; agitação prévia de 60 s antes de cada medida) e operacionais da VOQ ($f = 150$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV), foi possível detectar baixas concentrações do DNL, com LD = $5,43 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e LQ = $1,81 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, utilizando um modelo de regressão matemática de alta correlação ($r^2 = 0,9987$) e que explica boa parte da variância dos dados. A precisão (*intraday* e *interday*) e exatidão (mesmo protocolo analítico repetido por três diferentes analistas) das medidas foi comprovada pelos baixos valores de %DPR, que se mantiveram abaixo de 13,0 % para um nível de fortificação de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O método foi aplicado com êxito na eletroanálise de DNL em Tilápia-do-Nilo (*Sarotherodon niloticus*), após fortificação da biomassa em diferentes níveis ($5,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$ e $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e extração do conteúdo estrogênico pelo método *QuEChERS*. Os valores satisfatórios de recuperação (88,5 - 96,2 %) confirmaram a credibilidade do método eletroanalítico proposto para o controle de qualidade de DNL em produtos da piscicultura, a exemplo da Tilápia-do-Nilo, utilizada EDDB pré-ativado catodicamente como superfície de trabalho.

REFERÊNCIAS

AHMAD H. ALGHAMDI. Applications of stripping voltammetric techniques in food analysis. **Arabian Journal of Chemistry**, Volume 3, Issue 1. Pages 1-7, January 2010.

ARANA, L. V. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aquicultura: Uma Revisão para Peixes e Camarões**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

AYROZA, L.M.S.; ROMAGOSA, E.; AYROZA, D.M.M.R.; SCORVO, J.D.; SALLES, F.A. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia do nilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40, n.2, p.231-239, 2011.

BAHADIR E. B., SEZGINTÜRK. M. K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. **Biosensors and Bioelectronics**, Volume 68, Pages 62-71 15 June 2015.

BALULA, T.L.A. Avaliação dos efeitos histológicos ao nível de brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição a cloreto de benzalcônio. Porto, Portugal. Universidade Fernando Pessoa, 2011. 40p. **Tese Mestrado**.

BANDA, G. R. S., Estudos da eletroquímica do diamante dopado com boro e da sua superfície modificada com catalisadores para a oxidação de metanol e etanol, São Carlos, 2006. p. 1 - 3. **Tese de doutorado**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BARROS, R. C. M. de; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. da S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**. v. 28 n.2. 2005.

BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; VINCENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 29(1), 81-85, 2007.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. **The electrochemistry of gold: II the electrocatalytic behaviour of the metal in aqueous media**. Gold Bull. 1998, 31, 39.

CANLE M., PÉREZ M. I. F., SANTABALLA J. A. Photocatalyzed degradation/abatement of endocrine disruptors. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Volume 6, Pages 101-138, August 2017.

COSTA, G.M.; ORTIS, R.C.; LIMA, M.G.; CASALS, J.B.; LIMA, A.R.; JR KFOURY, J.R. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9), 947-950, 2012.

DAVIS, D.L., BRADLOW, H.L. **Can Environmental Estrogens Cause Breast Cancer?** Scientific American. p.166, October 1995.

DE SOUZA D.; MACHADO S. A. S.; AVACA L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quím. Nova**, vol.26. n.º.1 São Paulo Jan./Feb, 2003.

DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M.; MEIRELLES, C. F. Resíduos de Anabolizantes na Produção Animal: Importância e Métodos de Detecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3/4, p. 731-737, jul/ago, 2002.

EDWARDS, P. **Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends**. Volume 447, Pages 2–14. 1 October 2015.

FALONE, S. Z. Desenvolvimento de Métodos para a Determinação do Hormônio 17 α –Metiltestosterona em Amostras de Água e de Sedimentos de Piscicultura: ensaios Ecotoxicológicos com Cladóceros. **Tese Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2007.

FAO – Organização Das Nações Unidas Para a Agricultura E Alimentação. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2010.

FERNÁNDEZ, H. *et al.* Novel studies about the electrochemical reduction of progesterone (P4) in acetonitrile at glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.619-620,p. 46-52, 2008.

FERNÁNDEZ, H. *et al.* Studies about the adsorption of progesterone (P4) at glassy carbon electrodes in aqueous buffer solution by square wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 629, p.133-137, 2009.

FERREIRA, L. M. M. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação de Cu, Fe e Zn em água empregando eletrodo de diamante dopado com boro. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós Graduação em Química – Universidade Federal do Amazonas, 2013.

FISHER, A.E.; SHOW, Y.; SWAIN, G.M. Electrochemical performance of diamond thin-film electrodes from different commercial sources. **Analytical Chemistry**, v.76, p.2553-60, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food outlook**: biannual report on global food markets. Rome: FAO, 2013. 134p.

FORSTER, E. E.; SCHELLER, F. W.; BIER, F. F. Detection of progesterone in whole blood samples. **Biosensors & Bioelectronics**, v.18, p. 375-380, 2003.

GAJEWSKI, W.; ACHATZ, P.; WILLIAMS, O.A.; HAENEN, K.; BUSTARRET, E.; STUTZMANN, M.; GARRIDO, J.A. Electronic and optical properties of boron-doped nanocrystalline diamond films. **Physical Review B**, v.79, 2009.

GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Detection of DNA nucleotides on pretreated boron doped diamond electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 2011, 22, 1241.

GUEDES-ALONSO R., SOSA-FERRERA Z., SANTANA-RODRÍGUEZ J. J. Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction

coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry **Food Chemistry**, Volume 237, Pages 1012-1020. 15 December 2017.

GUIMARÃES, T. S. Detecção e Quantificação dos Hormônios Sexuais 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3), Estrona (E1) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2) em Água de Abastecimento: Estudo de Caso da Cidade de São Carlos, com Vistas ao Saneamento Ambiental. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2008.

HAITHAM G. ABO-AL-ELA. **Hormone and fish monosex farming: A spotlight on immunity Fish & Shellfish Immunology**, Volume 72, Pages 23-30. January 2018.

HART, J. P. *et al.* Studies towards a disposable screenprinted amperometric biosensor for progesterone. **Biosensors & Bioelectronics**, v.12, p. 1113-1121, 1977.

HE X. P., LIAN Z. R., TAN L. J., WANQ J. T. Preparation and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for selective trace extraction of dienestrol in seawater. **J Chromatogr A**.Volume 1469:8-16. Oct 2016.

HONG H., BRANHAM W. S., NG H. W., MOLAND C. L., DIAL S.L., FANG H., PERKINS R., SHEEHAN D., TONG W. Human sex hormone-binding globulin binding affinities of 125 structurally diverse chemicals and comparison with their binding to androgen receptor, estrogen receptor, and α -fetoprotein. **Toxicol Sci.** 143(2):333-48. 2015.

ISMAIL N. A. H., WEE S. Y., ARIS A. Z. **Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota Chemosphere**, Volume 188, Pages 375-388, December 2017.

JIN, G.; LIN, X. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 3556-3562, 2005.

JOVANOVSKI V., HOČEVAR S. B., OGOREVC B. **Bismuth electrodes in contemporary electroanalysis Current Opinion in Electrochemistry**, Volume 3, Issue 1, Pages 114-122, June 2017.

JOHN, J.; O'DEA, JANET OSTERYOUNG AND ROBERT, A. OSTERYOUNG., **Theory of square wave voltammetry for kinetic systems**. Analytical chemistry, 1981. v.53, no4, p.695-701.

KACLOCK, R.J. *et al.* **Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored Worksshp. Enviromental Health Perspectives**, 104, 717-740, 1996.

KANE, M. *et al.* Development and validation of a biosensorbased immunoassay for progesterone in bovine milk. **Journal of Immunological Methods**, v.267, p. 131-138, 2002.

KAPPEL, N. D.; PROLL, F.; GAUGLITZ, G. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. **Biosensors & Bioelectronics**, v.22, p. 2295-2300, 2007.

KUBITZA, F. **Qualidade da Água na produção de peixes**. Panorama da Aquicultura, março/abril, 1998.

LIAN A., LI X., JIANG Q. Irisin inhibition of growth hormone secretion in cultured tilapia pituitary cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Volume 439, Pages 395-406, 5 January 2017.

LI C. M., HU W. Electroanalysis in micro- and nano-scales. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Volume 688, Pages 20-31, 1 January 2013.

LIMA, C. A.; Determinação eletroanalítica do hormônio progesterona em fármacos utilizando o eletrodo de filme de bismuto. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2012.

LIN X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nanoclusters/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensores & Bioelectronics**, v. 22, p. 253-259, 2006.

LIU S., CHEN H., XU X. R., HAO Q.W., YING G. G. Three classes of steroids in typical freshwater aquaculture farms: Comparison to marine aquaculture farms. **Science of The Total Environment**, Volume 609, Pages 942-950, 31 December 2017.

LOURENÇÃO, B.C., Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro, São Carlos, 2009. p. 42 – 50. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

LUCCHESI, T.; BATALHA, M. O. Produção de camarão marinho no Estado de São Paulo: um estudo de viabilidade utilizando indicadores de competitividade de cadeia produtiva. IN: IV Congresso Internacional de Economia e Gestão de Redes Agroalimentares. **Anais do congresso**. Ribeirão Preto: USP – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, 2003.

LUONG, H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **Analyst**, v. 134, p. 1965 – 1979, 2009.

MARTIN, H. B.; ARGOITIA, A.; LANDAU, U.; ANDERSON, A. B.; ANGUS, J. C. Hydrogen and oxygen evolution on boron-doped diamond electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**. 1996, 143, L133.

MAY, P.W.; LUDLOW, W.J.; HANNAWAY, M.; SMITH, J.A.; ROSSER, K.N.; HERAD, P.J. Boron doping of microcrystalline and nanocrystalline diamond films: where is the boron going? **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v.1039, 2008.

MENKE, A.L.; SPITSBERGEN, J.M.; WOLTERBEEK, A.P.; WOUTERSEN, R.A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, 39(5), 759-775, 2011.

MIGLIORINI, Fernanda Lanzoni. Produção e caracterização de eletrodos de diamante dopados com boro crescidos sobre titânio, aplicados na degradação de corante têxtil. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Engenharia e Tecnologia/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) – São José dos Campos : INPE, 2011.

MIGLIORINI, F. L.; VASCONCELOS, V.; ALVES, S. A.; LANZA, M.; BALDAN, M. R.; FERREIRA, N. G. **Ecotoxicity measurements of degraded Textile dye by electrochemical process using boron-doped diamond electrodes**. ECS Transactions, 64: 25- 31, 2015.

MONTAGNOLLI, W. et al. Poluição Ambiental Associada à Aquicultura. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; WENDLAND, E. **Bacia Hidrográfica: Diversas Abordagens em Pesquisas**. São Carlos: RiMa. V.3, p. 126-140, 2004.

MORAES, R.R. ; MOURA, S.L. ; SANTOS, M.A.P ; LOPES, J.A.D ; SANTOS, J.A.V ; SANTOS JÚNIOR, J.R. Estudo Eletroquímico Da Progesterona Sobre Eletrodo Modificado Com Óxido De Cobalto. **Anais do congresso**. 51º Congresso Brasileiro de Química, São Luiz – MA, 2011.

MOURA, B. R.; ESTEVES, N. M.; TEIXEIRA, V.M ; ARANTES, T. M; BALDAN, M. R.; FERREIRA, N. G.; SOUZA, F. C.; D'ELIA, E. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro como um Novo Sensor de Enxofre Elementar. **Rev. Virtual Quim.**, 2015, 7, 1795-1809.

NADARAJAH S., FLAATEN O. **Global aquaculture growth and institutional quality Marine Policy**, Volume 84, Pages 142-151, October 2017.

NORLI H. R., CHRISTIANSEN A., DERIBE E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Volume 1218, Issue 41, Pages 7234-7241, October 2011.

NESLÁDECK, M.; MARES, J.J.; TROMSON, D.; MER, C.; BERGONZO, P.; HUBIK, P.; KRISTOFIK, J. Superconductivity and low temperature electrical transport in B-doped CVD nanocrystalline diamond. **Science and Technology of Advanced Materials**, v.7, p.S41-44, 2006.

OLIVEIRA, T. M. B. F. Biossensores enzimáticos para detecção e quantificação de carbamatos em amostras de alimentos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2013.

OSTERYOUNG J. G., OSTERYOUNG R. A. Square wave voltammetry - **Analytical Chemistry**, - ACS Publications, 1985.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Brasília, DF, 2008.

PAIVA W. D. A. Determinação de imidacloprid utilizando eletrodo de carbobo vítro modificado com nanotubos de carbono funcionalizados. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, 2017.

PALI M., GARVEY J. E., SMALL B., SUNI I. I. **Detection of Fish Hormones by Electrochemical Impedance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance Sensing and Bio-Sensing Research**, Volume 13, Pages 1-8 April 2017.

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A.; Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Quimica Nova**, Vol. 26, N. 6, 844-849, 2003.

PEGADO, E. A. C.; Impactos da legislação ambiental brasileira na exportação de camarões, um estudo com exportadores de camarão do Rio Grande do Norte. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN 2004.

PLESKOV, Y., **Russian Journal Of Electrochemistry**, 2002, V. 38, N. 12, P. 1275-1291.

PORTELA, R. R. Determinação eletroanalítica de nitrofurantóina (NFT) em fármaco e em fluido biológico utilizando eletrodo de diamante dopado com boro. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. **Recent Advances In Electrochemistry Of Diamond. Diamond And Related Materials**, 2000, N. 9, P. 384-389.

RIBEIRO, W. F. Análise de traços do pesticida carbendazim por voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2009.

ROCHA C. M. C. da; RESENDE E. K. de; ROUTLEDGE E. A. B.; LUNDSTEDT L. M. **Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.48, n.8, p.iv-vi, ago. 2013.

SANTOS, K. D. Determinação Eletroanalítica dos Hormônios Estriol e Estrona em Amostras de Formulações Farmacêuticas, Fluidos Biológicos e Alimentos, **Tese Doutorado** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2013.

SARTORI, E. J. R. Determinação Voltamétrica de Analitos de Interesse Farmacêutico Utilizando um Eletrodo de Diamante Dopado com Boro. **Tese de Doutorado**, São Carlos: UFSCar, 2009.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – Sebrae, Brasília-DF, 2015.

SILVA, M. R. C. Utilização de metodologia eletroanalítica para estudos de adsorção de pesticidas triazínicos em amostras de sedimentos do rio Mogi-Guaçu – SP. **Tese de**

Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SKAKKEBAEK, N.E., TOPPARI, J., *et al.* **Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection?** APMIS 106:3-12. 1998.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; **Pinciples of Instrumental Analysis**, 5a ed., Harcourt Brace, 1998;

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**. v. 26. n. 1. p. 81-89. 2003.

SOUZA, D. De, CODOGNOTO, L., MALAGUTTI, A. R., TOLEDO, R. A., PEDROSA, V. A., OLIVEIRA, R. T. S., MAZO, L. H., *et al.* (2004). Revisão. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. **Química Nova**, 27(5), 790–797.

SPEARKS K. E; DISMUKES E. J. P., Synthetic Diamond-Emerging Cvd. **Science And Technology**, 1994, New York, John Wiley And Sons.

SWART, J. W. Materiais elétricos: fundamentos e semicondutores. **UNICAMP**, v.1, p.400, 2004.

TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada a aquicultura**. Funep, Jaboticabal, 1994.

USLU B., OZKAN S. A. Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments - **Analytical Letters**, 2011.

XU, Y. F.; VELASCO-GARCIA, M.; MOTTRAM, T. T. Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk. **Biosensors & Bioelectronics**, v.20, p. 2061-2070, 2005.

YANG, C. e Colaboradores. Voltammetric determination of estrone based on the enhancement effect of surfactant and a MWNT film electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 29. p. 1741–1745, 2009.

ZHANG, R. J., LEE, S. T., LAM, Y. W. Characterization of heavily boron doped diamond. **Diamond And Related Materials**, 1996, N 5, P 1288-1234.