



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



JÉSSICA LEMOS DE MOURA SANTIAGO

**DETERMINAÇÃO DE TESTOSTERONA EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA
UTILIZANDO UM ELETRODO DE OURO DE BAIXO CUSTO MODIFICADO COM
POLIANILINA E NANOPARTÍCULAS DE OURO**

TERESINA

2018

Jéssica Lemos de Moura Santiago

**DETERMINAÇÃO DE TESTOSTERONA EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA
UTILIZANDO UM ELETRODO DE OURO DE BAIXO CUSTO MODIFICADO COM
POLIANILINA E NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suely Moura Melo

Área de Concentração: Físico-Química

TERESINA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí Biblioteca
Setorial do CCN

S235d Santiago, Jéssica Lemos de Moura.

Determinação de testosterona em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de ouro de baixo custo modificado com polianilina e nanopartículas de ouro / Jéssica Lemos de Moura Santiago. – Teresina, 2018.

72 f. il. color

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Suely Moura Melo.

1. Físico-Química. 2. Nanopartículas de Ouro. 3. Testosterona. 4. Sensor Eletroquímico I. Título

CDD 541.37



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Núcleo de Pesquisa em Ciências Básicas - Bloco A
Campus Ministro Petrônio Portella – CEP. 64.049-550 - Teresina / PI –
Fone: (086) 3237 1584, ppgquimica@ufpi.edu.br - www.ufpi.br/ppgquimica



ATA DE DEFESA DA 222 DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidata: Jéssica Lemos de Moura Santiago

Ao vigésimo sexto dia do mês de Abril de dois mil e dezoito, às dezesseis horas e trinta minutos, reuniu-se, no Auditório do Departamento de Química BI 02, Auditório José Roberto Oliveira Torres, da Universidade Federal do Piauí, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPI, a Comissão Julgadora composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Jose Ribeiro dos Santos Junior(orientador/presidente), Prof. Dr.Roberto Alves de Sousa Luz(membro interno/UFPI), Profa. Dra.Inês Maria de Souza Araujo(membro externo/UFPI) e Prof. Dr.Welter Cantanhede da Silva(suplente/UFPI), para a Defesa de Dissertação de Mestrado, sob o título: **“DETERMINAÇÃO DE TESTOSTERONA EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA UTILIZANDO UM ELETRODO DE OURO DE BAIXO CUSTO MODIFICADO COM POLIANILINA E NANOPARTÍCULAS DE OURO”**, apresentada por **Jéssica Lemos de Moura Santiago**. Ao final dos trabalhos, a Comissão Julgadora reuniu-se em sessão secreta para o julgamento e atribuição de pareceres. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPI, o candidato foi considerado APROVADA. Encerrada a sessão secreta, o presidente informou ao público presente o resultado do consenso. Nada mais havendo a tratar, a reunião foi encerrada e, para constar, eu, José Milton Elias De Matos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química, lavrei a presente ata, que assino como os demais membros da Comissão Julgadora.

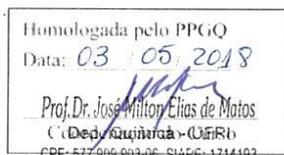
Prof. Dr. Jose Ribeiro dos Santos Junior
(orientador/presidente/UFPI)

Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz
(membro interno/UFPI)

Profa. Dra.Inês Maria de Souza Araújo
(membro externo/UFPI)

Prof. Dr.Welter Cantanhede da Silva
(suplente/UFPI)

Teresina, 26 de Abril de 2018.


Prof. Dr. Jose Ribeiro dos Santos Junior
Presidente

A meu marido Carlos César pelo apoio e incentivo. Sem você, eu não conseguiria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar força, paciência e determinação durante os momentos difíceis que passei em minha caminhada científica no mestrado. À santa Teresinha, por sua intercessão.

Ao meu querido marido Carlos César, pelo apoio e amor incondicional, por existir na minha vida e me fazer muito feliz.

Meus pais, Eduardo e Ana Lúcia, pelas lições valiosas que me deram todos esses os anos, representando meu maior exemplo de generosidade, humildade e amor.

Aos meus queridos irmãos, Luciana, Vanessa e Edésio por sempre estarem ao meu lado e me incentivando a fazer o meu melhor.

Aos amigos de longa data, Saara, Rômulo, Ramiro, Rhutênio, Bruna, Sthefanny e Emmanuely pela ajuda e consultas psicológicas gratuitas durante este período de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Ribeiro, pela paciência e atenção, por me acolher como orientanda e compartilhar ensinamentos nesses dois anos.

À Prof^a. Dr^a. Suely, por toda consultoria e trabalho conjunto em várias horas de laboratório durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de laboratório Maelson, Dy Nápoles e especialmente à Thalyta, Natália e Inês meus sinceros agradecimentos pelas dicas, conselhos, risadas e nervosismo conjunto durante a pesquisa e o dia-a-dia do laboratório que se tornou mais leve com a contribuição de vocês. Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí por fornecer a formação de profissionais em nível de mestrado.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Instituto Federal do Piauí (IFPI), por permitir análises de microscopia.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que contribuíram para o mestrado, muito obrigada!

*Quanto mais me
aprofundo na
Ciência mais me
aproximo de Deus*
Albert Einstein

*Na vida, não
existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido.*
Marie Curie

RESUMO

O controle por meio de análises toxicológicas nos esportes tem sido o modo mais eficaz de reprimir o *doping* de testosterona e derivados em atletas, pois muitos se arriscam com o uso de substâncias banidas pela promessa de maior desempenho físico e crescimento muscular acentuado. Desta forma, em consequência da necessidade de novas metodologias mais sensíveis e econômicas para determinação de testosterona, neste trabalho desenvolveu-se um sensor eletroquímico de baixo custo a partir da modificação de superfície de um eletrodo de ouro com filme de polianilina (PANI) e nanopartículas de ouro (Au NPs), empregando-se a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Após a otimização das condições experimentais de preparo, o eletrodo resultante apresentou dois pares de picos redox nos voltamogramas em torno de 0,4 e 0,7 V que foram elucidados através de um mecanismo proposto. A análise por microscopia eletrônica de varredura também permitiu a visualização dos filmes de PANI depositados, bem como a distribuição das Au NPs com um tamanho médio de 218 nm na superfície do eletrodo. O eletrodo modificado com PANI e Au NPs exibiu uma resposta linear para detecção de testosterona na faixa de 1 nmol L⁻¹ a 173 μmol L⁻¹, com limite de detecção de 0,4 nmol L⁻¹ e limite de quantificação de 1,3 nmol L⁻¹. A aplicação do eletrodo em amostras de urina sintética ocorreu com sucesso, alcançando valores de recuperação de 91,5 a 105,4% e precisão de 1,4 e 0,8%. Assim, o eletrodo modificado com PANI e Au NPs se mostrou como uma alternativa promissora de sensor eletroquímico para testosterona com análise simples, sensível, seletiva, de baixo custo, rápida e que pode vir a ser uma sugestão para testes *antidoping* de verificação em esportes.

palavras-chave: nanopartículas de ouro, polianilina, testosterona, sensor eletroquímico.

ABSTRACT

Controlling by toxicological testing in sports has been the most efficient way to suppress testosterone's doping in athletes, due to the risk of using banned substances by these professionals just for the promise to increase physical performance and muscle growth. Thus, this work developed a low cost electrochemical sensor from a surface modification of a gold electrode with polyaniline film (PANI) and gold nanoparticles (Au NPs), using cyclic voltammetry electrochemical technique, based on the need of a more sensitive and economical methodologies for testosterone determination. After the optimization of experimental conditions of preparation, the resulting electrode presented two pairs of redox peaks in the voltammograms around 0,4 and 0,7 V elucidated through a proposed mechanism. The analysis through scanning electron microscopy also allowed the visualization of PANI films deposited, as well as the distribution of gold nanoparticles with average size of 218 nm in electrode surface. The modified gold electrode with PANI film and Au NPs showed a linear response for testosterone detection in the range of 1 nmol L⁻¹ to 173 μmol L⁻¹, with detection limit of 0,4 nmol L⁻¹ and quantification limit of 1,3 nmol L⁻¹. The electrodes application in synthetic urine samples was a success, reaching recovery values between 91,5 to 105,4% and precision of 1,4 and 0,8%. So, modified electrode revealed as a promising electrochemical sensor with simple, sensitive, selective, low cost, fast analysis to testosterone determination and which it can be an alternative suggestion for sports check antidoping tests in the future.

keywords: gold nanoparticles, polyaniline, testosterone, electrochemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química da testosterona.....18**
- Figura 2 – Estrutura da PANI.....23**
- Figura 3 – A) Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos utilizada. EA = eletrodo auxiliar; ER = eletrodo de referência; ET = eletrodo de trabalho. B) Representação esquemática de uma microcélula.....31**
- Figura 4 – Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de ouro, desenvolvido por MELO, S. M. 2016.....32**
- Figura 5 – Esquema para etapas de modificação do eletrodo de ouro.....33**
- Figura 6 – Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro na limpeza eletroquímica, com $v = 250 \text{ mV s}^{-1}$; 3º ciclo; em contato com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$38**
- Figura 7 – Voltamogramas cíclicos obtidos A) para o crescimento do filme de PANI no eletrodo de ouro em solução de anilina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ no eletrólito de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; B) eletrodo de ouro limpo em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura a 50 mV s^{-1} , no mesma faixa de potencial aplicada à eletrossíntese de PANI.....39**
- Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos de filmes finos de PANI depositados em eletrodo de ouro por diferentes concentrações de anilina ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mmol L^{-1}), em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 0,96), 10º ciclo, a 250 mV s^{-1}40**
- Figura 9 – Voltamogramas cíclicos resultantes (1º varredura) dos eletrodos de ouro após polimerização da anilina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a 10 ciclos em diferentes velocidades de varredura: A) 25 mV s^{-1} , B) 50 mV s^{-1} e C) 100 mV s^{-1}42**
- Figura 10 – A) Eletrodeposição de PANI a partir de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de anilina em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 no eletrodo de ouro, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , variando o**

número de varreduras de deposição de 1 a 40 ciclos; B) Dependência do crescimento da corrente de picos anódicos e catódicos em relação ao número de ciclos utilizados durante o processo de polimerização de anilina até 30 ciclos.....44

Figura 11 – Voltametrias cíclicas para o eletrodo de ouro sem modificação e com PANI em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 250 \text{ mV s}^{-1}$ mostrando os mecanismos reacionais para os dois pares redox presentes. EAu = eletrodo de ouro (SONG, E.; CHOI, J.W., 2013).....45

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos obtidos A) dos eletrodos de ouro modificados com PANI e Au Nps variando o número de varreduras de deposição do ouro de 2 e 4 ciclos em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a 250 mV s^{-1} e B) eletrodos de ouro modificados com PANI e Au Nps na presença de $1.10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ de testosterona para comparativos entre o número de ciclos de deposição do ouro; em contato com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} 46

Figura 13 – Voltamograma cíclico típico do eletrodo de ouro sem modificação em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência de testosterona, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 48

Figura 14 – VCs do eletrodo de ouro (EAu) modificado com PANI e Au NPs A) durante (100 mV s^{-1} e B) pós deposição de NPs em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a 250 mV s^{-1} 48

Figura 15 – Fotomicrografias de MEV de A) EAu limpo, B) EAu/PANI e C) EAu/PANI/Au NPs.....50

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos do EAu/PANI/Au NPs em velocidades de varreduras de 50 a 250 mV s^{-1} em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,51).....51

Figura 17 – Representação do processo de transferência eletrônica através do logaritmo da corrente do pico anódico (A) vs o logaritmo da velocidade de varredura (V s^{-1}). Correntes obtidas em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 52

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir do eletrodo modificado na presença de quantidades crescentes de testosterona em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} 53

Figura 19 – Esquema do mecanismo proposto para detecção de testosterona pelo EAU/PANI/Au NPs em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ (pH = 1,51) a 50 mV s⁻¹.....54

Figura 20 – A) Voltamogramas cíclicos do EAU/PANI/Au NPs para determinação de testosterona, variando as concentrações de 1nmol L⁻¹ a 100 μmol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e curva de calibração da B) Corrente de pico catódico vs Concentração e C) Corrente de pico catódico vs logaritmo da Concentração do EAU/PANI/Au NPs para detecção de testosterona.....55

Figura 21 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs para determinação de testosterona com concentrações feminina (1,3 nmol L⁻¹) e masculina 20 nmol L⁻¹, no qual a cor (—) corresponde a solução de urina com pH = 5,00 e a cor (—) à amostra de urina com pH = 1,69.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	28
Tabela 2 – Dados de recuperação para amostras de urina sintética com adição de testosterona em diferentes concentrações.....	57
Tabela 3 – Comparação de sensores eletroquímicos para testosterona.....	58

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AMA	Agência Mundial Antidopagem
Au	Ouro
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EA	Eletrodo Auxiliar
EAA	Esteróides Andrognicos Anablicos
E Au	Eletrodo de ouro
ER	Eletrodo de Referência
EMQ	Eletrodos Modificados Quimicamente
ET	Eletrodo de Trabalho
IES	Ionizao à Eletrospray
ipa	Corrente de pico anódica
ipc	Corrente de pico catódica
LD	Limite de deteco
LQ	Limite de quantificao
MIP	Polímeros moleculamente impressos
NPs	Nanopartículas de ouro
PANI	Polianilina
v	Velocidade
V	Potencial
VC	Voltametria Cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Principais métodos analíticos para a determinação de testosterona.....	18
2.2 Sensores eletroquímicos e eletrodos quimicamente modificados para a detecção de testosterona.....	21
2.3 Urina sintética.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1 Reagentes.....	28
4.2 Preparo de soluções.....	28
4.2.1 Solução diluída de ácido sulfúrico.....	28
4.2.2 Solução de anilina.....	29
4.2.3 Solução de ácido cloro-áurico.....	29
4.2.4 Solução de testosterona.....	29
4.2.5 Urina sintética.....	30
4.3 Instrumentação básica.....	30
4.4 Preparo dos eletrodos.....	32
4.4.1 Confeção do eletrodo de trabalho.....	32
4.4.2 Limpeza dos eletrodos.....	33
4.4.3 Eletropolimerização da anilina.....	33
4.4.4 Eletrodeposição de nanopartículas de ouro.....	34
4.5 Desempenho do eletrodo modificado.....	34
4.6 Validação do método eletroanalítico.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Voltamograma cíclico típico do eletrodo de ouro	37
5.2 Eletrossíntese da polianilina (PANI).....	38
5.2.1 Efeito da concentração.....	40
5.2.2 Influência da velocidade de varredura.....	42
5.2.3 Escolha do número de ciclos.....	43
5.2.4 Comportamento eletroquímico do filme de polianilina (PANI) formado.....	45

5.3 Deposição eletroquímica de nanopartículas de ouro (Au NPs).....	46
5.4 Caracterização do eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro (EAu/PANI/Au NPs).....	49
5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
5.4.2 Atividade eletroquímica do eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro (EAu/PANI/Au NPs) em diferentes velocidades de varredura.....	51
5.5 Curva analítica para a determinação de testosterona por voltametria cíclica.....	52
5.6 Aplicação do eletrodo modificado em amostras de urina sintética.....	55
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias que proporcionam o aumento do desempenho muscular e cultivo do aspecto físico por atletas profissionais, mesmo sendo proibido pela Agência Mundial Antidopagem (AMA), é ainda uma prática comum desde a década de 50 (MOURA et al, 2014; ALQURAINI et al, 2017). A promessa do crescimento da musculatura, melhorias na função sexual, longevidade, alcance do peso ideal, incluindo aumento de resistência; também desperta o interesse em amadores do esporte (ANAWALT, B. D., 2017). Contudo, o termo *doping* foi criado para se referir apenas aos atletas que apresentarem níveis de substâncias acima do tabelado pelos comitês responsáveis por competições (FORSDAHL et al, 2015).

Neste contexto, os esteroides androgênicos anabolizantes (EAA), em especial a testosterona ($C_{19}H_{28}O_2$) e seus derivados, quando são empregados de forma abusiva e indiscriminada, podem causar sérios efeitos adversos, tais como danos endocrinológicos, cardiovasculares e lesões a vários órgãos (ROCHA et al, 2014).

A detecção e o monitoramento do abuso de andróginos, desta forma, tornam-se fundamentais para manter condições igualitárias e preservar a saúde dos atletas (BOWERS, L. D., 2009). Entretanto, as técnicas analíticas atualmente utilizadas para verificação de *doping* em esportes como a espectrometria de massas, a cromatografia gasosa e o imunoensaio apresentam certa morosidade, são relativamente caras, exigem grande volume de amostra e técnicos qualificados, havendo assim a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias para testes *antidoping* (SLUIS et al, 2012).

Devido à sua simplicidade, rapidez de análise e baixo custo operacional, as técnicas eletroquímicas surgem como métodos alternativos que vêm apresentando boas aplicações em diversas áreas, inclusive para a determinação de moléculas eletroativas em fluidos fisiológicos (OSTOJIC et al, 2017; MANJUNATHA, J. G., 2017). A voltametria cíclica (VC), por exemplo, é uma técnica eletroquímica que permite a caracterização do comportamento de analitos que podem ser oxidados ou reduzidos em um sistema, sendo que possibilita também que eletrodos modificados quimicamente (EMQ) com novos materiais possam ser utilizados como eletrodos de trabalho (JI et al, 2017). Os EMQ's para o desenvolvimento de sensores fornecem um pré-estabelecimento de características físico-químicas que controlam a natureza da superfície de contato do eletrodo detector com a solução que contém o analito a ser analisada, tornando os eletrodos mais reativos e facilitando a aplicação em estudos eletroquímicos (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Os sensores eletroquímicos que têm em sua base nanomateriais, por sua vez, minimizam problemas relacionados à seletividade e sensibilidade, principalmente nanomateriais como nanocompósitos, pois estes possuem na sua estrutura bases poliméricas que oferecem propriedades catalíticas melhoradas para o desenvolvimento dos sensores (SHAMSIPUR et al, 2015). A transferência eletrônica facilitada pela incorporação de nanopartículas de metais inorgânicos em filmes poliméricos, também é outra característica comprovada em várias pesquisas, fato que é associado à excelente condutividade que esses tipos de nanopartículas oferecem nesta interação com polímeros (ZHAO et al, 2017).

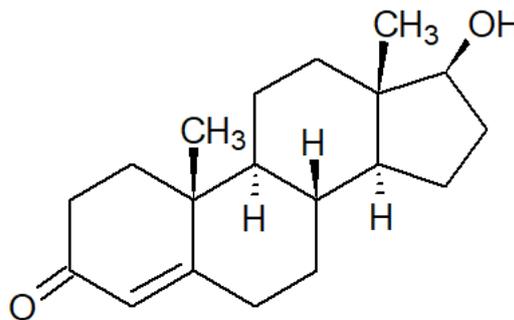
Tendo em vista essas informações, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a determinação de testosterona, com base na modificação de um eletrodo de ouro, confeccionado em laboratório, com polianilina (PANI) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (Au NPs) por voltametria cíclica. O método proposto exibiu uma resposta seletiva, sensível e rápida em amostras de urina sintética que continham o andrógino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Principais métodos analíticos para a determinação de testosterona

A testosterona (Fig. 1), juntamente com seus derivados, faz parte do grupo de hormônios esteroides androgênicos, ocorrendo a sua produção natural pelos testículos, córtex das glândulas adrenais e também em pequenas quantidades pelos ovários nas mulheres. Possui várias aplicações médicas para os humanos, como na terapia de reposição hormonal, efeito contraceptivo e no tratamento de câncer (MÉITÉ et al, 2016).

Figura 1 – Estrutura química da testosterona



Fonte: Adaptado de Pitarch-Motellón et al. (2017, p. 75).

Segundo Luo et al., medições com precisão dos níveis de testosterona são muito importantes para o estudo da fisiologia reprodutiva e a influência deste hormônio sobre a saúde dos seres humanos, fazendo-se necessária a determinação analítica por diferentes metodologias (LUO et al, 2017). A AMA, órgão internacional competente pela detecção de *doping* nos esportes, estabelece como padrão a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para a identificação e quantificação do esteroide (PITARCH-MOTELLÓN et al, 2017). O controle tem sido realizado através de exames toxicológicos de fluidos biológicos dos atletas durante as competições e também no decorrer dos treinos, de modo que, devido à baixa volatilidade da testosterona e excreção como conjugados de sulfato ou glicuronídeo, é essencial que uma hidrólise e uma derivação sejam feitas após a extração e antes da análise de CG-EM, dificultando a automação e tornando a extração mais complexa para este método (CAMPOS et al, 2005; MCDONALD et al, 2011).

Como resultado, a literatura relata várias pesquisas relacionadas ao aprimoramento de análises em CG-EM para determinação do andrógino.

Hadeif e colaboradores (2008) desenvolveram um método alternativo para determinação simultânea de nove esteroides anabolizantes, incluindo a testosterona, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A otimização para este método foi realizada por um procedimento de derivatização baseado em uma metodologia de superfície de resposta. As melhores condições de derivatização foram obtidas por um modelo matemático que permitiu avaliar os principais fatores como temperatura e tempo de reação, sendo que após as condições ótimas serem estabelecidas, através de parâmetros analíticos como linearidade (todos os coeficientes de regressão $r > 0,99$) e sensibilidade (faixa de concentração $0,05 - 0,30 \text{ g mL}^{-1}$), o método proposto provou ser uma ferramenta interessante para aprimorar a fase da hidrólise enzimática (HADEF et al, 2008).

Já Impens e colaboradores (2001) relataram testes para determinação de esteroides anabólicos através da cromatografia gasosa com armadilha de íons acoplada à espectrometria de massas usando o hidrogênio como alternativa de gás de arraste. Um gerador de hidrogênio também foi utilizado como fonte para o gás, atribuindo não só vantagens cromatográficas como menor tempo de análise e melhor desempenho, mas também vantagens econômicas ao método por não utilizar apenas o gás hélio, normalmente o gás de arraste padrão para este tipo de análise (IMPENS et al, 2001).

Abdel-Khalik e colaboradores (2013), por sua vez, escreveram uma revisão sobre metodologias analíticas baseadas na cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de esteroides em urina humana e animal, avaliando as relações entre as técnicas analíticas utilizadas e a sensibilidade analítica obtida para os esteroides em questão. Neste estudo, os autores puderam concluir que em muitos trabalhos foram necessárias preparação de amostras e/ou derivatização para se conseguir níveis baixos dos limites de quantificação (LQ), com $LQ \leq 1 \text{ pg mL}^{-1}$, sendo que a sensibilidade ao analito geralmente foi associada ao se utilizar ionização por *eletrospray* (IES) (ABDEL-KHALIK et al, 2013).

Em um estudo semelhante, Cha e colaboradores (2017) descreveram uma metodologia para cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução por ionização a *eletrospray* para análise de esteroides como derivados de trimetilsilil (TMS) em urina humana. Quando comparados os resultados de CG-IES/EM com cromatografia líquida com ionização por *eletrospray* acoplada à espectrometria de massas (CL-IES/EM), os esteroides apresentaram perfis de ionização semelhantes sem dependência com a fase ou derivatização submetida, apresentando coeficientes de regressão na faixa de 0,9641 para 0,9992; enquanto o desvio padrão relativo (DPR%) foi de 9,66 para 22,14. O método proposto

se demonstrou adequado para análise de derivados de TMS em urina humana, podendo ser possivelmente utilizado como teste de *doping* (CHA et al, 2017).

Então, por continuidade do aperfeiçoamento para a detecção de testosterona e derivados, outras técnicas clássicas como o radioimunoensaio (RIE), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida com detector de ultravioleta (CL-UV) ou espectrometria de massa têm sido propostas como alternativa à CG-EM, justamente porque a análise de esteroides é desafiadora, pois com o passar dos anos novas substâncias são incluídas na lista de proibidos ou tem seus limites de detecção alterados pela AMA (SAYYID et al, 2018; ZHANG et al, 2017).

Shrivastav e Kanaujia (2007) desenvolveram um radioimunoensaio (RIE) direto com base no princípio da inibição competitiva para a dosagem sérica da testosterona, usando ^3H como marcador. A força iônica e o baixo pH do tampão foram utilizados para a liberação do esteroide ligado a proteínas presentes no soro. Desta forma, a quantificação de testosterona nas amostras de soro foi realizada por um programa de computador desenvolvido pelos autores, usando o método de regressão linear log-logit e testes foram realizados para comparação de valores de amostras obtidas entre o RIE proposto e o RIE de fase sólida. O método desenvolvido apresentou limite de detecção (LD) de 270 pg mL^{-1} para uma faixa de $1,0 - 10 \text{ ng mL}^{-1}$, sendo que os valores de recuperação se encontraram entre 102,97% e 108,94%. O método proposto demonstrou ser realizado sem fase de extração e com menor custo do que o método cromatográfico, sendo completado em 2 dias (SHRIVASTAV, T. G.; KANAUIA, P. K., 2007).

Já Studzińska e Buszewski (2013) propuseram um procedimento analítico simples, rápido e sensível para a separação e quantificação de vários hormônios esteroides – incluindo a testosterona – em urina utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Com a otimização da metodologia, verificou-se que a fase estacionária octadecil é mais adequada para este tipo de análise, observando-se também que além do tipo de ligante de fase estacionária, o tamanho das partículas influencia no tempo e resolução de análise. A sensibilidade do método proposto foi avaliada comparando-se os resultados da pesquisa com resultados obtidos pelo método padrão de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), concluindo-se que o método em questão tem muitas vantagens na determinação de esteroides, como na separação de isômeros, pouco tempo de análise, menor consumo de modificador orgânico, apresentando um limite de quantificação menor que 1 ng mL^{-1} (STUDZIŃSKA, S.; BUSZEWSKI, B.; 2013).

Apesar de todas as técnicas acima apresentarem sensibilidade e reprodutibilidade, enquadrando-se nos padrões estabelecidos para o tipo de análise *antidoping*; por vezes são ensaios demorados, com equipamentos de alto-custo, utilizam muitos reagentes e dependem de operadores hábeis para a instrumentação (ORNELAS; LUCENA, 2018).

Em contrapartida, os métodos eletroquímicos são foco de pesquisas recentes no que se diz respeito à detecção de anabolizantes, visto que se apresentam como métodos rápidos e econômicos com sensibilidade, seletividade e que possibilitam o uso em amostras biológicas ou ambientais sem qualquer pré-tratamento complexo ou extenso; outro fator notável é que os limites de detecção também podem ser reduzidos, mantendo-se resultados confiáveis. Além disso, os metabólitos comuns em fluidos biológicos tais como ácido úrico, dopamina e ácido ascórbico não são interferentes na determinação eletroquímica, já que não sofrem redução (GOYAL et al, 2010; ADUMITRĂCHIOAIE et al, 2018; YADAV et al, 2013).

Os métodos eletroquímicos podem possibilitar também que eletrodos modificados quimicamente (EMQ) com novos materiais possam ser utilizados como eletrodos de trabalho, denominados como sensores eletroquímicos para determinação de diversos tipos de analitos (JI et al, 2017).

2.2 Sensores eletroquímicos e eletrodos quimicamente modificados para detecção de testosterona

Segundo Yogeswaran e Chen (2008), sensores eletroquímicos são dispositivos compostos por um material ativo de detecção com um transdutor de sinal. Esses dispositivos são capazes de transmitir o sinal sem qualquer amplificação de um composto seletivo ou de uma mudança na reação, o qual é convertido em sinal digital para processo adicional. Os sensores são classificados de acordo com o tipo de sinal de saída, que pode ser elétrico, térmico ou óptico. Os sensores eletroquímicos recebem destaque, uma vez que os eletrodos detectam os materiais presentes no meio sem causar danos ao sistema (YOGESWARAN, U.; CHEN, S. M.; 2008).

Por outro lado, os sensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com a técnica eletroquímica utilizada, como por exemplo, neste presente trabalho utilizou-se a voltametria cíclica. O sensor voltamétrico utiliza uma diferença de potencial medida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em um intervalo de potencial controlado, provocando a oxidação ou redução das espécies eletroativas no meio (KUSHIKAWA, 2014). Entretanto, no intervalo de potencial selecionado podem existir outras espécies químicas

eletroativas que podem causar interferência durante as determinações, diminuindo a seletividade do método. Uma forma de solucionar problemas relacionados à seletividade em sistemas eletroquímicos abrange metodologias para modificação da superfície de eletrodos de trabalho para construção de sensores eletroquímicos (LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M.; 2006). Os eletrodos modificados quimicamente (EMQ's) são eletrodos mais reativos que promovem aos métodos eletroquímicos o alcance de limites de detecção muito menores nas determinações, comparados aos limites de detecção obtidos com eletrodos sem modificação. Os materiais utilizados nas modificações geralmente são nanopartículas e nanocompósitos, materiais poliméricos e líquidos iônicos (SAJID et al, 2016).

A escolha do modificador da superfície eletródica é muito importante no preparo do eletrodo que irá ser modificado. Na literatura podem-se encontrar vários trabalhos que utilizaram os EQM's no desenvolvimento de sensores para detecção de testosterona, podendo alguns ser citados a seguir.

Heidarimoghadam e colaboradores (2016), por exemplo, desenvolveram uma pesquisa na qual um eletrodo de carbono vítreo era modificado com óxido de grafeno reduzido para o estudo do comportamento de eletro-redução da testosterona. O sensor eletroquímico foi usado na quantificação de testosterona em fluidos biológicos por voltametria cíclica, apresentando um limite de detecção de $0,1 \text{ nmol L}^{-1}$ e um intervalo linear na faixa de $2,0 - 210 \text{ nmol L}^{-1}$, dispensando qualquer pré-tratamento de amostra para análise e tendo como base a redução eletroquímica de testosterona na presença do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB). A metodologia foi avaliada aplicando-se o teste de recuperação a amostras com padrões adicionados, obtendo-se exatidão com valores entre 98,1 a 104,2% (HEIDARIMOGHADAM et al, 2016).

Goyal e colaboradores (2010), por sua vez, investigaram eletroquimicamente a determinação simultânea de testosterona e epitestosterona em urina humana por um eletrodo de grafite pirolítico modificado por nanotubos de carbono de parede simples, aplicando-se a técnica de voltametria de onda quadrada. Os autores puderam concluir através deste estudo que a redução dos dois isômeros ocorreu em um processo com dependência do pH, em que a curva de calibração com faixa linear foi obtida no intervalo de $5 - 1000 \text{ nmol L}^{-1}$ para ambos os esteroides e com limite de detecção de $2,8 \text{ nmol L}^{-1}$ para testosterona e $4,1 \text{ nmol L}^{-1}$ para epitestosterona. Os resultados obtidos a partir do método voltamétrico foram comparados com a análise de CLAE, mostrando-se semelhante à análise padrão (GOYAL et al, 2010).

Em alternativa, a pesquisa desenvolvida por Laczka e colaboradores (2011) utilizou anticorpos através de plataformas de detecção tridimensionais que usavam dispositivos em

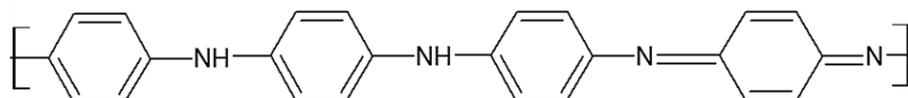
formato de microeletrodos de disco-anel para a imunossensibilização competitiva da testosterona. Cada dispositivo possuía dois tipos de arranjos: o primeiro, formado por um grande número de microdiscos individuais que atuava como substrato para a imunofuncionalização e o desempenho do ensaio; e um micrômetro acima, o segundo, composto por microanéis que foram utilizados como o eletrodo de trabalho para o monitoramento eletroquímico. A detecção de testosterona foi realizada pela técnica de cronoamperometria, na qual se obteve uma faixa linear de $0,01 - 10 \text{ ng mL}^{-1}$ e um baixo limite de detecção de $12,5 \text{ pg mL}^{-1}$ de testosterona com tempos de detecção de 45 minutos.

Li e colaboradores (2016), entretanto, utilizaram um imunossensor simples e sensível baseado em nanocorpos que foram desenvolvidos para a determinação de testosterona por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O imunossensor exibiu uma faixa linear de $0,05 - 5 \text{ ng mL}^{-1}$, com um limite de detecção de $0,045 \text{ ng mL}^{-1}$, revelando especificidade nas detecções com potencial para abordagem de diagnóstico sensível e preciso para testosterona (LI et al, 2016).

De outra forma, tanto a pesquisa desenvolvida por Betatache et al. (2014) quanto o estudo proposto por Fourou et al. (2017) apostaram em uma modificação de eletrodos de ouro pelo método de polímeros molecularmente impressos (MIP's) para a detecção de testosterona, utilizando as técnicas de impedância eletroquímica e voltametria de onda quadrada, respectivamente. Os trabalhos apresentaram a construção de sensores MIP's com uma ampla faixa linear e baixos limites de detecção, exibindo reprodutibilidade e estabilidade (BETATACHE et al, 2014; FOUROU et al, 2017).

Feitas essas considerações, os sensores eletroquímicos construídos a partir da modificação de superfície de eletrodos se mostram como uma alternativa promissora para a determinação de testosterona, porém ainda se existe a necessidade de novas metodologias mais sensíveis e com um melhor custo-benefício para este tipo de análise, pois novas substâncias derivadas são incluídas na lista de proibidos pelos comitês internacionais ou tem seus limites de detecção alterados ao longo dos anos. A polianilina (ou PANI) (Fig. 2) é um polímero condutor considerado um material bastante promissor na fabricação de novos sensores.

Figura 2 – Estrutura da PANI



Este polímero possui uma elevada condutividade, baixo custo, permeabilidade seletiva e facilidade de polimerização. Outro aspecto importante é que este grupo polimérico pode se ligar com nanopartículas de metais nobres, aumentando a natureza aderente e estável das nanopartículas na modificação da superfície de eletrodos (HUANG et al, 2004; SHAMSIPUR et al, 2015).

A PANI pode ser sintetizada por métodos eletroquímicos através da oxidação do seu monômero, a anilina. Este método possibilita a formação de uma fina película sobre a superfície do eletrodo, de forma que a polimerização se torna mais rápida e sustentável do que o método químico, já que não se faz necessário o uso de aditivos oxidantes (WANG et al, 2016). O método da voltametria cíclica, um dos mais versáteis da eletroquímica, permite o estudo do comportamento eletroquímico de compostos, no qual é possível se avaliar a atuação de carga-descarga na modificação da superfície de um eletrodo aplicado. Portanto, este método se torna uma alternativa para a formação e eletrodeposição de filmes poliméricos para a produção de sensores com características melhoradas (MAHLA et al, 2013).

A eletrodeposição produz um filme de PANI que é constituído por dois tipos de camadas: a primeira, formada nos estágios iniciais de crescimento apresentando uma estrutura mais compacta com uma nucleação progressiva 2D a um mecanismo 3D na segunda, que possui estrutura menos densa (FONTANA et al, 2012). A PANI pode ser utilizada em processos de automontagem para construir arquiteturas funcionais complexas, justamente por apresentar este tipo de estrutura. Os compósitos de PANI e nanopartículas (NPs) são sistemas de baixo custo facilmente formados por redução elétrica após a polimerização da anilina, nos quais a transferência de carga ocorre entre a PANI conjugada e as NPs, aumentando a condutividade dos compósitos em relação ao meio em que são inseridos, podendo assim ser utilizados para beneficiar as aplicações na construção de dispositivos voltados para análise de analitos orgânicos (TSENG et al, 2007).

Na literatura, podem-se encontrar sensores eletroquímicos compostos pelo compósito PANI e nanopartículas de ouro (Au NPs) para determinação de diversos analitos, como descrito por Chu e colaboradores (2015) para a determinação de ácido ascórbico e dopamina; também na metodologia desenvolvida por Mazeiko e colaboradores (2013) para detecção de glicose e inclusive na detecção seletiva de íons de prata, desenvolvido por Yang e colaboradores (2015) (CHU et al, 2015; MAZEIKO et al, 2013; YANG et al, 2015).

Neste trabalho, um sensor eletroquímico para determinação de testosterona foi desenvolvido pela modificação de um eletrodo de ouro por um filme de polianilina (PANI) e nanopartículas de ouro (Au NPs), pois a interação entre esses componentes proporciona ao

eletrodo modificado propriedades catalíticas melhoradas e também a transferência eletrônica facilitada, característica comprovada em várias pesquisas, no entanto ainda não se foi relatado na literatura este tipo de modificação para fabricação de um sensor eletroquímico para a testosterona (SHAMSIPUR et al, 2015). (ZHAO et al, 2018).

2.3 Urina sintética

O *doping* é definido pela presença de substâncias proibidas em amostras biológicas coletadas, como sangue ou urina. No entanto, o método de coleta da urina se torna mais vantajoso em relação à coleta de sangue justamente por não ser invasivo. Considerando a importância dos meios ou matrizes para validação de estudos eletroquímicos, aproximando-os a resultados de amostras biológicas reais, a urina sintética vem sendo bastante utilizada em pesquisas (MORALES-CRUZ et al, 2018; COTILLAS et al, 2018; DBIRA et al, 2015).

Silva e colaboradores (2015), por exemplo, descreveram o desenvolvimento e a otimização de um método eletroanalítico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação simultânea do fármaco besilato de anlodipino (ANL) e do diurético hidroclorotiazida (HCZ) em urina sintética. Este método empregou a urina sintética com o objetivo de simular o comportamento de uma urina natural de pacientes que utilizam o tratamento combinado destes compostos, apresentando uma metodologia rápida, simples e de baixo custo capaz de evitar reações adversas provocadas pela falta de precisão nas quantificações de formulações farmacêuticas e urina de pacientes (SILVA et al, 2015).

Mais recentemente, Morales-Cruz e colaboradores (2017) aplicaram a urina sintética para o estudo de um sistema de ureólise, utilizando a bactéria *Proteus vulgaris* para transformação de ureia em amônia e posterior oxidação para nitrogênio em um eletrodo de platina (Pt). A reação de oxidação da amônia foi detectada por voltametria cíclica, na qual se definiu condições ótimas para o processo de oxidação, pois foi observado que altas concentrações de ureia no sistema urinário sintético diminui a eficiência da oxidação dos eletrodos de Pt. O método proposto pelos autores demonstrou a partir dos resultados das conversões a possibilidade de recuperação de água a partir da urina sintética, concluindo que ainda são necessárias melhorias adicionais, como a concentração ideal de *P. vulgaris* em urina real, para que a validação de um sistema de ureólise auto-sustentável seja realizada (MORALES-CRUZ et al, 2017).

Embora na literatura se encontre sobre validação de métodos clássicos utilizando urina sintética como meio para detecção de esteroides, como descrito por Zulfigar e colaboradores

(2014), recentemente não se tem reportado estudos com aplicação de urina sintética para detecção eletroquímica de esteroides (ZULFIGAR et al, 2014).

Desse modo, sabendo-se das vantagens em se trabalhar com a urina sintética, a urina produzida de forma artificial se torna pertinente também aplicada como meio para validação de métodos eletroquímicos na detecção de esteroides, como no caso da testosterona, pois esse meio simula o comportamento de uma urina natural, sendo possível a análise de interferentes no processo das reações de oxidação e redução que podem acontecer no sistema eletroquímico durante a análise.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um sensor eletroquímico a partir da modificação de superfície de um eletrodo de ouro com polianilina e nanopartículas metálicas de ouro e aplicá-lo na determinação de testosterona em amostras de urina sintética por voltametria cíclica.

3.2 Específicos

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Confeccionar e caracterizar o eletrodo de ouro a ser utilizado para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico;
- Sintetizar filme de polianilina e nanopartículas de ouro como modificadores na superfície do eletrodo através da técnica de voltametria cíclica;
- Estudar o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado;
- Estabelecer a curva de calibração para análise quantitativa;
- Aplicar o novo sensor na determinação de testosterona em amostras de urina artificial, avaliando o desempenho do ponto de vista analítico e estatístico.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na pesquisa (Tabela 1) foram de grau analítico para análise (PA) ou com pureza especificada e as soluções foram preparadas a partir de reagentes sólidos dissolvidos ou de soluções concentradas que foram diluídas em água ultrapura tratada pelo sistema Purelab Option Q, com uma resistividade de 18,2 M Ω -cm.

Tabela 1 – Procedência e pureza dos reagentes utilizados

Material	Fórmula Química	Procedência	Pureza (%)
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Vetec	PA
Anilina	C ₆ H ₇ N	Vetec	PA
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	Impex	99,5
Cloreto de cálcio monohidratado	CaCl ₂ .H ₂ O	Quimis	99,8
Cloreto de potássio	KCl	Vetec	PA
Cloreto de sódio	NaCl	Dinâmica	PA
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	Vetec	PA
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	Alphatec	PA
Testosterona bioidêntica	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Farmácia Equilíbrio	10,0
Ureia	(NH ₂) ₂ CO	Vetec	99,8

Fonte: Elaborada pela autora.

A eliminação de oxigênio (O₂) dissolvido foi feita pelo borbulhamento de argônio (Ar) nas soluções durante 40 segundos antes das análises.

4.2 Preparo de soluções

4.2.1 Solução diluída de ácido sulfúrico

As soluções de ácido sulfúrico foram preparadas através da transferência de volumes dos ácidos para balões volumétricos com água ultrapura para concentrações de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, utilizadas como eletrólito suporte nas etapas de modificação do eletrodo e detecção de testosterona, respectivamente.

4.2.2 Solução de anilina

A anilina foi tri-destilada sob atmosfera inerte de nitrogênio (N) para purificação, sendo posteriormente, mantida ao abrigo de luz e refrigeração até o seu uso. Para a eletropolimerização nos eletrodos de trabalho, soluções de anilina foram preparadas com concentrações variando de 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em 1 mL de ácido sulfúrico a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (GENG et al, 2017).

4.2.3 Solução de ácido cloro-áurico

A solução de ácido cloro-áurico (HAuCl_4) foi preparada pela dissolução de 0,146 g de uma chapa de ouro em 0,2 mL de água-régia, a fim de se obter a proporção de 22% (m/V) de HAuCl_4 . Em seguida, 5 μL da solução de ácido cloro-áurico foi diluída em 1 mL de ácido sulfúrico a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ para a eletrodeposição de ouro nos eletrodos de trabalho por meio da técnica de voltametria cíclica (OLIVEIRA et al, 2016).

4.2.4 Soluções de testosterona

Os padrões de testosterona com concentração de 1 mmol L^{-1} foram preparados por dissolução em 1 mL de ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Para soluções de concentração menor, o preparo foi realizado através da transferência de um volume determinado da solução padrão de 1 mmol L^{-1} e posterior diluição. Para cada estudo preparavam-se novas soluções, das quais se pôde avaliar o comportamento eletroquímico da testosterona e conseqüentemente construir uma curva analítica.

4.2.5 Urina sintética

As amostras de urina sintética foram preparadas como descrito por Silva et al. em um balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura, contendo as seguintes proporções de reagentes: 0,73 g de NaCl; 0,40 g de KCl; 0,27 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,56 g de Na_2SO_4 ; 0,35 g de KH_2PO_4 ; 0,25 g de NH_4Cl e 6,25 g de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Amostras de urina sintética de 1 mL foram dopadas com duas diferentes concentrações de testosterona, simulando concentrações da urina natural feminina e masculina em indivíduos com idades entre 20-30 anos. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas com soluções de urina sintética recém-preparadas (SILVA et al, 2015).

4.3 Instrumentação básica

- Balança analítica digital Adventures, modelo AR2140 com precisão de $\pm 0,1$ mg;
- pHmetro digital Metrohm modelo 827;
- Pipetas de microvolume Kasvi de 1-10 uL e 10-100 uL;
- Sistema eletroquímico

As medidas voltamétricas foram feitas com o uso de um sistema eletroquímico potenciostato/galvanostato Autolab Metrohm modelo PGSTAT302N acoplado a um computador com software NOVA versão 2.0.1. Tanto as caracterizações do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados quanto às determinações de testosterona foram realizadas através da técnica de voltametria cíclica (VC).

- Célula e microcélula eletroquímica

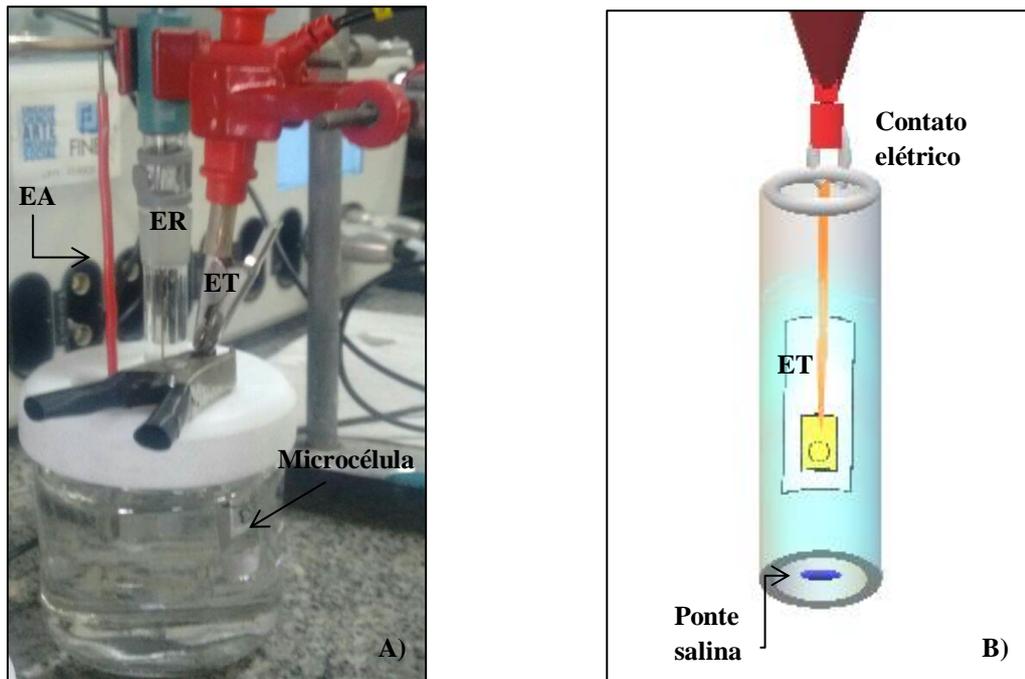
Todos os experimentos eletroquímicos foram feitos em uma célula eletroquímica (Figura 3-A) de vidro com capacidade de 150 mL, contendo o eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro (trabalho), o eletrodo de platina (auxiliar) e o eletrodo de prata-cloreto de prata (referência). No entanto, para as etapas de modificação da polianilina e eletrodeposição do ouro no eletrodo de ouro, bem como nas determinações de

testosterona; uma microcélula (Figura 3-B) foi confeccionada para ser inserida dentro da célula eletroquímica.

Figura 3 – A) Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos utilizada.

EA = eletrodo auxiliar; ER = eletrodo de referência; ET = eletrodo de trabalho.

B) Representação esquemática de uma microcélula



Fonte: Autora.

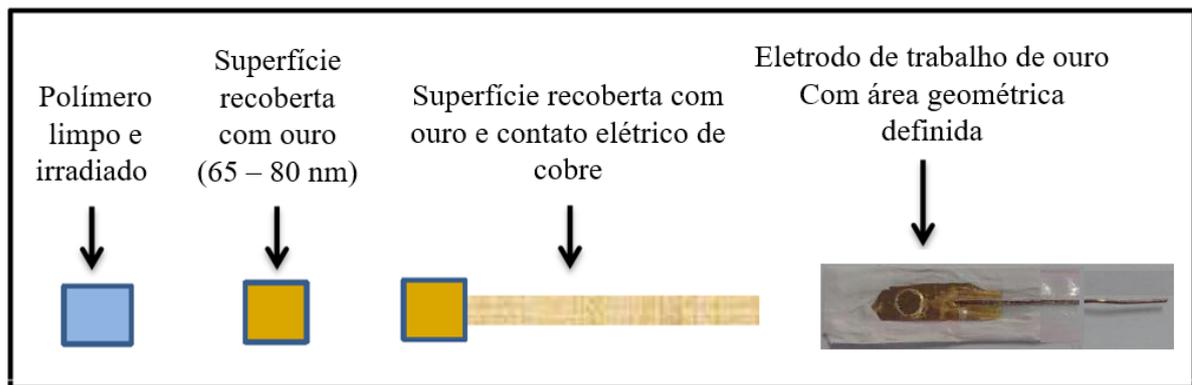
A microcélula eletroquímica é uma poderosa ferramenta para aplicações em microrregiões, logo, o presente trabalho utilizou esse dispositivo com o propósito de que o processo de difusão das soluções de pequeno volume fosse restrito a área de superfície do eletrodo a ser modificada (AKITA et al, 2012). A microcélula foi construída a partir de um cilindro de acrílico de capacidade máxima de 2 mL com um pequeno furo em uma extremidade, sendo preenchido por papel filtro saturado com solução de 3 mol L^{-1} de KCl para construção de uma ponte salina que ficava em contato com o eletrólito de suporte da célula eletroquímica, o ácido sulfúrico.

4.4 Preparo dos eletrodos

4.4.1 Confeção dos eletrodos de trabalho

Na Figura 4 é mostrado o esquema proposto de construção do eletrodo de ouro, este que foi confeccionado em laboratório segundo a metodologia apresentada em MELO, S. M. (2016).

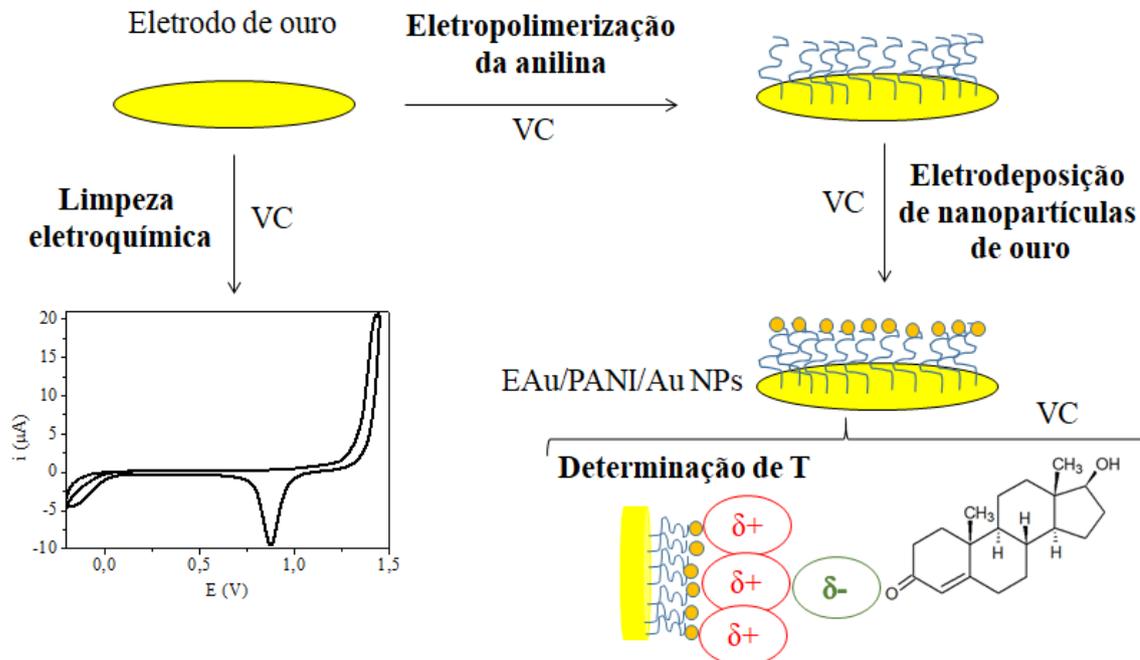
Figura 4 – Esquema de montagem do eletrodo de trabalho de ouro



Fonte: Desenvolvido por MELO, S. M. 2016.

O procedimento tem início com a deposição de um filme fino de ouro em uma folha de poliéster pelo processo de pulverização catódica (ou *sputtering*). Através desta técnica, um fio de ouro com padrão de pureza 99,99% foi evaporado termicamente em uma câmara de vácuo Edwards 306, sob condição de alto vácuo (10^{-6} torr). Após evaporação, o filme de ouro se condensou na folha de poliéster, sendo que, para maior aderência ao filme, a folha foi submetida por um processo de irradiação com luz ultravioleta (365 nm) por uma semana. A espessura da folha resultante do filme de ouro foi determinada no próprio equipamento antes de se iniciar o processo de pulverização do ouro, apresentando filmes de ouro com 65-80 nm de espessura. Em seguida, a folha foi cortada em pequenos retângulos (5 mm x 7mm) para construção do eletrodo. Um fio de cobre foi fixado na folha de ouro com a finalidade de se estabelecer contato elétrico, e a adesão das peças foi feita através da cobertura de uma fita adesiva, apenas com uma abertura para contato com as soluções, a qual era constituída de uma área circular de aproximadamente $0,03 \text{ cm}^2$. Para o selamento das laterais, uma fita de Teflon foi utilizada. Em seguida, o eletrodo de ouro foi submetido a modificações de superfície para a construção de um sensor eletroquímico voltado para a determinação de testosterona, as etapas das modificações foram resumidas na Figura 5 e detalhadas nos tópicos a seguir.

Figura 5 – Esquema para etapas de modificação do eletrodo de ouro
Modificação do eletrodo de ouro



Fonte: Elaborado pela autora. Obs.: VC = Voltametria cíclica; T = Testosterona.

4.4.2 Limpeza dos eletrodos

Primeiramente, antes de cada análise, o eletrodo de ouro foi submetido a uma limpeza eletroquímica com ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, aplicada a uma faixa de potencial de varredura de $-0,2$ a $+1,55 \text{ V}$; com uma velocidade de $0,25 \text{ V s}^{-1}$; a fim de se obter uma superfície do eletrodo livre de interferentes, bem como o conhecimento de sua área, sendo que todos os eletrodos apresentaram aproximadamente $0,03 \text{ cm}^2$.

4.4.3 Eletropolimerização da anilina

Após a limpeza química, procedeu-se com a polimerização eletroquímica, resultando na deposição direta de um filme de polianilina (PANI) sobre a superfície do eletrodo a partir da técnica de Voltametria Cíclica (VC). Esta técnica proporciona a modificação regular do potencial do eletrodo de modo cíclico, em que o polímero sofre alterações de estado de condução (GVOZDENOVIC et al, 2011). Outra característica de destaque da voltametria cíclica é que a formação de filmes de polianilina na superfície do eletrodo ocorre com cadeias

dispersas de estrutura aberta, além de promover a nucleação de partículas de maneira homogênea (HEINZE et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2016).

Estudos de VC foram feitos para avaliar o crescimento de filmes de polianilina na superfície do eletrodo de ouro construído, variando três fatores: a **concentração** das soluções de anilina (0,1; 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹); as **velocidades de varreduras** (25; 50 e 100 mV s⁻¹) e o **número de varreduras** (10; 20 e 30 ciclos) durante a eletropolimerização da anilina com potenciais inicial e de vértice inferior de 0,00 V e potencial de vértice superior de +0,8 V (BALTRŪNAS et al, 2008).

4.4.4 Eletrodeposição de nanopartículas de ouro

A eletrodeposição de ouro sobre a superfície do eletrodo de ouro recoberto com PANI também foi realizada por VC, pois segundo Oliveira e colaboradores (2016), esta técnica promove que a superfície de modificação se torne mais adequada para a deposição do ouro, resultando em partículas uniformes depositadas (OLIVEIRA et al, 2016). Foram utilizados os seguintes parâmetros: potenciais inicial e final de -0,4 V; potencial de vértice de +0,2 V; velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹; variando o número de varreduras entre 2 e 4 ciclos consecutivos de eletrodeposição de ouro.

4.5 Desempenho do eletrodo modificado

A avaliação do desempenho dos eletrodos modificados foi realizada através do estudo do comportamento eletroquímico destes eletrodos frente aplicação em amostras de urina sintética na detecção de diferentes concentrações do analito em questão. Além das caracterizações por VC, fotomicrografias da superfície dos eletrodos nas etapas de modificação foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Instituto Federal do Piauí (IFPI), em um microscópio eletrônico de varredura da marca Shimadzu, modelo SSX 550 SUPER SCAN.

4.6 Validação do método eletroanalítico

A validação é um recurso analítico que pode garantir a confiabilidade de uma metodologia aplicada, buscando assegurar que os resultados obtidos por uma determinada análise são de qualidade (VALENTINI et al, 2007).

Para a validação do método exposto, foram analisados os seguintes parâmetros estatísticos: **linearidade**, **precisão** (desvio padrão), **sensibilidade** (limite de detecção e quantificação) e **exatidão** (método de recuperação); os quais são apresentados a seguir.

No que se diz respeito à linearidade, avaliou-se a capacidade do método em obter resultados nos testes que seriam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Recomenda-se um mínimo de cinco concentrações para avaliar a linearidade para calibração do método (TIWARI, G.; TIWARI, R., 2010; DAKSH et al, 2015).

Já em relação à precisão, a partir deste parâmetro se determinou qual a proximidade entre os valores obtidos por medidas replicadas de apenas uma quantidade em um selecionado padrão (ARAUJO, 2009). Geralmente a precisão é expressa em forma de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR), sendo que esta última é dada em porcentagem. O DP e o DPR podem ser expressos pelas equações abaixo, respectivamente (INMETRO, 2010):

$$DP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$DPR (\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100$$

Nas quais \bar{x} é a média aritmética das medidas; x_i é o valor de cada medida e n é a quantidade de medidas.

Outro fator importante citado para validação é a sensibilidade, que segundo o INMETRO (2010), demonstra o quanto a resposta variou em relação à concentração do analito. É geralmente associado ao limite de detecção (LD), definido como a menor concentração detectável de um analito em uma amostra, mas não necessariamente que possa ser quantificada (PETERS et al, 2007).

O LD pode ser expresso como:

$$LD = \frac{3 \times DP_b}{a}$$

Sendo DP_b o desvio padrão do branco e a a inclinação da equação da reta obtida pela curva de calibração (VIAL, J.; JARDY, A.; 1999).

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor concentração do analito que pode ser quantificada, isto é, com precisão e exatidão aceitáveis no experimento realizado (ANVISA, 2012). É expresso como:

$$LQ = \frac{10 \times DP_b}{a}$$

Na qual DP_b é o desvio padrão do branco e a é a inclinação da reta calculada pela curva de calibração.

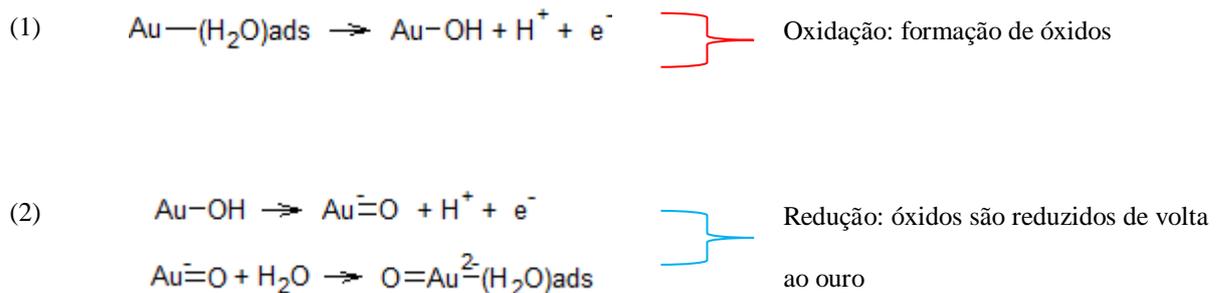
A exatidão do método foi observada de acordo com a proximidade de valores experimentais em relação aos valores teóricos esperados, com a aplicação de concentrações conhecidas de testosterona em solução de urina sintética, e posteriormente, feito cálculo do valor de recuperação (%) (PETERS et al, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Voltamograma cíclico típico do eletrodo de ouro

A limpeza eletroquímica oferece a retirada de impurezas da superfície dos eletrodos, sendo um pré-tratamento muitas vezes indispensável para que se tenha segurança em análises extremamente sensíveis. Os voltamogramas cíclicos obtidos pela limpeza em meios ácidos do eletrodo de ouro convencional são bastante detalhados na literatura (FOGUEL et al, 2016).

A investigação e o entendimento a respeito da cinética e mecanismos de transferência eletrônica da eletro-oxidação em meios ácidos na superfície desse tipo de eletrodo é largamente aceita conforme a seguinte descrição feita por Wang et al, 2013:



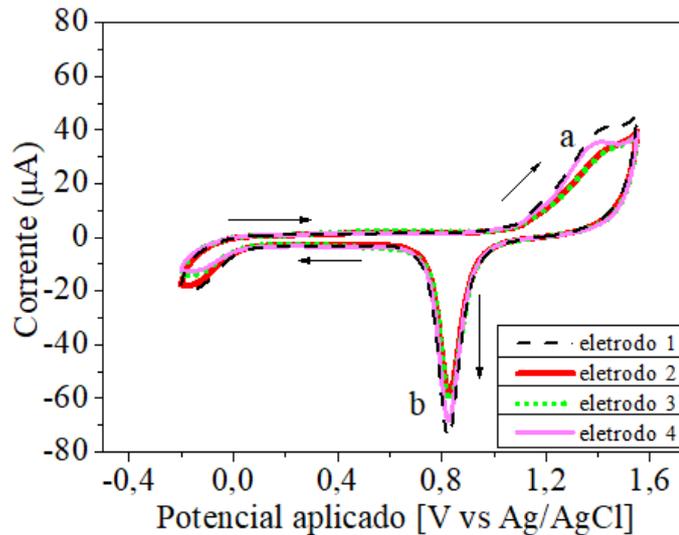
Segundo Wang e colaboradores (2013), as contribuições de correntes anódicas, representadas por correntes de pico de oxidação, são relacionadas à eletroformação de óxidos de ouro da superfície do eletrodo de ouro para a solução de ácido sulfúrico; enquanto que as contribuições de correntes catódicas, referentes às correntes de pico de redução, indicam que os óxidos formados retornaram para a superfície do eletrodo, reconstruindo uma camada limpa de impurezas (WANG et al, 2013).

Com base nos mecanismos descritos acima, a limpeza eletroquímica feita em eletrodos de ouro confeccionados em laboratório forneceu VCs típicos do eletrodo de ouro convencional, apresentando um perfil condizente com a literatura (MA et al, 2013; HOLZE, R., 2015; XIAO et al, 2016; HERNÁNDEZ, W. T., 2014).

Em todos os voltamogramas dos eletrodos de ouro testados (Figura 6), foram observadas contribuições de correntes anódicas representadas por picos de corrente de

oxidação (a) próximos a +1,3 V e picos de correntes de redução (b) foram observados em torno de +0,85 V. A área eletroativa do eletrodo foi calculada em $5,65 \cdot 10^{-6}$ C.

Figura 6 – Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro na limpeza eletroquímica, com $v = 250 \text{ mV s}^{-1}$; 3º ciclo; em contato com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Resultados da pesquisa.

A partir dos voltamogramas também se verificou que há reprodutibilidade do método de construção do eletrodo, visto que todos os dispositivos exibiram picos de correntes próximos ao esperado para o eletrodo de ouro nas mesmas condições experimentais. A confecção em laboratório é relativamente barata, sendo uma plataforma viável para construção de um sensor eletroquímico.

5.2 Eletrossíntese da polianilina (PANI)

A técnica de eletrodeposição com potencial controlado para produzir filmes finos de PANI é largamente usada, pois os filmes resultantes apresentam estabilidade química, forte aderência a substratos e homogeneidade (MELLO, H. J. N. P. D.; MULATO, M., 2018).

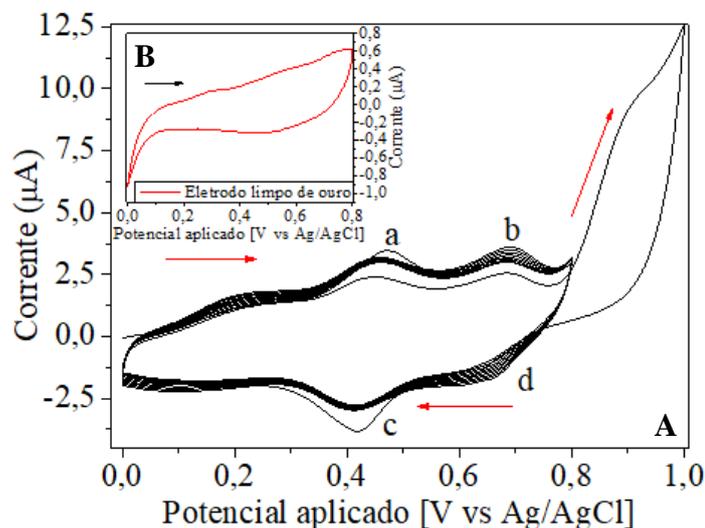
Na literatura também é relatado que a síntese deve ser feita em meio ácido com pH baixo e que a concentração de anilina influencia na taxa de eletrodeposição de PANI, pois a maior disponibilidade de íons H^+ e do monômero precursor promove uma taxa de reação de oxidação mais significativa (RESTREPO et al, 2005).

Tendo em vista essas informações, após a limpeza eletroquímica, seguiu-se com a deposição do filme de polianilina na superfície dos eletrodos de ouro como a primeira etapa de modificação para o desenvolvimento do sensor eletroquímico.

A eletrossíntese da polianilina (Fig. 7) foi estudada através da técnica de voltametria cíclica em solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 0,96$), com o primeiro ciclo sendo conduzido na faixa de potencial de $0,0$ a $+1,0 \text{ V}$ a fim de fornecer um impulso para que a PANI se deposite mais facilmente nos ciclos posteriores, que foram realizados na faixa de potencial de $0,0 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$. Essa região de potencial foi escolhida justamente pelo fato de que em meio ácido o eletrodo de ouro neste intervalo não apresenta picos de oxidação e redução relevantes, podendo-se observar o crescimento dos picos de oxidação e redução da PANI sem a interferência da formação e deposição de óxidos de ouro. Os fatores avaliados para a síntese foram: **concentração do monômero**, **velocidade de varreduras** e **número de ciclos**; durante as voltametrias de síntese para se estabelecer condições ideais para formação dos filmes de PANI (MEDEIROS et al, 2012).

Analisando-se a Figura 7, pode-se perceber o aumento das correntes de pico anódicas e catódicas durante uma das condições da eletrossíntese de PANI realizada e a comparação com o eletrodo de ouro limpo no mesmo intervalo de potencial na ausência de anilina.

Figura 7 – Voltamogramas cíclicos obtidos A) para o crescimento do filme de PANI no eletrodo de ouro em solução de anilina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ no eletrólito de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} , com a-d representando a formação de picos durante a síntese; B) eletrodo de ouro limpo em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura a 50 mV s^{-1} , na mesma faixa de potencial aplicada à eletrossíntese de PANI.

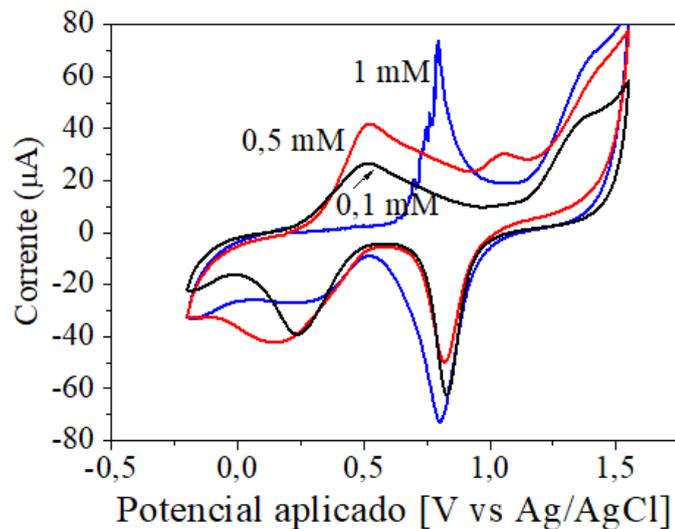


Fonte: Resultados da pesquisa.

5.2.1 Efeito da concentração

Os voltamogramas cíclicos de filmes finos de PANI depositados com diferentes concentrações são mostrados na figura 8.

Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos de filmes finos de PANI depositados em eletrodo de ouro por diferentes concentrações de anilina ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mmol L^{-1}), em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, 10º ciclo a 250 mV s^{-1} .

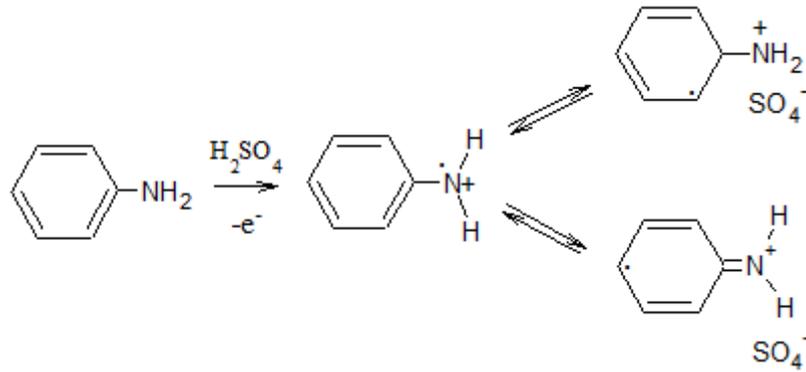


Fonte: Resultados da pesquisa.

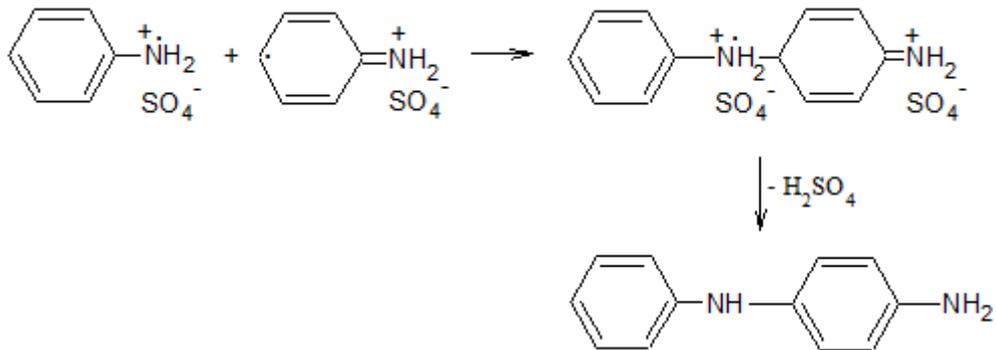
A partir da figura 8 pode-se observar que à medida que a concentração inicial de anilina aumenta de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ com a eletropolimerização nos eletrodos, o crescimento na corrente de picos de oxidação em $+0,52 \text{ V}$ relativos à PANI aumenta, ou seja, sugerindo que com maior concentração o filme é mais espesso, recobrindo a superfície do eletrodo de ouro. Também é possível notar que a corrente de pico de redução característica do eletrodo de ouro em $+0,80 \text{ V}$ exibe uma diminuição na área de pico mais evidente com o eletrodo que teve sua eletrossíntese de PANI com a concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, indicando que mais PANI foi depositada sobre o substrato. No entanto, quando o eletrodo é submetido à eletropolimerização com uma concentração ainda maior, a solução de 1 mmol L^{-1} de anilina, a leitura do voltamograma do eletrodo apresenta pico de degradação da anilina em $+0,80 \text{ V}$, pico de oxidação em $+1,39 \text{ V}$ e um pico de redução em $+0,80 \text{ V}$ referentes a formação e deposição de óxidos de ouro, indicando que não houve formação de filmes de PANI (RESTREPO et al, 2005). Logo, a concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi definida sendo a mais adequada para a formação dos filmes de PANI.

O mecanismo de síntese eletroquímica da PANI é detalhado por Gvozdenović e colaboradores (2014) e as reações que ocorreram para a formação do filme de PANI sobre o eletrodo de ouro em meio ácido podem ser explicadas a partir do entendimento deste mecanismo (GVOZDENOVIC et al, 2014):

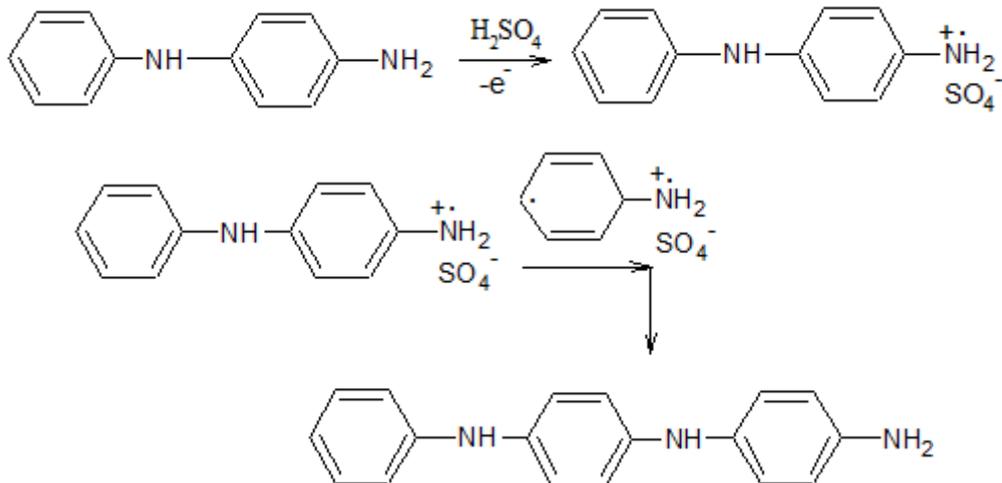
Oxidação da anilina



Acoplamento de radicais



Propagação

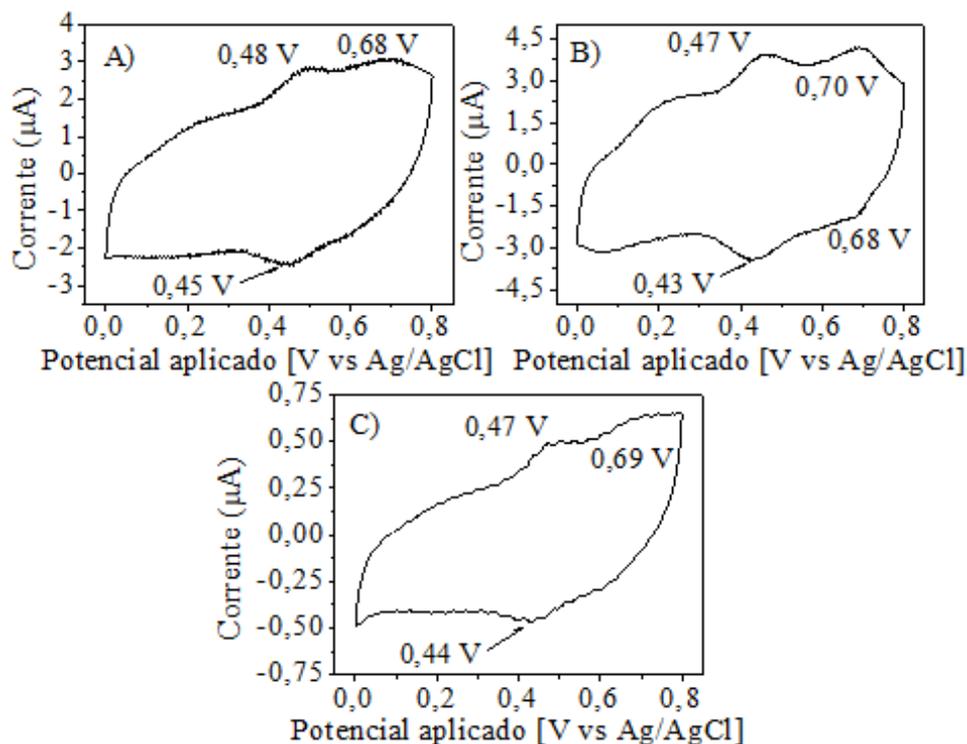


A primeira etapa do processo de polimerização consiste na formação de cátions pela oxidação do monômero da anilina, sendo que dois tipos de radicais são formados (radical de posição p- e o-). Em seguida, esses radicais são acoplados pela eliminação de dois prótons e formam dímeros que sofrem oxidação adicional da anilina restante. Por fim, os radicais formados pelos dímeros e da anilina se acoplam para a propagação da cadeia (PRON, A.; RANNOU, P., 2002).

5.2.2 Influência da velocidade de varredura

As propriedades finais na morfologia da PANI sobre o eletrodo de ouro também são influenciadas pela velocidade de varredura aplicada durante a deposição eletroquímica (XAVIER et al, 2006). Na Figura 9 são apresentados os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de ouro após a eletropolimerização de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de anilina em diferentes velocidades de varredura (25; 50 e 100 mV s^{-1}).

Figura 9 – Voltamogramas cíclicos resultantes (1^o varredura) dos eletrodos de ouro após polimerização da anilina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a 10 ciclos, em diferentes velocidades de varredura: A) 25 mV s^{-1} , B) 50 mV s^{-1} e C) 100 mV s^{-1} .



Fonte: Resultados da pesquisa.

A partir desses gráficos, levando em consideração que a diferença de potencial (ΔE) entre os picos anódicos e catódicos para o crescimento do polímero permite averiguar a resistência do transporte de íons envolvidos nas reações redox que ocorrem no eletrodo, foi verificada a influência da velocidade de varredura no processo de síntese da PANI.

O valor de (ΔE) geralmente aumenta com a quantidade de filme depositada no eletrodo, sendo assim, é possível obter informações sobre a espessura do filme formado pelo cálculo de $\Delta E = E_{\text{pico anódico}} - E_{\text{pico catódico}}$, pois, se a transferência de elétrons entre a PANI e o eletrólito está sendo mais lenta, isto indica que a espessura do filme é maior naquela condição (SEZGIN et al, 2012). A ΔE entre os potenciais de picos anódicos e catódicos presentes nos voltamogramas foi maior para a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com um valor de 0,04 V, podendo assim inferir que o eletrodo de ouro é mais revestido a essa velocidade.

O primeiro par de picos redox, em torno de 0,5 V, presente em todos os voltamogramas resultantes do eletrodo modificado por PANI é associado à conversão dos estados leucoesmeraldina/esmeraldina do polímero. Porém, nota-se também o crescimento de um segundo par de picos redox visualizado apenas para a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , que está associado à conversão dos estados esmeraldina/bernigranilina, confirmando o aumento da espessura do filme depositado (FONSECA et al, 2015).

Outro fator importante a ser definido além da concentração e velocidade de varredura para a eletrossíntese da PANI é a quantidade de ciclos utilizada para a formação dos filmes (MATTOSO, 1996).

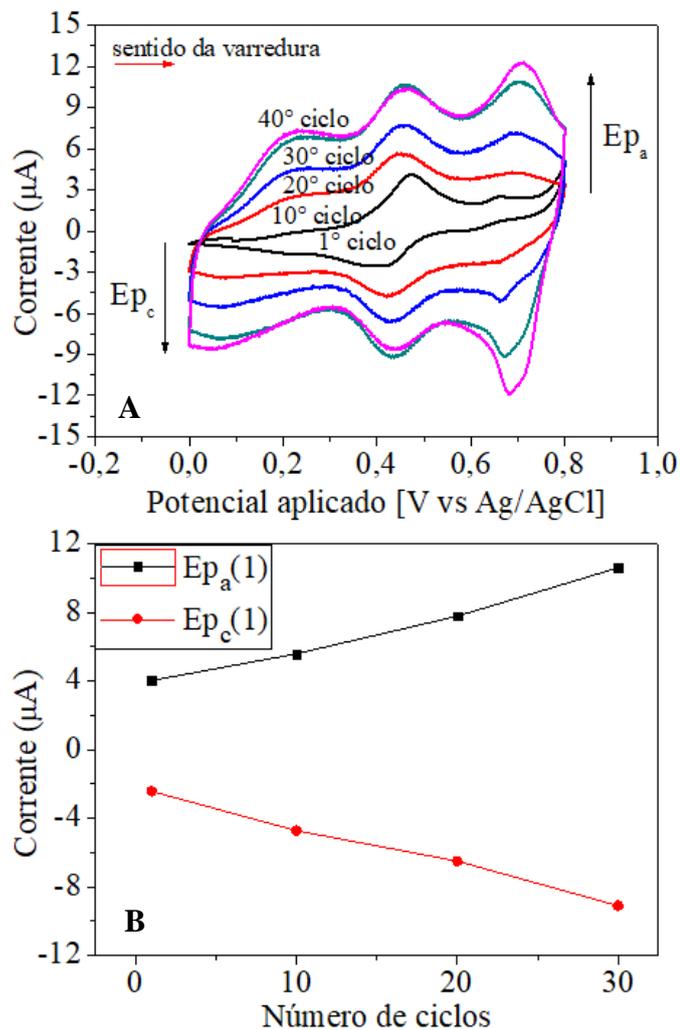
5.2.3 Escolha do número de ciclos

Seguindo o estudo para se selecionar as condições mais apropriadas de síntese da PANI sobre o eletrodo de ouro, o exame do número de ciclos necessários durante o processo de polimerização da anilina foi realizado. Conforme descrito por Bonastre e Bartlett (2010), a eletrodeposição de PANI em microeletrodos por VC ocorre de modo que as correntes de pico dos diferentes processos redox aumentam com o acréscimo do número de ciclos (BONASTRE, A. M.; BARTLETT, P. N., 2010).

A Figura 10-A apresenta os voltamogramas dos eletrodos de ouro resultantes da modificação com PANI em que diferentes números de ciclos (10, 20, 30 e 40 ciclos) foram aplicados na síntese de PANI. Pode-se identificar que o crescimento de dois pares de picos redox em +0,46 V e +0,70 V, característicos da deposição de PANI sobre o eletrodo de ouro,

é proporcional ao aumento do número de ciclos durante o processo de formação dos filmes poliméricos.

Figura 10 – A) Eletrodeposição de PANI a partir de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de anilina em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 no eletrodo de ouro, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , variando o número de varreduras de deposição de 1 a 40 ciclos; B) Dependência do crescimento da corrente de picos anódicos e catódicos em relação ao número de ciclos utilizados durante o processo de polimerização de anilina até 30 ciclos.



Fonte: Resultados da pesquisa.

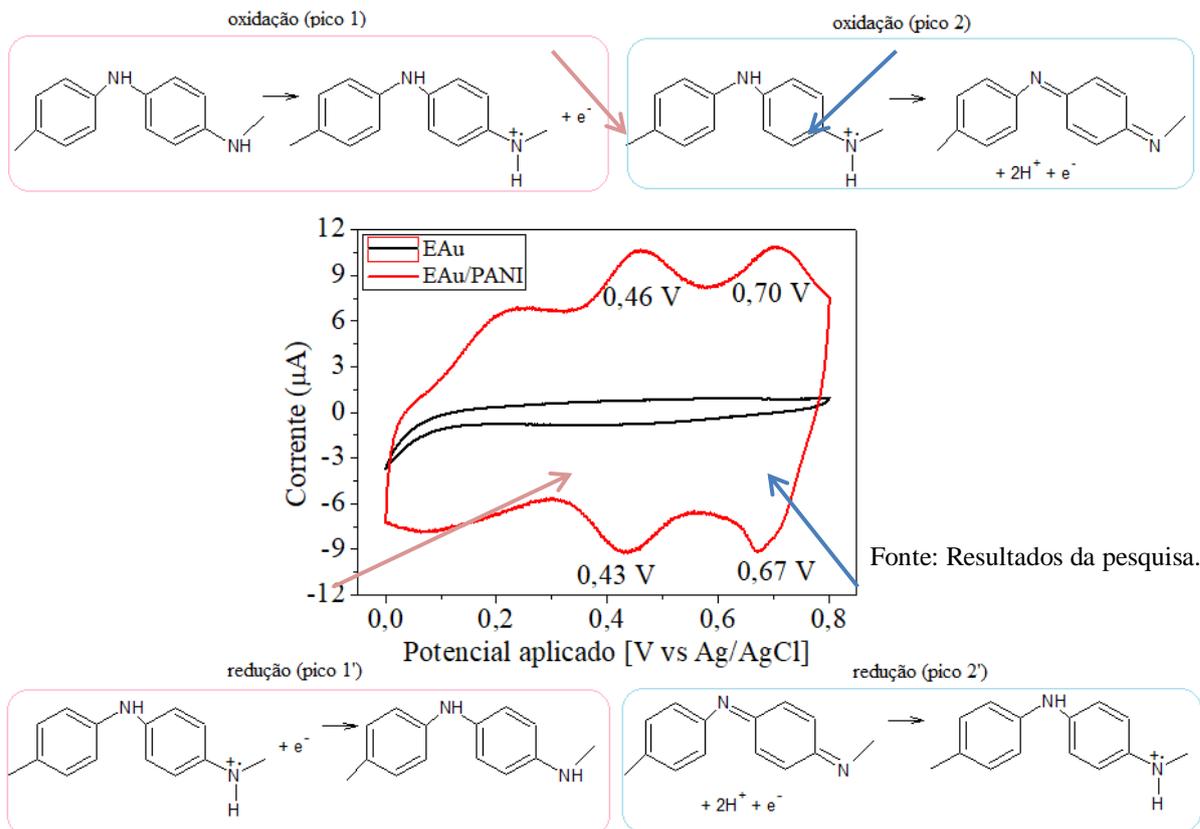
Além disso, conforme relatado por COT et al (2012), o aumento das correntes de oxidação com o número de varreduras demonstra que o processo é autocatalítico, pois, após a primeira camada formada de filme na superfície do eletrodo, a polimerização ocorre de forma preferencial na direção vertical em cima da primeira camada depositada e não na superfície do

eletrodo sem PANI (COT et al, 2012; KELLENBERGER et al, 2014). Desta forma, o número de 30 ciclos foi definido como mais apropriado para a modificação no eletrodo de ouro por deposição de filmes de PANI, pois quando se realiza a síntese com mais ciclos, o crescimento do primeiro par de picos redox não é verificado ou desprezível. Em virtude desses resultados, a modificação com PANI foi definida com o eletrodo de ouro estando em contato com solução ácida de anilina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com janela de potencial de $0,0$ a $+1,0 \text{ V}$ no primeiro ciclo e $0,0 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$ nos ciclos restantes, totalizando 30 ciclos.

5.2.4 Comportamento eletroquímico do filme de PANI

A Figura 11 mostra o voltamograma cíclico característico da deposição do filme de PANI na superfície do eletrodo de ouro em solução de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 0,96$) na ausência de anilina e as respectivas reações que ocorrem em cada pico apresentado.

Figura 11 – Voltametrias cíclicas para o eletrodo de ouro sem modificação e com PANI em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 250 \text{ mV s}^{-1}$ mostrando os mecanismos reacionais para os dois pares redox presentes. EAu = eletrodo de ouro (SONG, E.; CHOI, J.W., 2013).

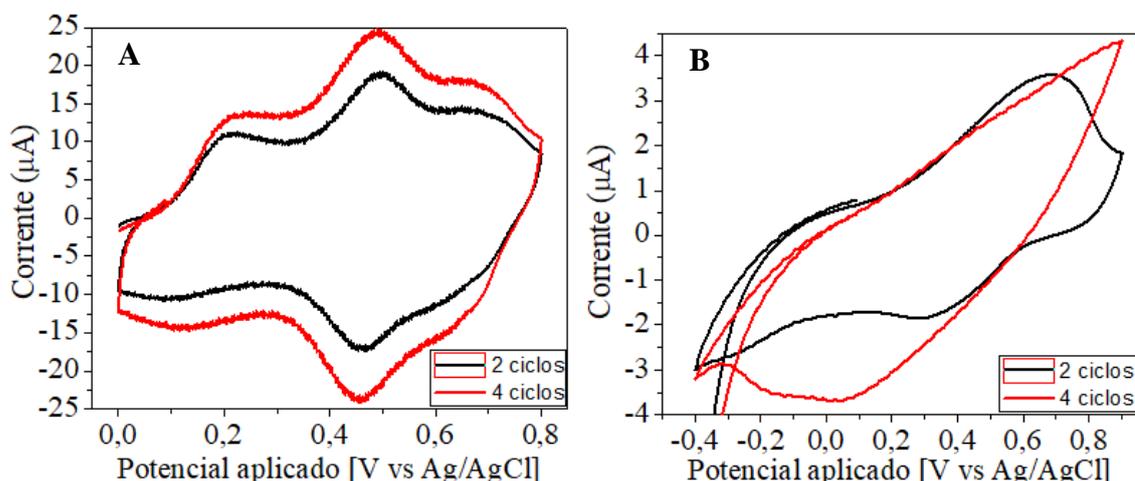


A partir do voltamograma cíclico do eletrodo de ouro modificado com PANI pode-se conferir a ocorrência de dois processos redox distintos, indicados pela presença de dois pares de picos de corrente anódica e catódica. De acordo com SONG e CHOI (2013), o primeiro par redox que aparece próximo a +0,45 V é referente à conversão dos estados de composição da PANI da base leucoesmeraldina reduzida à esmeraldina oxidada de forma parcial, conforme ilustrado na Figura 11. Já o segundo par redox, presente em torno de +0,70 V, é associado à conversão do estado esmeraldina para pernigranilina totalmente oxidada (SONG, E.; CHOI, J. W., 2013).

5.3 Deposição eletroquímica de nanopartículas de ouro (Au NPs)

Apesar de os filmes de PANI depositados proporcionarem interessantes propriedades elétricas e ópticas em eletrodos modificados, a PANI sofre de baixa estabilidade cíclica devido ao inchaço e encolhimento volumétrico e subsequente degradação mecânica causada pelo processo de carga e descarga dos íons em sua estrutura (GUPTA et al, 2006; GENG et al, 2017). Devido a esse problema de estabilidade, o estudo da produção de compósitos de PANI com nanopartículas de metais depositadas se torna uma possível solução para essa dificuldade (ZHENG et al, 2012).

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos obtidos A) dos eletrodos de ouro modificados com PANI e Au Nps variando o número de varreduras de deposição do ouro de 2 e 4 ciclos em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a 250 mV s^{-1} e B) eletrodos de ouro modificados com PANI e Au Nps na presença de $1.10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ de testosterona para comparativos entre o número de ciclos de deposição do ouro; em contato com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Resultados da pesquisa.



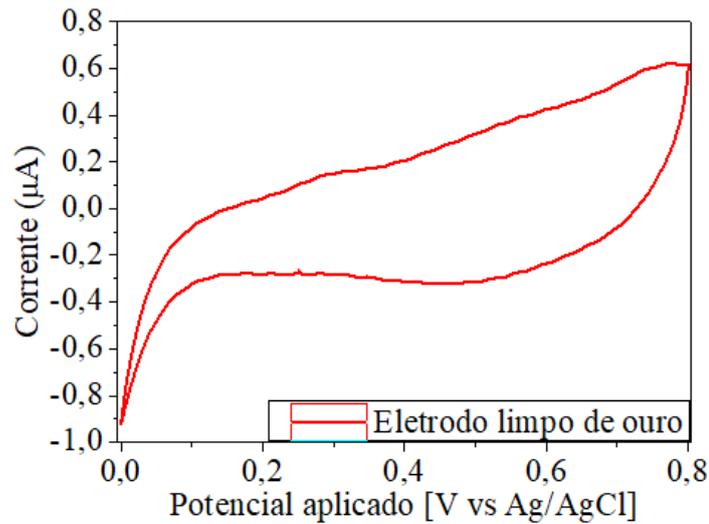
A técnica escolhida para a formação de nanopartículas neste trabalho foi a voltametria cíclica (Fig. 12), pois segundo Goyal e colaboradores (2005), a deposição do ouro e nucleação de partículas se dá de forma uniforme na superfície do eletrodo com a aplicação desta técnica. Foram preparados eletrodos com PANI para deposição de Au Nps com solução de ácido cloro-áurico a 22% (m/V) em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 0,96$) com velocidade de 100 mV s^{-1} , variando o número de varreduras consecutivas de deposição do ouro de 2 e 4 ciclos. A fim de se determinar qual o número ideal de ciclos para a formação das Au NPs produziria características desejadas para detecção dos analitos, preparou-se uma solução de testosterona de concentração $1.10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ para que os eletrodos de ouro com PANI/Au NPs fossem testados quanto à sua capacidade de detecção por VC, como mostrado na Figura 12.

A formação de nanocompósitos PANI-Au NPs no eletrodo ocorre com a redução de sais do ouro pela PANI reduzida, uma vez que o complexo de ouro (AuCl_4^-) têm o potencial redox menos negativo que o da PANI. O nanocompósito PANI-Au NPs é formado por um filme do polímero recoberto com pequenos aglomerados de Au (SHEFFER et al, 2008).

A literatura relata que a detecção de testosterona por métodos eletroquímicos se baseia nas medidas da magnitude das correntes de redução, comprovada frente a diversos estudos sobre eletrodos (MOURA et al, 2014; XUE, Q.; KATO, D., 2013). Para a testosterona, duas formas conjugadas estão presentes na urina, o sulfato de testosterona e o glicuronídeo de testosterona. Justamente por isso, muitos métodos de determinação de testosterona, incluindo o de CLAE, são realizados após a hidrólise ácida do esteroide conjugado sintético em ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. Logo, para a detecção de testosterona neste trabalho foi utilizado o ácido sulfúrico como eletrólito de suporte nas voltametrias cíclicas (KJELD et al, 1978). Sabendo-se dessas informações, através da Figura 12-A, pode-se observar que as correntes de pico anódicas e catódicas no eletrodo modificado resultante aumentam com o acréscimo do número de ciclos durante a eletrodeposição de ouro, ou seja, mais nanopartículas são depositadas em 4 ciclos. No entanto, analisando os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de testosterona em ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 0,96$), na Figura 12-B, um par de picos de corrente anódica e catódica são evidenciados no caso do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs com apenas 2 ciclos durante a eletrodeposição de ouro em $+0,68 \text{ V}$ e $+0,28 \text{ V}$, respectivamente; enquanto que no caso do eletrodo modificado com 4 ciclos apresenta-se apenas um pico de redução em $+0,03 \text{ V}$. Isso pode ser explicado pelo fato de que no caso do eletrodo modificado com 4 ciclos, a superfície eletrodepositada pode ter sofrido um aumento do tamanho dos agregados de ouro de forma que a sua capacidade eletroquímica foi diminuída, tornando o eletrodo isolado em relação à detecção de

testosterona (OLIVEIRA et al, 2016). Portanto, a reação de redução que ocorre no eletrodo modificado com 4 ciclos refere-se sobre a deposição de óxidos de ouro e não da testosterona. Um comparativo pode ser feito analisando o voltamograma do eletrodo de ouro sem nenhuma modificação mostrado na Figura 13, confirmando essa suposição.

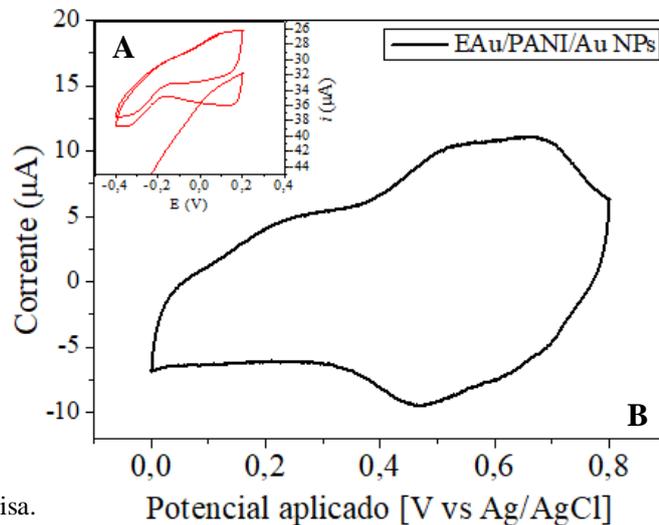
Figura 13 – Voltamograma cíclico típico do eletrodo de ouro sem modificação em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência de testosterona, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Assim, o número de ciclos definido para a eletrodeposição de Au NPs foi de apenas 2 ciclos, resultando no voltamograma cíclico para o eletrodo modificado com PANI e Au NPs abaixo:

Figura 14 – VCs do eletrodo de ouro (EAu) modificado com PANI e Au NPs A) durante (100 mV s^{-1}) e B) pós deposição de NPs em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a 250 mV s^{-1} .



Fonte: Resultados da pesquisa.

Tseng e colaboradores (2007) investigaram o comportamento do efeito de transferência de carga em relação ao nitrogênio presente no nanocompósito PANI-Au NPs, observando as diferenças de alongamento de ligação das funções nitrogenadas amina e imina pela espectroscopia Raman. Neste estudo concluiu-se que as nanopartículas de ouro ligadas a PANI fornecem uma propriedade de transferência de carga parecida ao processo de protonação por *doping* na PANI em meio ácido (TSENG et al, 2007).

O *doping* da PANI é um processo que ocorre quando a base esmeraldina da PANI reage com ácido sulfúrico concentrado promovendo a substituição de um átomo de hidrogênio do anel benzênico pelo grupo $-SO_3H$ na estrutura da PANI, aumentando expressivamente a sua condutividade (BORATO, 2002).

No contexto do nanocompósito PANI-Au NPs, as nuvens de elétrons na ligação C=N do conjugado podem parcialmente se transferir para as Au NPs pelo fato de que a PANI está carregada negativamente de forma parcial. Dessa forma, os processos observados no voltamograma resultante do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs estão relacionados ao efeito de transferência de carga da atuação da PANI como doador e as Au NPs como receptores de elétrons (TSENG et al, 2007).

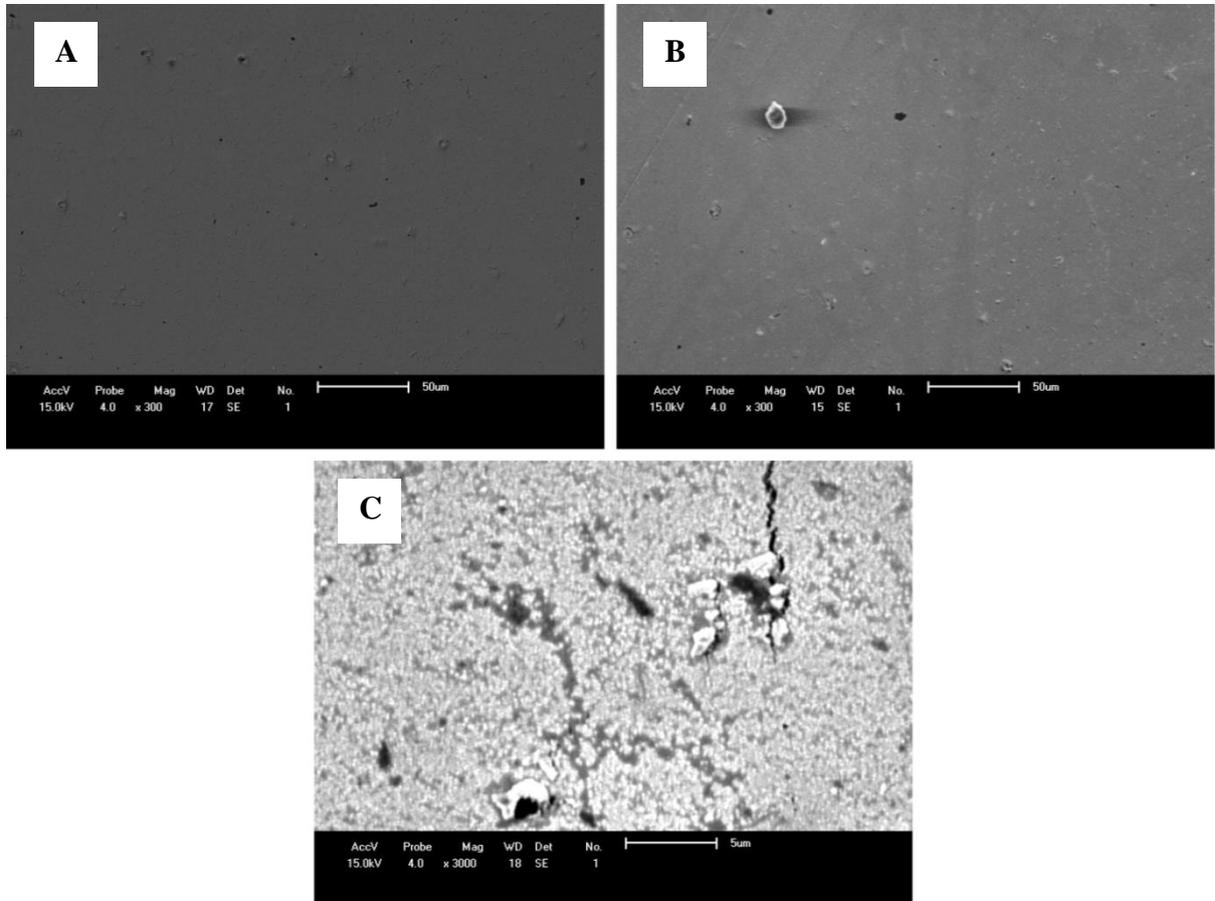
5.4 Caracterização do eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro (EAu/PANI/Au NPs)

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada nesta pesquisa para a obtenção de imagens que fornecessem informações sobre a morfologia de superfície do eletrodo de ouro durante as diferentes etapas do processo de modificação (SHAMSIPUR et al, 2015).

A Figura 15-A mostra a morfologia de superfície lisa pertencente ao eletrodo de ouro limpo (EAu) que após a eletropolimerização da anilina se torna mais rugosa pela formação de um filme fino de PANI, como se observa na Figura 15-B. Já a respectiva morfologia de superfície e distribuição das nanopartículas de ouro depositadas no filme de PANI pode ser visualizada na Figura 15-C. As nanopartículas de ouro depositadas apresentaram um tamanho médio de 218 nm (calculado a partir do software ImageJ, dados no Quadro 1), mostrando uma distribuição homogênea na superfície do eletrodo com recobrimento quase completo.

Figura 15 – Fotomicrografias de MEV de A) EAu limpo, B) EAu/PANI e C) EAu/PANI/Au NPs.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Quadro 1 – Tamanhos individuais e tamanho médio das Au NPs depositadas

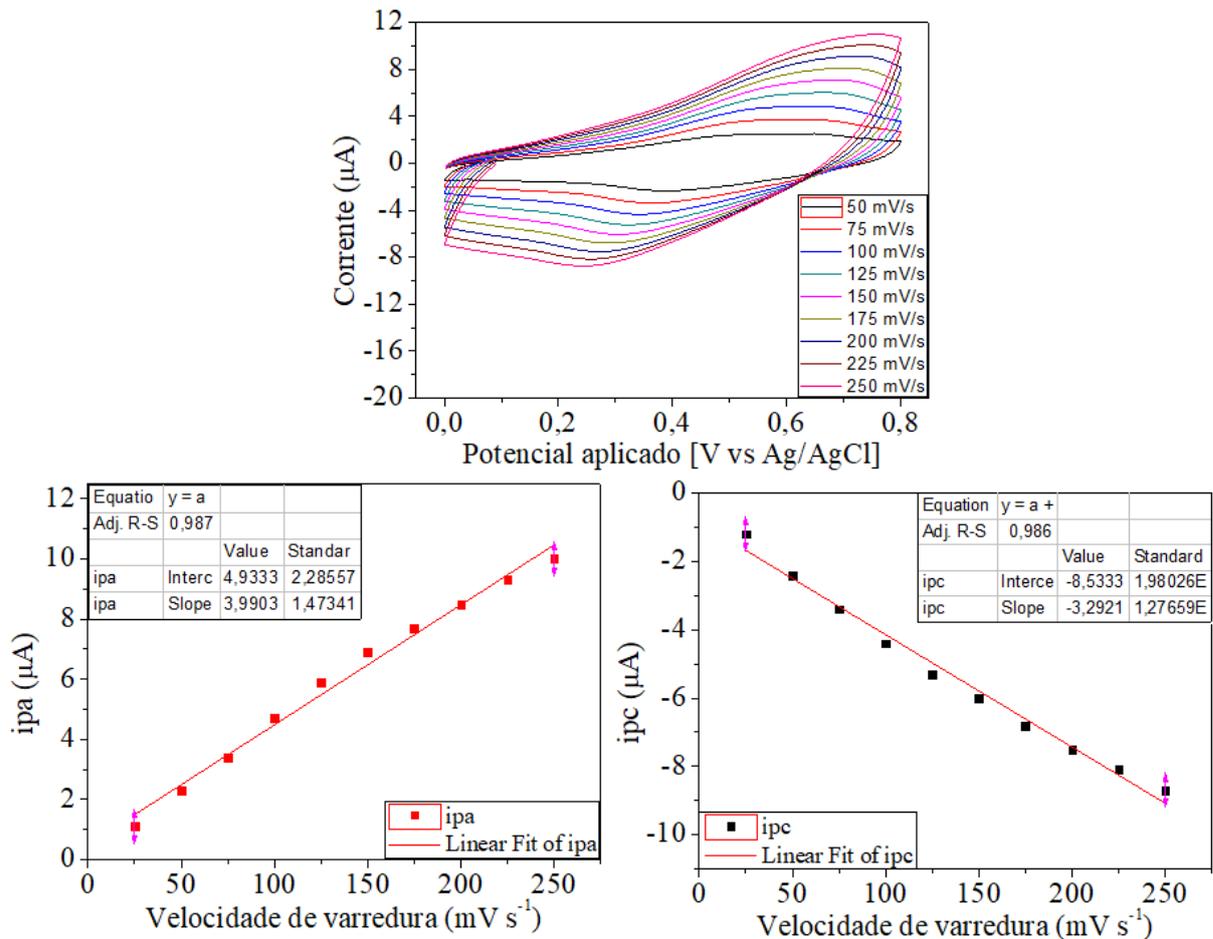
NP	Comprimento (nm)	NP	Comprimento (nm)	NP	Comprimento (nm)	NP	Comprimento (nm)
1	230	9	235	17	180	25	180
2	260	10	186	18	102	26	179
3	365	11	235	19	153	27	153
4	357	12	155	20	285	28	219
5	235	13	255	21	204	29	256
6	231	14	180	22	216	30	204
7	255	15	155	23	210	Tamanho médio = 218 nm	
8	231	16	206	24	218		

Fonte: Adaptado a partir do software ImageJ. Obs: NP = número da nanopartícula observada.

5.4.2 Atividade eletroquímica do eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro (EAu/PANI/Au NPs) em diferentes velocidades de varreduras

Realizou-se VCs nos eletrodos modificados em diferentes velocidades de varredura para um melhor entendimento do comportamento eletroquímico redox do EAU/PANI/Au NPs (MOURA et al, 2014).

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos do EAU/PANI/Au NPs em velocidades de varreduras de 50 a 250 mV s^{-1} em H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} (pH = 1,51) e plots das correntes de pico anódica e catódica para análise de linearidade.



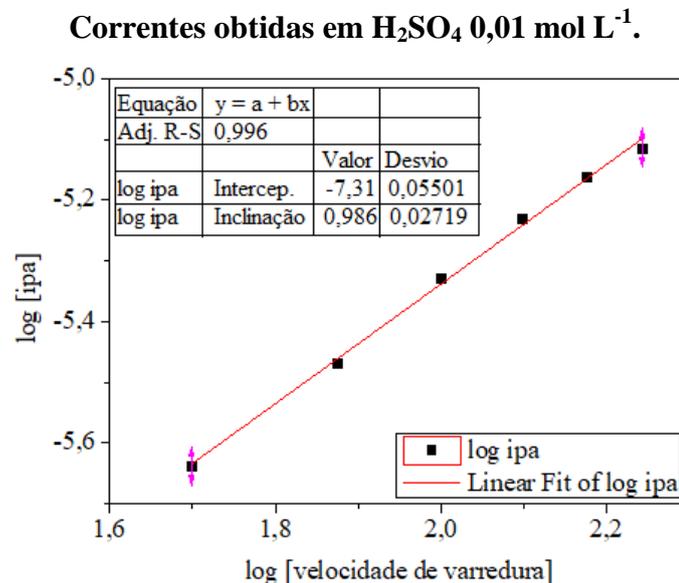
Fonte: Resultados da pesquisa.

Verificou-se a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 16 que os valores de corrente de picos anódicos e catódicos exibiram uma relação linear com o aumento das velocidades de varredura de 50 a 250 mV s^{-1} , com coeficientes de regressão linear (r) de 0,994

e 0,993, respectivamente. Aparentemente, um largo pico redox é encontrado para cada varredura, no entanto, Feng e colaboradores (2006) relataram que esse pico é na verdade a sobreposição de dois processos redox que se fundem quando a PANI é submetida a condições ácidas, sendo o primeiro a conversão do estado leucoesmeraldina para esmeraldina e o segundo a conversão da esmeraldina para a pernigranilina (FENG et al, 2006).

O estudo sobre o mecanismo de transferência eletrônica pode ser elucidado através do logaritmo dos valores de correntes de pico anódico em função do logaritmo das velocidades de varredura. Para processos do tipo adsortivo, no qual as reações ocorrem na superfície do eletrodo, o coeficiente angular da equação da reta obtida pela relação dos logaritmos apresenta valor próximo a 1. Um gráfico foi construído (Figura 17) do logaritmo das correntes de pico anódica *versus* logaritmo das velocidades de varreduras do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs visando à definição sobre o mecanismo de transferência eletrônica, sendo que o valor obtido para o coeficiente angular (0,986) confirmou que o processo é do tipo adsortivo (HOLLER et al, 2009).

Figura 17 – Representação do processo de transferência eletrônica através do logaritmo da corrente do pico anódico (A) vs o logaritmo da velocidade de varredura ($V s^{-1}$).



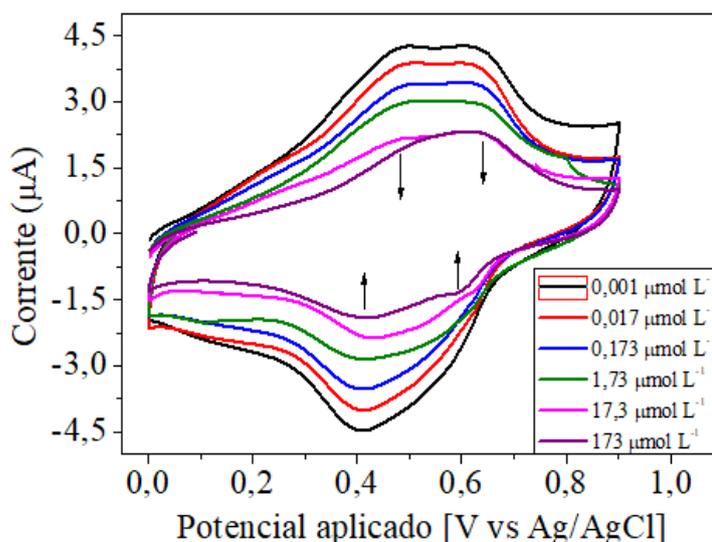
Fonte: Resultados da pesquisa.

5.5 Curva analítica para a determinação de testosterona por voltametria cíclica

Após a determinação das condições ideais e consequente caracterização do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs, realizaram-se testes adicionando diferentes volumes de

um padrão de concentração 1 mmol L^{-1} de testosterona variando a concentração do analito de $0,001 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $173 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ na célula eletroquímica com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A resposta voltamétrica do eletrodo modificado em contato com a testosterona é mostrada na Figura 18.

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir do eletrodo modificado na presença de quantidades crescentes de testosterona em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} .

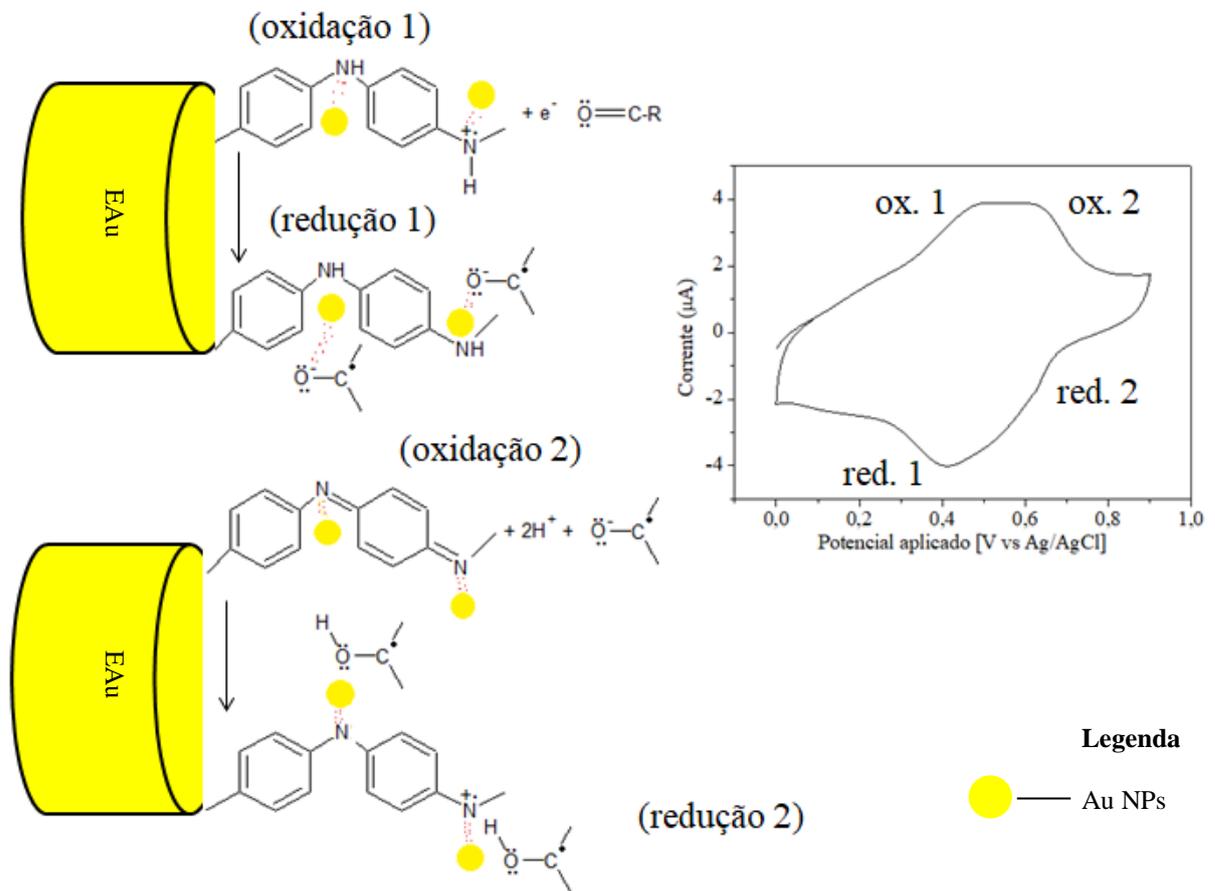


Fonte: Resultados da pesquisa.

O comportamento eletroquímico da testosterona foi estudado para o desenvolvimento de um mecanismo (Figura 19) que explicasse o decréscimo nas áreas de pico catódico próximo a $0,42 \text{ V}$ apresentadas nos voltamogramas. Conforme descrito em Moura e colaboradores, o decréscimo na corrente de pico catódico pode ser atribuído à formação de um radical aniônico do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e a protonação do radical aniônico para converter um grupo carbonila para álcool da molécula de testosterona (MOURA et al, 2014).

Na ausência de testosterona, o processo de transferência de carga se restringe às ressonâncias dos elétrons da PANI para as Au NPs, enquanto que na presença de testosterona a redução é regida por dois processos. O primeiro processo se refere à formação do radical aniônico formado pela atração com o polo positivo induzido das Au NPs, impedindo que a ressonância das nuvens eletrônicas entre a PANI e as Au NPs ocorra contribuindo assim para o decréscimo da corrente de redução do primeiro par redox caracterizado anteriormente na superfície do eletrodo modificado. Já o segundo processo está relacionado à protonação do radical carbonila liberado pela PANI, formando um grupo álcool, que é favorecido pela presença de íons H^+ do eletrólito de suporte (ácido sulfúrico).

Figura 19 – Esquema do mecanismo proposto para detecção de testosterona pelo EAU/PANI/Au Nps em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ (pH = 1,51) a 50 mV s⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

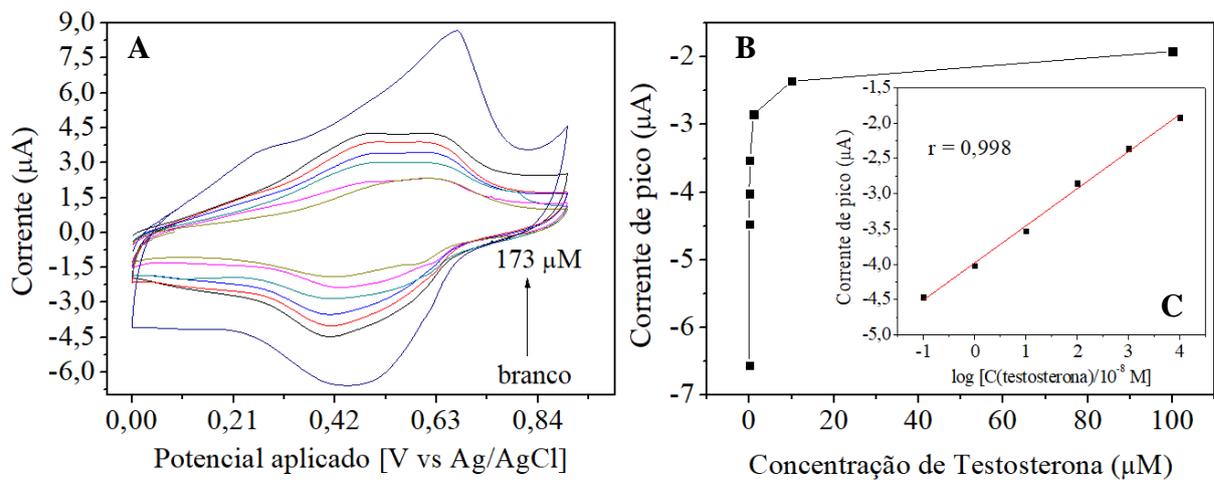
A partir dos dados de correntes de pico catódico fornecidos pela Figura 18, uma curva de calibração foi construída para a determinação de testosterona pelo eletrodo modificado.

Para a obtenção da curva analítica, optou-se por trabalhar com a faixa de 1 nmol L⁻¹ a 173 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a fim de que o método proposto fosse aplicado como sugestão em um possível teste *antidoping*, pois as concentrações mínimas naturais de adultos saudáveis de ambos os sexos (0,001 e 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a mulher e o homem, respectivamente) se encontram nessa faixa.

Entretanto, como é uma faixa ampla para análises, mesmo com a resposta sendo distinguível da concentração mais baixa para a mais alta, um gráfico de Corrente (μA) *versus* logaritmo da Concentração (mol L^{-1}) foi plotado (Figura 20), apresentando uma equação de correlação $i_{p_c} = 0,526 \cdot \log(C_{\text{testosterona}}/10^{-8}) - 4,106$, com coeficiente de regressão linear (r) igual a 0,998. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram estimados

em $0,40 \text{ nmol L}^{-1}$ e $1,3 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente; e o desvio padrão apresentou um valor de $7,07 \cdot 10^{-9}$.

Figura 20 – A) Voltamogramas cíclicos do EAu/PANI/Au Nps para determinação de testosterona, variando as concentrações de 1 nmol L^{-1} a $173 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e curva de calibração da B) Corrente de pico catódico vs Concentração e C) Corrente de pico catódico vs logaritmo da Concentração do EAu/PANI/Au Nps para detecção de testosterona.



Fonte: Resultados da pesquisa.

5.6 Aplicação do eletrodo modificado em amostras de urina sintética

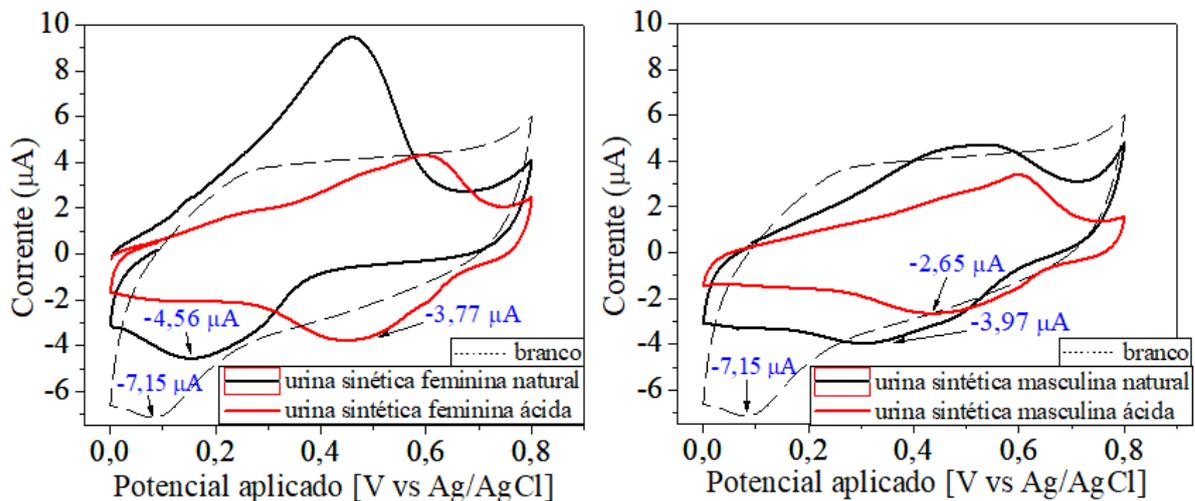
Para investigar a aplicabilidade do método analítico proposto simulando um ensaio próximo a amostra real de um fluido biológico, o eletrodo modificado com PANI e Au NPs foi utilizado para determinação de testosterona em amostras de urina sintética ($\text{pH} = 5,00$) produzida em laboratório, segundo a metodologia exposta em Silva e colaboradores (2015) (SILVA et al, 2015).

O ensaio consistiu em contaminar as amostras de urina com testosterona em concentrações conhecidas para verificar a recuperação pelo eletrodo através da técnica de adição de padrão. Os padrões adicionados foram concentrações naturais manipuladas de testosterona para indivíduos do sexo feminino e masculino na faixa de 25-30 anos, correspondendo a $1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e 20 nmol L^{-1} de testosterona nas amostras de urina para os respectivos sexos (MOON et al, 2014).

A determinação de testosterona em urina sintética também foi avaliada quanto à influência do pH, já que a curva de calibração do presente trabalho foi feita com ácido

sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,51$) como eletrólito de suporte. Acidificou-se a amostra de urina sintética com gotas de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até que o pH ficasse próximo ao da solução de ácido sulfúrico, resultando uma solução de urina com $\text{pH} = 1,69$. A Figura 21 exibe as respostas eletroquímicas das amostras de urina contaminada com $\text{pH} = 5,00$ e $1,69$ em contato com o eletrodo modificado.

Figura 21 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro modificado com PANI e Au Nps para determinação de testosterona com concentrações feminina ($1,3 \text{ nmol L}^{-1}$) e masculina 20 nmol L^{-1} , no qual (—) corresponde a solução de urina com $\text{pH} = 5,00$ e (—) à amostra de urina com $\text{pH} = 1,69$.



Fonte: Resultados da pesquisa.

A partir das respostas de corrente de pico catódico dos voltamogramas pôde-se perceber que as amostras de urina sintética natural para ambos os sexos apresentaram resultados estatísticos próximos à concentração de testosterona adicionada (Tabela 2), com recuperações de 105,4 % para feminina e 91,5 % para a masculina. Entretanto, também é possível perceber um deslocamento do pico catódico em relação ao potencial, que normalmente foi relatado em $0,40 \text{ V}$ na solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, para $0,15 \text{ V}$ na urina feminina natural e $0,31 \text{ V}$ para urina masculina natural. Esta mudança de potencial pode ter ocorrência relacionada ao pH mais elevado do meio ($\text{pH} = 5,00$), no qual a PANI diminui a sua condutividade e favorece a oxidação da pernigranilina para esmeraldina conforme observado por Lange e colaboradores (2010) em um estudo sobre o comportamento do nanocompósito PANI-Au NPs em valores crescentes de pH (LANGE et al, 2010).

Por outro lado, quando as amostras de urina foram acidificadas para posterior adição e quantificação de testosterona, as interações eletrolíticas com as nanopartículas de ouro depositadas no filme de polianilina aumentaram devido a maior condutividade da PANI em soluções com pH ácidos, provocando contribuições nos valores de correntes de pico catódicos diferentes ao esperado para as concentrações de testosterona adicionadas.

Como já discutido anteriormente, quanto menor a corrente de pico catódico maior a concentração de testosterona no eletrodo modificado, então se infere que a presença de ânions dissociados (contra-íons) que compõem a urina (SO_4^{2-} ; Cl^- , PO_4^{3-} , SO_3^-) podem competir pela atração gerada nas nanopartículas de ouro e também atuar como dopantes da PANI, acarretando em recuperações muito maiores do que a realidade, pois tanto os radicais aniônicos da carbonila da molécula da testosterona quanto os ânions da urina estão sendo contabilizados na determinação (PERERA et al, 2016).

Tabela 2 – Dados de recuperação para amostras de urina sintética com adição de testosterona em diferentes concentrações.

Amostra	Testosterona adicionada (nM)	Testosterona detectada (nM)	Recuperação (%)	DPR (% , n = 2)
urina sintética feminina natural	1,30	1,37	105,4	1,4
urina sintética feminina ácida	1,30	43	$3 \cdot 10^3$	0,5
urina sintética masculina natural	20,0	1,83	91,5	0,8
urina sintética masculina ácida	20,0	$6 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^4$	1,3

Fonte: Resultados da pesquisa.

Portanto, como é possível observar pelos dados expostos acima, o eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs alcançou valores satisfatórios para detecção e determinação de testosterona em urina sintética sem tratamento prévio de pH, comprovando a viabilidade da metodologia proposta com valores de recuperação entre 91,5 a 105,4% referente ao analito em estudo. O eletrodo modificado também exibiu reprodutibilidade na detecção de testosterona com um desvio padrão relativo (DPR) de 1,4% para amostra de urina sintética com

concentração feminina de testosterona, bem como 0,8% para a masculina. O eletrodo também foi estocado sob refrigeração durante um mês para avaliação da estabilidade e nenhuma mudança para respostas de voltametria cíclica foram observadas durante esse período. Na Tabela 3 são comparados a faixa linear e o limite de detecção (LOD) para sensores eletroquímicos utilizados na determinação de testosterona de publicações anteriores e do presente trabalho. É notável que o eletrodo de ouro modificado com PANI e Au NPs não só possui a faixa linear mais ampla de todos os trabalhos relatados com valor de LOD próximo a quase todos os dos sensores, mas também apresenta uma confecção prática de baixo custo, sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez no método de análise por VC em urina sintética sem pré-tratamento de amostra, podendo assim vir a ser uma sugestão de método alternativo para testes antidoping em competições.

Tabela 3 – Comparação de sensores eletroquímicos para testosterona.

Eletrodo	Faixa linear	LOD	Referências
Carbono vítreo/óxido de grafeno reduzido	2 nM – 210 nM	0,10 nM	Heidarimoghadam et al. (2016)
Grafite pirolítico/nanotubos de carbono de parede simples	5 nM – 1000 nM	2,80 nM	Goyal et al. (2010)
Au/ MIP acrilato	0,04 nM – 0,173 nM	0,4 nM	Betatache et al. (2014)
Anticorpo	0,04 nM – 34 nM	0,04 nM	Laczka et al. (2011)
Nanocorpo	0,173 nM – 17 nM	0,156 nM	Li et al. (2016)
Au/DMIP	10 fM – 100 fM	10 fM	Fourou et al. (2017)
Au/PANI/Au NPs	1 nM – 173 µM	0,4 nM	Este trabalho

Fonte: Adaptada de Fourou et al. (2017). Obs.: LOD = limite de detecção; Au = ouro; MIP = polímeros molecularmente impressos; DMIP = polímeros molecularmente impressos de dupla camada; PANI = polianilina; NPs = nanopartículas

6 CONCLUSÃO

Com base na proposta deste trabalho, um eletrodo de ouro foi confeccionado em laboratório e modificado superficialmente pela eletrossíntese de um filme fino de polianilina seguida da eletrodeposição de nanopartículas de ouro por meio da técnica de Voltametria Cíclica, visando o uso como sensor eletroquímico para detecção de testosterona.

O eletrodo resultante das modificações foi caracterizado por voltametria cíclica, apresentando dois processos redox nos voltamogramas em torno de 0,4 a 0,7 V que foram elucidados através de um mecanismo proposto. A microscopia eletrônica de varredura também possibilitou comprovar a visualização das diferentes etapas de modificação do eletrodo, sendo assim possível observar o recobrimento da superfície pelo filme de polianilina e as nanopartículas de ouro esféricas depositadas de aproximadamente 218 nm de tamanho, distribuídas de forma homogênea na superfície do eletrodo.

Após a otimização dos parâmetros experimentais do eletrodo modificado, as melhores condições experimentais para determinação de testosterona foram selecionadas em ácido sulfúrico com medidas de voltametria cíclica em potencial controlado de 0,0 a 0,8 V vs Ag/AgCl e velocidade de varredura igual a 50 mV s⁻¹. Os voltamogramas do eletrodo modificado em contato com a testosterona apresentaram dois picos de oxidação e redução que se mostraram processos adsorptivos quase-reversíveis, no entanto se escolheu utilizar o primeiro pico de redução na quantificação do analito por ser mais evidente a linearidade na faixa entre 1 nmol L⁻¹ e 173 µmol L⁻¹. O limite de detecção obtido foi de 0,4 nmol L⁻¹, enquanto que o de quantificação foi de 1,3 nmol L⁻¹, valores próximos ou menores que os relatados na literatura para determinação de testosterona.

Por fim, o estudo para determinação de testosterona em amostras de urina sintética com concentrações conhecidas do analito foi realizado, apresentando recuperações pelo eletrodo com exatidão entre 91,5 a 105,4% e precisão de 1,4 a 0,8%.

Feitas estas considerações, o eletrodo de ouro modificado com polianilina e nanopartículas de ouro foi produzido de forma menos complexa que a maioria das modificações de eletrodos encontradas na literatura, apresentando vantagens importantes como a pequena quantidade de reagentes utilizados, a fácil execução e rapidez dos experimentos, baixo custo, sensibilidade, reprodutibilidade e sem necessidade de tratamento prévio em relação aos testes de urina sintética, configurando-se como um sensor eletroquímico que pode vir a ser utilizado como sugestão de método alternativo em testes *antidoping* de competições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KHALIK, J.; BJÖRKLUND, E.; HANSEN, M. Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography B**, v.928, p.58-77, 2013.

ADUMITRĂCHIOAIE, A.; TERTIS, M.; CERNAT, A.; SĂNDULESCU, R.; CRISTEA, C. Electrochemical methods based on molecularly imprinted polymers for drug detection. A review. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v.13, p.2556-2576, 2018.

AKITA, A. H.; BARRAGAN, J. T. C.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V. Desenvolvimento de microcélula eletroquímica para estudos de microrregiões. **Quim. Nova**, v.35, n.1, p.218-222, 2012.

ALQURAINI, H.; AUCHUS, R. J. Strategies that athletes use to avoid detection of androgenic-anabolic steroid doping and sanctions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p.1-6, 2017.

ANAWALT, B. D. Detection of anabolic androgenic steroid use by elite athletes and by members of the general public. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.464, p.21-27, mar. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 21 de dezembro de 2017.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2224-2234, 2009.

BALTRŪNAS, G.; VALIŪNIENĖ, A.; VIENOŽINSKIS, J.; GAIDAMAUSKAS, E.; JANKAUSKAS, T.; MARGARIAN, Ž. Electrochemical gold deposition from sulfite solution: application for subsequent polyaniline layer formation. **J. Appl. Electrochem.**, v.38, p.1519-1526, 2008.

BETATACHE, A.; LAGARDE, F.; SANGLAR, C.; BONHOMME, A.; JAFFREZIC-RENAULT, D. L.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Gold electrodes modified with molecular imprinted acrylate polymer for impedimetric determination of testosterone. **Sensors & Transducers**, v.27, p.92-99, 2014.

BONASTRE, A. M.; BARTLETT, P, N. Electrodeposition of PANI films on platinum needle type microelectrodes. Application to the oxidation of ascorbate in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v.676, p.1-8, 2010.

BORATO, C. E. **Estudo de filmes poliméricos ultrafinos de polianilinas para aplicação em sensores**. 2002. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

BOWERS, L. D. The analytical chemistry of drug monitoring in the athletes. **Ann. Ver. Anal. Chem.**, v.2, p.485-507, 2009.

CAMPOS, D. R.; YONAMINE, M.; ALVES, M. J. N. N.; MOREAU, R. L. M. Determinação de esteroides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, 2005.

CHA, E.; JEONG, E. S.; CHA, S.; LEE, J. Coupling of gas chromatography and electrospray ionization high resolution mass spectrometry for the analysis of anabolic steroids as trimethylsilyl derivatives in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p.123-133, 2017.

CHU, W.; ZHOU, Q.; LI, S.; ZHAO, W.; LI, N.; ZHENG, J. Oxidation and sensing of ascorbic acid and dopamine on self-assembled gold nanoparticles incorporated within polyaniline film. **Applied Surface Science**, v.353, p.425-432, 2015.

COT, A.; LAKARD, S.; DEJEU, J.; ROUGEOT, P.; MAGNET, C.; LAKARD, B.; GAUTHIER, M. Electrosynthesis and characterization of polymer films on silicon substrates for applications in micromanipulation. **Synthetic Metals**, v.162, n.24, p.2370-2378, 2012.

COTILLAS, S.; LACASA, E.; SÁEZ, C.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M. A. Electrolytic and electro-irradiated Technologies for the removal of chloramphenicol in synthetic urine with diamond anodes. **Water Res.**, v.128, p.383-392, 2018.

DAKSH, S.; GOYAL, A.; PANDIYA, C. Validation of analytical methods – strategies & significance. **Int. J. Res. Dev. Pharm. Life Sciences**, v.4, n.3, p1489-1497, 2015.

DBIRA, S.; BENSALAH, N.; BEDOUI, A.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M. A. Treatment of synthetic urine by electrochemical oxidation using conductive-diamond anodes. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v.22, n.8, p.6176-6184, 2015.

FENG, X.; MAO, C.; YANG, G.; HOU, W.; ZHU, J. Polyaniline/Au composite hollow spheres: synthesis, characterization and application to the detection of dopamine. **Langmuir**, v.22, p.4384-4389, 2006.

FOGUEL, M. V.; SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; MAGNANI, M.; MASCINI, M.; SKLADAL, P.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Comparison of gold CD-R types as electrochemical device and as platform for biosensors. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.27, n.4, p.650-662, apr. 2016.

FONSECA, C. P.; ALMEIDA, D. A. L.; OLIVEIRA, M. C. D.; BALDAN, M. R.; FERREIRA, N. G. Influence of the polymeric coating thickness on the electrochemical performance of Carbon Fiber/PAni composites. **Polímeros**, v.25, n.5, p.425-432, 2015.

FONTANA, A.; GARCIA, F.; GARCIA, J. R. Síntese eletroquímica e tratamento da nucleação do filme de polianilina (PANI) em aço inox 304. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v.18, n.1, p.15-21, 2012.

FORSDAHL, G.; ERCEG, D.; GEISENDORFER, T.; TURKALJ, M.; PLAVEC, D.; THEVIS, M.; TRETZEL, L.; GMEINER, G. Detection of testosterone esters in blood. **Drug Test. Analysis**, v.7, p.983-989, 2015.

FOUROU, H.; BRAIEK, M.; BONHOMME, A.; LAGARDE, F.; ZAZOUA, A.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Voltammetric sensor based on a double-layered molecularly imprinted polymer for testosterone. **Analytical Letters**, v.51, n.3, p.312-322, 2017.

GENG, J. W.; YE, Y. J.; GUO, D.; LIU, X. X. Concurrent electropolymerization of aniline and electrochemical deposition of tungsten oxide for supercapacitor. **Journal of Power Sources**, v.342, p.980-989, 2017.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Electrochemical investigations of corticosteroid isomers-testosterone and epitestosterone and their simultaneous determination in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v.657, p.147-153, 2010.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; OYAMA, M.; BACHHETI, N. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. **Electrochemistry Communications**, v.7, p.803-807, 2005.

GROBER, E. D.; GARBENS, A.; BOŽOVIĆ, A. Accuracy of testosterone concentrations in compounded testosterone products. **J; Sex. Med.**, v.12, p.1381-1388, 2015.

GUPTA, N.; SHARMA, S.; MIR, I. A.; KUMAR, D. Advances in sensors based on conducting polymers. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.65, p.549-557, 2006.

GVOZDENOVIĆ, M. M.; JUGOVIĆ, B. Z.; STEVANOVIĆ, J. S.; GRGUR, B. N. Electrochemical synthesis of electroconducting polymers. **Hem. Ind.**, v.68, n.6, p.673-684, 2014.

GVOZDENOVIĆ, M. M.; JUGOVIĆ, B. Z.; STEVANOVIĆ, J. S.; TRIŠOVIĆ, T. Lj.; GRGUR, B. N. Electrochemical polymerization of aniline. In: E. Schab-Balcerzak. (Org.). **Electropolymerization**. Rijeka: InTech 2011. p.77-96.

HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H.; NICOLAY, A. Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, v.1190, p.278-285, 2008.

HEIDARIMOGHADAM, R.; AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; HASHEMI, E.; MORTAZAVI, S. S.; FARMANY, A. Label free graphene oxide for rapid determination of testosterone in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. **Materials Science & Engineering C**, v.61, p.246-250, 2016.

HEINZE, J.; FRONTANA-URIBE, B.; LUDWIGS, S. Electrochemistry of conducting polymers-persistent models and new concepts. **Chemical Reviews**, v.110, n.8, p.4724-4771, jun. 2010.

HERNÁNDEZ, W. T. Electrochemical characterization of mass transport at microelectrode arrays. **Revista de Ciencias**, v.18, n.1, p.101-110, 2014.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Celio Pasquini. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.

HOLZE, R. The adsorption of thiophenol on gold – a spectroelectrochemical study. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.17, p.21364-21372, 2015.

HUANG, J.; VIRJI, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Nanostructured polyaniline sensors. **Chemistry – A European Journal**, v.10, n.6, p.1314-1319, mar. 2004.

IMPENS, S.; WASCH, K.; BRABANDER, H. Determination of anabolic steroids with gas chromatography-ion trap mass spectrometry using hydrogen as carrier gas. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.15, p.2409-2414, 2001.

INMETRO, **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ – CGCRE – 008**: Revisão 03 – FEV/2010. Coordenação Geral de Acreditação – Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial. 2010.

JI, D.; LIU, L.; LI, S.; CHEN, C.; LU, Y.; WU, J.; LIU, Q. Smartphone-based cyclic voltammetry system with graphene modified screen printed electrodes for glucose detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v.98, p.449-456, 2017.

KELLENBERGER, A.; AMBROS, D.; PLESU, N. Scan rate dependent morphology of polyaniline films electrochemically deposited on nickel. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v.9, p.6821-6833, 2014.

KJELD, J. M.; PUAH, C. M.; JOPLIN, G. F. Synthetic and endogenous testosterone conjugates: acid hydrolysis studied by radioimmunoassay. **Clinica Chimica Acta**, v.86, p.235-243, 1978.

KUSHIKAWA, R. T. **Aplicação de nanopartículas intermetálicas de NiSb e metálicas de Pt suportadas em carbono Vulcan® XC72 no desenvolvimento de um sensor eletroquímico**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LANGE, U.; IVANOV, S.; LYUTOV, V.; TSAKOVA, V.; MIRSKY, V. M. Voltammetric and conductometric behavior of nanocomposites and gold nanoparticles prepared by layer-by-layer technique. **J. Solid State Electrochem**, v.14, p.1261-1268, 2010.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v.29, n.6, p.1318-1325, dez. 2006.

LI, G.; ZHU, M.; MA, L.; YAN, J.; LU, X.; SHEN, Y.; WAN, YAKUN. Generation of small single domain nanobody binders for sensitive detection of testosterone by electrochemical impedance spectroscopy. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.8, n.22, p.13830-13839, 2016.

LUO, M.; HUA, Y.; LIANG, Y.; HAN, J.; LIU, D.; ZHAO, W.; WANG, P. Synthesis of novel β -cyclodextrin functionalized S, N codoped carbono dots for selective detection of testosterone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p.195-201, dec. 2017.

MA, W.; YING, Y. L.; QIN, L. X.; GU, Z.; ZHOU, H.; LI, D. W.; SUTHERLAND, T. C.; CHEN, H. Y.; LONG, Y. T. Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. **Nature Protocols**, v.8, n.3, p.439-450, 2013.

MAHLA, D. K.; BHANDARI, S.; RAHAMAN, M.; KHASTGIR. Morphology and cyclic voltammetry analysis of in situ polymerized polyaniline/graphene composites. **Journal of Electrochemical Science and Engineering**, v.3, n.4, p.157-166, 2013.

MANJUNATHA, J. G. A new electrochemical sensor based on modified carbon nanotube-graphite mixture paste electrode for voltammetric determination of resorcinol. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v.10, n.12, 2017.

MATTOSO, L. H. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Quím. Nova**, São Paulo, v.19, n.4, p.388-399, 1996.

MAZEIKO, V.; KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A.; RAMANAVICIENE, A.; BALEVICIUS, Z.; RAMANAVICIUS, A. Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.189, p.187-193, 2013.

MCDONALD, J. G.; MATTHEW, S.; AUCHUS, R. J. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. **Horm. Cancer.**, v.2, n.6, p.324-332, dec. 2011.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Rev. Eletrônica de Materiais e Processos**, v.7, n.2, p.62-77, 2012.

MÉITÉ, L.; SORO, B. D.; ABOUA, N. K.; MAMBO, V. TRAORÉ, K. S.; MAZELLIER, P.; LAAT, J. Qualitative determination of photodegradation products of progesterone and testosterone in aqueous solution. **American Journal of Analytical Chemistry**, v.7, p.22-33, 2016.

MELLO, H. J. N. P. D.; MULATO, M. Effect of aniline monomer concentration on PANI electropolymerization process and its influence for applications in chemical sensors. **Synthetic Metals**, v.239, p.66-70, 2018.

MELO, S. M. **Sensor eletroquímico para detecção de organismos geneticamente modificados: detecção do promotor P35S**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia: Renorbio) – Universidade Federal do Piauí, Piauí. 2016.

MOON, J. Y.; KWON, W.; SUH, S.; CHEONG, J. C.; IN, M. K.; CHUNG, B. C.; KIM, J. Y.; CHOI, M. H. Reference ranges for urinary levels of testosterone and epitestosterone, which may reveal gonadal function, in a Korean male population. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.140, p.100-105, 2014.

MORALES-CRUZ, M.; LÓPEZ-NIEVES, M.; MORALES-HERNÁNDEZ, R.; RIVERA-CRESPO, G. C.; TORANZOS, G. A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, I.; CABRERA, C. R. Proteus vulgaris – Pt electrode system for urea to nitrogen conversion in synthetic urine. **Bioelectrochemistry**, 2018.

MOURA, S. L.; MORAES, R. R.; SANTOS, M. A. P.; PIVIDORI, M. I.; LOPES, J. A. D.; MOREIRA, D. L.; ZUCOLOTTI, V.; SANTOS JÚNIOR, J. R. S. Electrochemical detection *in vitro* and electron transfer mechanism of testosterone using a modified electrode with a cobalt oxide film. **Sensors and Actuators B**, n.202, p.469-474, 2014.

OLIVEIRA, R. PISSETTI, F. L.; LUCHO, A. M. S. Eletrodos de fto modificados por eletrodeposição direta de ouro: produção, caracterização e aplicação como sensor eletroquímico. **Quím. Nova**, São Paulo, v.39, n.2, p.146-155, 2016.

OSTOJÍĆ, J.; HERENDA, S.; BEŠIĆ, Z.; MILOŠ, M.; GALIĆ, B. Advantages of an electrochemical method compared to the spectrophotometric kinetic study of peroxidase inhibition by boroxine derivative. **Molecules**, v.22, n. 7, jul. 2017.

PERERA, G. S.; YANG, G.; NETTLES, C. B.; PEREZ, F.; HOLLIS, T. K.; ZHANG, D. Counterion effects on electrolyte interactions with gold nanoparticles. **The J. Phys. Chem.**, v.120, p.23604-23612, 2016.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v.165, p.216-224, 2007.

PITARCH-MOTELLÓN, J.; ROIG-NAVARRO, A. F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; FABREGAT-CABELLO, N.; POZO, O. J.; VENTURA, R.; ALONSO, J. I. G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; GAGO, A. G.; ARTABE, A. E.; EENOO, P. V.; DEVENTER, K.; DEHNES, Y.; RZEPPA, S. Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, v. 1508, p.73-80, jul. 2017.

PRON, A.; RANNOU, P. Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. **Prog. Polym. Sci.**, v.27, p.135-190, 2002.

RESTREPO, H. F.; CERVERA, J. G.; HOYOS, B. A. Síntesis de poli-anilina por oxidación electroquímica. **Dyna**, n.147, p.57-63, 2005.

ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.9, n.2, p.98-105, jul. – dez. 2014.

SAJID, M.; NAZAL, M. K.; MANSHA, M.; ALSHARAA, A.; JILLANI, S. M. S.; BASHEER, C. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v.76, p.15-29, 2016.

SAYYID, R. K.; SAYYID, A. K.; KLAASSEN, Z.; FADAAK, K.; GOLDBERG, H.; CHANDRASEKAR, T.; AHMAD, A.; LEO, R.; PERLIS, N.; CHADWICK, K.; HAMILTON, R. J.; KULKARNI, G. S.; FINELLI, A.; ZLOTTA, A. R.; FLESHNER, N. E. Testosterone responders to continuous androgen deprivation therapy show considerable variations in testosterone levels on followup: implications for clinical practice. **J. Urol.**, v.199, n.1, p.251-256, jan. 2018.

SEZGIN, S.; ATES, M.; PARLAK, E. A.; SARAC, A. S. Scan rate effect of 1-(4-methoxyphenyl)-1H-Pyrrole electroncoated on Carbon Fiber: characterization via cyclic voltammetry, FTIR-ATR and electrochemical impedance. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v.7, p.1093-1106, 2012.

SHAMSIPUR, M.; KARIMI, Z.; TABRIZI, M. A. A highly sensitive hydrogen peroxide sensor based on (Ag–Au NPs)/poly[o-phenylenediamine] modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering C**, v.56, p.426-431, 2015.

SHEFFER, M.; MARTINA, V.; SEEBER, R.; MANDLER, D. Deposition of gold nanoparticles on thin polyaniline films. **Isr. J. Chem.**, v.48, n.3-4, p.349-357, 2008.

SHRIVASTAV, T. G.; KANAUIA, P. K. Direct radioimmunoassay for the measurement of serum testosterone using ^3H as label. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.28, n.2, p.127-136.

SILVA, L. P.; LOURENCAO, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica simultânea de besilato de anlodipino e hidroclorotiazida em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Quím. Nova**, v.38, n.6, p.801-806, 2015.

SLUIS, T. M.; VIS, A. N.; MOORSELAAR, R. J. A.; BUI, H. N.; BLANKENSTEIN, M. A.; MEULEMAN, E. J. H.; HEIJBOER, A. C. Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part I: concentrations and methods of determination in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **BJU Int.**, v.109, n.2, p.176-182, jan. 2012.

SONG, E.; CHOI, J. W. Conducting polyaniline nanowire and its applications in chemiresistive sensing. **Nanomaterials**, v.3, p.498-523, 2013.

STUDZIŃSKA, S.; BUSZEWSKI, B. Fast method for the resolution and determination of sex steroids in urine. **J. of Chromat. B**, v. 927, p.158-163, 2013.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: an updated review. **Pharm. Methods**, v.1, n.1, p.25-38, 2010.

TSENG, R. J.; BAKER, C. O.; SHEDD, B.; HUANG, J.; KANER, R. B.; OUYANG, J.; YANG, Y. Charge transfer effect in the polyaniline-gold nanoparticle memory system. **Appl. Phys. Lett.**, v.90, 2007.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v.11, n.26, 2007.

VIAL, J.; JARDY, A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of na HPLC method. **Anal. Chem.**, v.71, p.2672-2677, 1999.

WANG, H.; LIN, J.; SHEN, Z. X. Polyaniline (PANi) based electrode materials for energy storage and conversion. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v.1, p.225-255, sep. 2016.

WANG, Y.; LABORDA, E.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R. G. Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behaviour of 'macro' gold. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.9, n.15, p.3133-3136, jan. 2013.

XAVIER, M. G.; LEITE, F. L.; LEITE, E. R.; VENANCIO, E. C.; MACDIARMID, A. G.; MATTOSO, L. H. C. Electrochemical synthesis of polyaniline nanoparticles and nanofibers. **NSTI-Nanotech**, v.2, p.816-819, 2006.

XIAO, X.; SI, P.; MAGNER, E. An overview of dealloyed nanoporous gold in bioelectrochemistry. **Bioelectrochemistry**, v.109, p.117-126, 2016.

XUE, Q.; KATO, D.; KAMATA, T.; GUO, Q.; YOU, T.; NIWA, O. Human cytochrome P450 3A4 and a carbon nanofiber modified film electrode as a platform for the simple evaluation of drug metabolism and inhibition reactions. **Analyst**, v.138, p.6463-6468, 2013.

YADAV, S. K.; CHANDRA, P.; GOYAL, R. N.; SHIM, Y. A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v.762, p.14-24, 2013.

YANG, Y.; ZHANG, S.; KANG, M.; HE, L.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Z. Selective detection of silver ions using mushroom-like polyaniline and gold nanoparticle nanocomposite-based electrochemical DNA sensor. **Analytical Biochemistry**, v.490, p.7-13, 2015.

YOGESWARAN, U.; CHEN, S. M. A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. **Sensors**, v.8, p.290-313, 2008.

ZHANG, H.; LI, W.; LUO, H.; XIONG, G.; YU, Y. Quantitative determination of testosterone levels with bilayer interferometry. **Chemico-Biological Interact.**, v.276, p.141-148, 2017.

ZHAO, W.; ZHANG, R.; XU, S.; CAI, J.; ZHU, X.; ZHU, Y.; WEI, W.; LIU, X.; LUO, J. Molecularly imprinted polymeric nanoparticles decorated with Au NPs for highly sensitive and selective glucose detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v.100, p.497-503, feb. 2018.

ZHENG, J.; MA, X.; HE, X.; GAO, M.; LI, G. Preparation, characterizations, and its potential applications of PANi/graphene oxide nanocomposite. **Procedia Engineering**, v.27, p.1478-1487, 2012.

ZULFIQAR, A.; MORGAN, G.; TURNER, N. W. Detection of multiple steroidal compounds in synthetic urine using comprehensive gas chromatography-mass spectrometry (GCxGC-MS) combined with a molecularly imprinted polymer clean-up protocol. **Analyst**, v.139, n.19, p.4955-63, 2014.