

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FILOMENO ABOO DIBALIUA INROGA

**ESTRUTURAS DENDRÍTICAS DE OURO E SUA APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA
DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA)**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FILOMENO ABOO DIBALIUA INROGA

**ESTRUTURAS DENDRÍTICAS DE OURO E SUA
APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA
DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA)**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutorado em Química

Prof.^a Dr.^a Jacqueline Arguello da Silva
Orientadora

Prof. Dr. Vladimir Lavayen
Co-orientador

Porto Alegre, Janeiro de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Dibaliua Inroga, Filomeno Aboo
ESTRUTURAS DENDRÍTICAS DE OURO E SUA APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE
BISFENOL A (BPA) / Filomeno Aboo Dibaliua Inroga. --
2019.

112 f.

Orientadora: Jacqueline Arguello da Silva.

Coorientador: Vladimir Lavayen.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

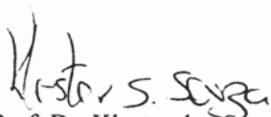
1. Bisfenol A,. 2. tirosinase,. 3. microestruturas
de ouro,. 4. biossensor,. 5. eletrodo impresso de
carbono,. I. Arguello da Silva, Jacqueline, orient.
II. Lavayen, Vladimir, coorient. III. Título.

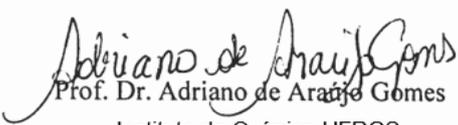
A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Março de 2015 e Janeiro de 2019, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Jacqueline Argüello da Silva e Co-orientação do Professor Doutor Vladimir Lavayen. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Yara Patrícia da Silva
Universidade de Passo Fundo- UPF


Prof. Dr. Fernando Bonatto
Escola de Engenharia-UFRGS

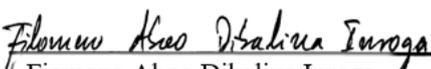

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza
Instituto de Química-UFRGS


Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes
Instituto de Química-UFRGS


Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo
Instituto de Química-UFRGS


Profa. Dra. Jacqueline Arguello da Silva
(Orientadora)


Prof. Dr. Vladimir Lavayen
(Co-orientador)


Fiomeno Aboo Dibaliua Inroga

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King Jr.

*Dedico este trabalho a minha querida esposa
Mércia e aos meus filhos queridos Kelvin e Allen,
pois são a razão da minha felicidade.*

Agradecimentos

Quero prestar a minha homenagem a todos que julgo ter contribuído de algum modo para que esta etapa da minha vida acadêmica fosse alcançada.

Em primeiro lugar, agradecer a Deus, pelo dom da vida. Estende-se aos meus pais que me trouxeram ao mundo e aos meus irmãos que tiveram o cuidado de serem os meus primeiros pedagogos e souberam lidar com as complexidades da minha adolescência.

A minha querida e amada esposa Mércia Inroga, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo, amor, carinho e apoio em todos os momentos desta caminhada. Aos meus filhos, Kelvin Inroga e Allen Inroga pelo carinho, apoio, paciência e, principalmente por aprenderem a lidar com o sacrifício e privações a que tiveram que passar. Obrigado pela compreensão.

Agradecimento especial vai para os meus orientadores, Professora Jacqueline Arguello da Silva e Professor Vladimir Lavayen, pela oportunidade de frequentar o doutoramento, pelas correções e sugestões feitas, pela paciência, pela confiança depositada e tudo de bom que por mim fizeram. Vai a minha gratidão e apreço!

Aos meus colegas de laboratório, Vanessa, Natália e Thagor, pelo apoio de sempre e pela amizade; muito obrigado.

Aos professores Felisberto Singo, Brigida Singo e Marcos Cherinda da Universidade Pedagógica de Moçambique, pelas cartas de recomendação e todo o apoio disponibilizado; sem me esquecer dos colegas e amigos Cristina Martinho, Malaquias Tsambe e Manuel Zunguze por terem feito a ponte para os primeiros contatos com os orientadores.

A estadia em Porto Alegre criou laços de amizade, aos quais se estendem os meus agradecimentos: ao Kota Claudio e sua família, a Patrícia Cambraia (minha irmã gaúcha) e sua família, a Paula Marona e sua família, a comunidade católica da Paróquia São Carlos; o meu muito obrigado pelo acolhimento.

Ao programa de PPGQ-UFRGS, em especial os seus coordenadores, Professor Paulo H. Schneider pela carta de aceite e Fabiano Severo Rodembusch por acompanhar a finalização desta jornada.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas contribuições.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise, em especial a Denise Raquel Bohn, pelo apoio disponibilizado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa (CNPq/MCT-Moz), a Fundação Calouste Gulbenkian, e ao INCTBio pelo apoio financeiro.

Produção Científica do Período

Trabalhos apresentados pelo autor em congressos gerados a partir desta tese

Filomeno Aboo Dibaliua Inroga, Vladimir Lavayen e Jacqueline Arguello. *Biossensor enzimático a base de tirosinase e nanoestruturas de ouro para determinação de bisfenol A*. 18° Encontro Nacional de Química Analítica, Química Analítica integrada à sociedade, Florianópolis, SC (setembro/2016).

Filomeno Aboo Dibaliua Inroga, Natalia Goedel Medeiros e Jacqueline Arguello. *Eletrodo a base de nanoestruturas de CuO para determinação de ácido ascórbico*. I Encontro Multidisciplinar em Ciência dos Materiais do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (novembro/2016).

Filomeno Aboo Dibaliua Inroga, Vladimir Lavayen e Jacqueline Arguello. *Enzymatic biosensor based on tyrosinase and gold nanostructures for Bisphenol A determination*. 46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, São Paulo, SP (julho/2017).

Filomeno Aboo Dibaliua Inroga, Vladimir Lavayen e Jacqueline Arguello. *Enzymatic biosensor based on tyrosinase and gold nanostructures for Bisphenol A determination*. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (41^a RASBQ). Foz do Iguaçu, PR (maio/2018).

Filomeno Aboo Dibaliua Inroga, Vladimir Lavayen e Jacqueline Arguello, 5^{to} Congreso Uruguayo de Química Analítica, *Estruturas dendríticas de ouro para imobilização da enzima tirosinase na construção de um biossensor para BPA*, Montevideú, Uruguai (outubro/ 2018).

Sumário

Agradecimentos	v
Produção Científica do Período	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Equações	xiv
Símbolos e abreviaturas	xv
Resumo	xvi
Abstract.....	xvii
1. Introdução	1
1.1. Natureza e importância do tema	2
1.2. Apresentação e organização da tese.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo geral.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Bisfenol A	6
2.2. Biossensor	13
2.2.1. Definição, constituição e classificação.....	13
2.2.2. Métodos de imobilização	14
2.2.3. Fatores de desempenho dos biossensores.....	16
2.3. Enzima tirosinase	16
2.4. Nanoestruturas de ouro	19
2.4.1. Propriedades e métodos de síntese	19
2.4.2. Nanoestruturas dendríticas	20
2.5. Eletrodos de Lápis grafite	22
2.5.1. Grafite.....	22
2.5.2. Lápis grafite.....	23
2.5.3. Aplicações como eletrodos.....	25
3. Parte Experimental.....	29
3.1. Reagentes	30
3.2. Técnicas utilizadas na preparação e caracterização do biossensor	30
3.2.1. Voltametria cíclica	30

3.2.2. Cronoamperometria.....	33
3.2.3. Difração de raios X	33
3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura	36
3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão	38
3.3. Metodologia.....	41
3.3.1. Eletrodeposição de ouro sobre EIC	41
3.3.2. Preparação do biossensor	42
3.3.3. Determinação do BPA utilizando o biossensor Nafion/Tir/Au/EIC	43
3.3.4. Eletrodeposição de ouro sobre eletrodo de lápis grafite	43
4. Resultados e Discussão	45
4.1. Parte A – Desenvolvimento do biossensor Nafion/Tir/Au/EIC.....	46
4.1.1. Síntese de nanoestruturas de ouro sobre o eletrodo impresso de carbono (EIC).....	46
4.1.2. Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado.....	55
4.1.3. Aplicação do biossensor Nafion/Tir/Au/EIC na determinação do BPA	58
4.1.3.1. Avaliação da resposta do biossensor	58
4.1.3.2. Estudo da influência do tempo de pré-concentração.....	61
4.1.3.3. Estudo da influência da velocidade de varredura.....	62
4.1.3.4. Estudo do efeito do pH.....	64
4.1.3.5. Construção da curva analítica para determinação de BPA	65
4.1.3.5. Repetibilidade e estabilidade do biossensor.....	68
4.1.3.6. Avaliação de possíveis interferentes	69
4.2. Parte B – Desenvolvimento do Eletrodo de lápis grafite (PGE).....	72
4.2.1. Síntese das microestruturas de ouro sobre lápis grafite.....	72
4.2.2. Caracterização das nanoestruturas de ouro eletrodepositadas no lápis grafite	77
5. Conclusões	79
6. Referências bibliográficas	82

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografias de posto de venda de alimentos instalado ao lado de uma Escola em Maputo-Moçambique. Fonte: o autor.	3
Figura 2. Representação da estrutura química do BPA. Adaptado da Ref. 7.....	6
Figura 3. Representação da reação de oxidação do bisfenol A.	10
Figura 4. Mecanismo proposto para oxidação eletroquímica de BPA, adaptado da Ref.59.	11
Figura 5. Representação das reações descritas para os biossensores a base de tirosinase para determinação de BPA. Fonte: o autor.	12
Figura 6. Representação esquemática demonstrando os principais constituintes da configuração básica de um biossensor, adaptado da Ref.66.....	13
Figura 7. Representação de alguns métodos de imobilização, adaptado da Ref.73.	15
Figura 8. Estrutura química do Nafion®, adaptada da Ref. 76.	16
Figura 9. Representação tridimensional da tirosinase de <i>Bacillus megaterium</i> (adaptado da Ref. 78). Os sítios de cobre estão assinalados pelas setas.	17
Figura 10. Estados de oxidação do sítio ativo da tirosinase e as reações de oxidações de fenóis e catecóis, adaptado da Ref. 79.....	18
Figura 11. Formação de estruturas dendríticas pelos métodos convergente e divergente, esquema adaptada da Ref. 104.	21
Figura 12. Estrutura do grafite na qual são ilustradas a posição dos átomos, as ligações químicas e a disposição das folhas de grafite, adaptado da Ref. 111.....	23
Figura 13. Tonalidade dos diferentes tipos de lápis, imagem adaptada da Ref. 117. ...	24
Figura 14. Histograma do número de publicações indexadas no SCOPUS sobre “Pencil Graphite Electrode” desde 1995, acessado no dia 20/06/2018 as 16:58.	26
Figura 15. A) Sinal de excitação de potencial versus tempo empregados na voltametria cíclica. B) Voltamograma obtido para um sistema reversível.....	31
Figura 16. Degrau de potencial aplicado no eletrodo de trabalho, adaptado da Ref.136.	33
Figura 17. Fenômeno da difração de raios X em um cristal, adaptado da Ref. 137.....	34
Figura 18. Diagrama esquemático do difratômetro de raios X, adaptado da Ref. 138.	35
Figura 19. Representação esquemática das interações do feixe de elétrons com a amostra no microscópio eletrônico, adaptado da Ref. 140.....	36

Figura 20. Esquema genérico de um microscópio eletrônico de varredura, adaptado da Ref. 138.	38
Figura 21. A) Representação do trajeto do feixe para a formação da imagem do objeto. B) Representação do trajeto para formar a imagem de difração, adaptada da Ref. 140. 40	
Figura 22. Imagem do potenciostato e do eletrodo impresso de carbono utilizados... 41.	
Figura 23. A) Foto da montagem da célula eletrolítica utilizada nos experimentos. B) Imagem do processo de preparação do biossensor Nafion/Tir/Au/EIC.	42
Figura 24. Imagem da célula eletroquímica durante a eletrodeposição de estruturas de ouro utilizando grafite do lápis como eletrodo de trabalho.	44
Figura 25. Cronoamperograma obtido durante a eletrodeposição em solução de HAuCl_4 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $E = -0,6 \text{ V}$, $t = 600 \text{ s}$. No detalhe: sloop de nucleação.	47
Figura 26. Imagens de MEV das estruturas de ouro eletrodepositadas em diferentes tempos: 150 s (A), 400 s (B) e 600 s (C) ilustrando a evolução da morfologia.	49
Figura 27. Imagem de MEV da estrutura de ouro a maior magnificação	50
Figura 28. Ângulos nos eixos cristalográficos das direções $\langle 111 \rangle$ no plano (112), figura adaptada da Ref. 108.	50
Figura 29. Difração de raio X do Au/EIC (linha preta) e EIC (linha vermelha). * picos não identificados.	51
Figura 30. Esquema mostrando o crescimento das estruturas dendríticas de ouro sobre o eletrodo, adaptada da Ref. 108.	52
Figura 31. A) Micrografia de MET e (B) padrão de difração de elétrons das nanoestruturas de ouro obtidas por eletrodeposição por cronoamperometria.	52
Figura 32. Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição de ouro sobre EIC em solução de HAuCl_4 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a uma velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Em detalhe o primeiro ciclo.	53
Figura 33. Imagens de MEV das superfícies dos eletrodos EIC após a eletrodeposição por voltametria cíclica a 50 (A), 100 (B) e $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (C).	54
Figura 34. Voltamogramas cíclicos, registrados $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ na presença de $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl, antes (linha preta) e após (linha vermelha) a eletrodeposição de Au. Foto dos eletrodos.	56
Figura 35. Voltamogramas cíclicos de Au/EIC em solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Em detalhe a integração do pico de redução.	57

Figura 36. A) VCs registrados na presença de 1 mmol·L ⁻¹ de K ₃ Fe(CN) ₆ sobre EIC a diferentes velocidades de varredura (30 a 500 mV·s ⁻¹). B) Gráficos de ip versus v ^{1/2} ..	58
Figura 37. VCs na presença de diferentes concentrações de BPA (10, 20, 30, 40 e 50 μmol·L ⁻¹) sobre o eletrodo Nafion/Tir/Au/EIC, em solução TP pH 7,0 a 20 mV·s ⁻¹ ...	59
Figura 38. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de 30 μmol·L ⁻¹ de BPA sobre os eletrodos EIC, Au/EIC e Nafion/Au/EIC e Nafion/Tir/Au/EIC. Em linhas pontilhadas os respectivos brancos.....	60
Figura 39. A) Voltamogramas cíclicos registrados após diferentes tempos de pré-concentração na presença de 10,0 μmol·L ⁻¹ sobre o eletrodo Nafion/Tir/Au/EIC. B) Gráfico da corrente em função do tempo.	62
Figura 40. Voltamogramas cíclicos registrados a diferentes velocidades de varredura de 50 a 500 mV·s ⁻¹ na presença de 50,0 μmol·L ⁻¹ sobre o eletrodo Nafion/Tir/Au/EIC...	63
Figura 41. A) Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura. B)Gráfico de log ip versus log v.....	63
Figura 42. VCs registrados sobre o eletrodo Nafion/Tir/Au/EIC em solução TP 0,1 mol·L ⁻¹ com uma concentração 50 μmol·L ⁻¹ de BPA a diferentes valores de pH, de 6,5 a 7,5. Velocidade de varredura de 20 mV·s ⁻¹	64
Figura 43. A) Dependência do potencial de pico com o pH da solução. B) Variação da corrente de pico com o valor do pH.	65
Figura 44. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 minutos de acumulação na presença de diferentes concentrações de BPA e a correspondente curva analítica (B)..	66
Figura 45. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 10 minutos de acumulação na presença de diferentes concentrações de BPA e a correspondente curva analítica (B)..	66
Figura 46. Dez voltamogramas cíclicos individuais registrados em solução TP (pH 7,0) na presença de 50 μmol·L ⁻¹ de BPA. Velocidade de varredura de 20 mV·s ⁻¹	69
Figura 47. Avaliação da variação da intensidade do sinal de oxidação de BPA na presença de possíveis interferentes.....	70
Figura 48. Diferentes apontadores utilizados para apontar os lápis grafite usados nos experimentos.....	72
Figura 49. Imagens de MEV obtidas a diferentes magnificações das pontas dos lápis após a eletrodeposição, durante 100 s (A), 300 s (B), e 500 s (C).	73
Figura 50. Eletrodo plano de lápis grafite após a eletrodeposição do ouro.....	74

Figura 51. Imagens de MEV mostrando as estruturas de ouro eletrodepositadas sobre diferentes tipos de lápis.	75
Figura 52. Imagens de MEV das superfícies planas dos lápis grafite HB após a eletrodeposição, durante 100 segundos (A), 300 segundos (B) e 500 segundos (C).	76
Figura 53. Voltamogramas cíclicos referentes a oxidação/redução do ouro eletrodepositado sobre lápis HB, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	77
Figura 54. VCs obtidos em solução NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na presença de BPA sobre lápis grafite HB (A) e lápis grafite HB com ouro eletrodepositado (B), a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Propriedades do Bisfenol A.	7
Tabela 2. Composição dos lápis grafite da marca Staedtler.	25
Tabela 3. Comparação da faixa linear e limite de detecção de biossensores a base de tirosinase reportados na literatura com o Nafion/Tir/Au/EIC.	68
Tabela 4. Resultados do teste de recuperação.	71

Lista de Equações

Equação 1. Equação de Randles-Sevcik.....	31
Equação 2. Equação do pico anódica e catódica (i_{pa}/i_{pc}).....	32
Equação 3. Equação do potencial de pico.....	32
Equação 4. Equação da Lei de Bragg.....	34
Equação 5. Reação de oxidação/redução hexacianoferrato (III) de potássio	55
Equação 6. Equação de Nernst.....	64

Símbolos e abreviaturas

BPA:	Bisfenol A
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
AuNPs:	Nanopartículas de ouro
EIC:	Eletrodo impresso de carbono
VC:	Voltametria cíclica
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão
SAED:	Difração de elétrons de área selecionada
CVD:	Deposição de vapor químico
PGEs:	Eletrodos de Lápis Grafite
CA:	Cronoamperometria
Tir:	Tirosinase
kat:	katal (mede a atividade enzimática), $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \approx 16,67 \text{ nkat}$
SWCNTs:	Nanotubos de carbono de paredes simples
MWCNTs:	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Resumo

Bisfenol A (BPA) é uma substância orgânica usado na produção de policarbonatos e resinas epóxi. A exposição humana ao BPA através de alimentos e água potável pode resultar em doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios neurológicos, câncer de mama e próstata. Este trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor baseado na enzima tirosinase para detecção de BPA. Biossensores representam boas alternativas às técnicas convencionais; eles aproveitam a especificidade e a sensibilidade dos sistemas biológicos em dispositivos pequenos e de baixo custo. Na preparação do biossensor, optamos pelo uso de eletrodos impressos de carbono, que constituem células eletroquímicas descartáveis. O substrato à base de carbono consiste em uma mistura de grafite, solventes e ligantes poliméricos. Esta superfície, rica em grupos funcionais de oxigênio, funcionou perfeitamente para realizar a eletrodeposição de ouro a partir de uma solução de íons cloroáuricos utilizando as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria independentemente. Diferentes morfologias foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Os eletrodos modificados foram utilizados como suporte para a imobilização da enzima tirosinase, permitindo a preparação de um biossensor altamente seletivo e sensível para a detecção do BPA. Além disso, o biossensor proposto mostrou estabilidade a longo prazo e foi aplicado para um teste de recuperação de BPA em água mineral e de torneira. Os eletrodos de grafite também provaram ser um material adequado como plataforma para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Estruturas de ouro hiper-ramificadas resultaram da eletrodeposição realizada sob condições experimentais semelhantes aos eletrodos impressos de carbono. Além disso, estudos preliminares revelaram a potencial aplicabilidade do eletrodo modificado para a eletrooxidação de BPA em meio alcalino.

Palavras-chave: Bisfenol A, tirosinase, biossensor, microestruturas de ouro, eletrodo impresso de carbono, eletrodo de lápis grafite.

Abstract

Bisphenol A (BPA) is an organic substance used in the production of polycarbonates and epoxy resins. Human exposure to BPA through food and drinking water can result in cardiovascular disease, diabetes, neurological disorders, breast, and prostate cancer. This work aims the development of a biosensor based on the enzyme tyrosinase for BPA detection. Biosensors represent good alternatives to conventional techniques; they take advantage of the specificity and sensitivity of biological systems in small and low-cost devices. In the preparation of the biosensor, we opted for the use of carbon printed electrodes, which constitute disposable electrochemical cells. The carbon-based substrate consists of a mixture of graphite, solvents and polymeric binders. This surface, rich in functional groups of oxygen, worked perfectly to perform the electrodeposition of gold from a solution of chloroauric ions using the techniques of cyclic voltammetry and chronoamperometry independently. Different morphologies were observed by scanning electron microscopy. The modified electrodes were used as support for the immobilization of the enzyme tyrosinase, allowing the preparation of a highly selective and sensitive biosensor for the detection of BPA. Additionally, the proposed biosensor showed long-term stability and was applied for a recovery test of BPA in mineral and tap-water. Graphite pencil electrodes also proved to be a suitable material as a platform for the development of electrochemical sensors. Hyperbranched gold structures resulted from electrodeposition performed under similar experimental conditions to the carbon printed electrodes. Furthermore, preliminary studies revealed the potential applicability of the modified electrode for the electrooxidation of BPA in an alkaline medium.

Keywords: Bisphenol A, tyrosinase, biosensor, gold microstructures, carbon-printed electrode, graphite pencil electrode.

1. Introdução



Imagem MEV das estruturas em forma de folhas de ouro eletrodepositadas sobre EIC.

1.1. Natureza e importância do tema

O Bisfenol A, mais conhecido pela sigla BPA, é uma substância orgânica, sintetizada pela primeira vez em 1891, que começou a ganhar relevância a partir da década de 1950, como matéria prima na produção de policarbonato e resinas epóxi¹. Desde então o seu consumo global tem aumentado expressivamente, com uma projeção de 10,6 milhões de toneladas para 2022². O policarbonato possui uma ampla gama de aplicações sendo utilizado na fabricação de diversos produtos tais como garrafas, embalagens, e diversos recipientes para armazenamento de alimentos, entanto que as resinas epóxi podem ser encontradas como revestimentos de proteção em produtos alimentícios enlatados^{3,4}. A migração do BPA para os alimentos a partir desses recipientes, especialmente por efeito da temperatura, representa provavelmente a mais importante via de exposição humana. Vários estudos apontam que o consumo e/ou a exposição contínua a esta substância pode ter consequências significativas para a saúde humana, sendo considerado um agente disruptor endócrino, neurotóxico e carcinogênico^{5,6}. Como a maioria desses estudos foram realizados em animais e não em humanos ainda há muita controvérsia dos efeitos deletérios do BPA em baixas concentrações. Perante estas incertezas há necessidade de manter o controle e monitoramento do BPA principalmente em água e alimentos, o que tem incentivado a pesquisa voltada para o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis. Na determinação do BPA, além das técnicas convencionais de cromatografia, espectroscopia e eletroquímica, os biossensores vem ganhando destaque nos últimos tempos. Estes dispositivos analíticos representam alternativas sensíveis, seletivas, de fácil manipulação, rápidos, portáteis para análise de rotina dos constituintes e contaminantes dos alimentos.

Nesse contexto, esta tese visa desenvolver biossensores para determinação de BPA. A motivação por esta área de pesquisa advém da preocupação do autor com a exposição das crianças, que representam o segmento da população mais vulnerável aos efeitos tóxicos do BPA, por possuírem menor massa corporal e por questão de segurança.

Em Moçambique, país de origem do autor, a maioria dos problemas de saúde e nutrição durante a infância está relacionada com consumo alimentar inadequado e infecções crônicas, sendo que essas duas condições estão intimamente relacionadas com o padrão de vida, que inclui problemas de acesso à alimentação, moradia e assistência à

saúde. Outro fator importante é a deficiência no controle sanitário e falta de fiscalização dos alimentos comercializados e consumidos na via pública em geral e em particular nas redondezas das escolas, onde as crianças em idade escolar ficam expostas como mostra as fotografias da Figura 1.



Figura 1. Fotografias de posto de venda de alimentos instalado ao lado de uma Escola em Maputo-Moçambique. Fonte: o autor.

1.2. Apresentação e organização da tese

A presente tese está organizada em seis seções, sendo que a primeira consiste nesta breve introdução. A segunda seção é composta pela revisão bibliográfica, na qual são apresentados de forma sucinta os principais temas abordados: o analito de interesse (BPA), biossensores, a enzima tirosinase, nanoestruturas de ouro e lápis grafite. Na terceira seção estão descritos os materiais, reagentes e a metodologia utilizada na modificação do eletrodo e preparação do biossensor, além de uma breve abordagem sobre as técnicas empregadas (voltametria cíclica, cronoamperometria, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X e microscopia eletrônica de transmissão). Na quarta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Por fim, a conclusão e a lista das referências bibliográficas utilizadas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo geral

O trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor enzimático para determinação de BPA em meio aquoso.

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver um biossensor eletroquímico a base de tirosinase para determinação de BPA;
- ✓ Realizar eletrodeposição de nano/microestruturas de ouro sobre o eletrodo de trabalho com a finalidade de favorecer a imobilização da enzima tirosinase;
- ✓ Avaliar a resposta do biossensor em função do pH;
- ✓ Investigar os possíveis interferentes na determinação do BPA;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do biossensor na determinação do BPA em amostras de água;
- ✓ Verificar a exequibilidade de utilizar lápis grafite modificado com as microestruturas dendríticas de ouro como eletrodo para determinação de BPA.

2. Revisão bibliográfica

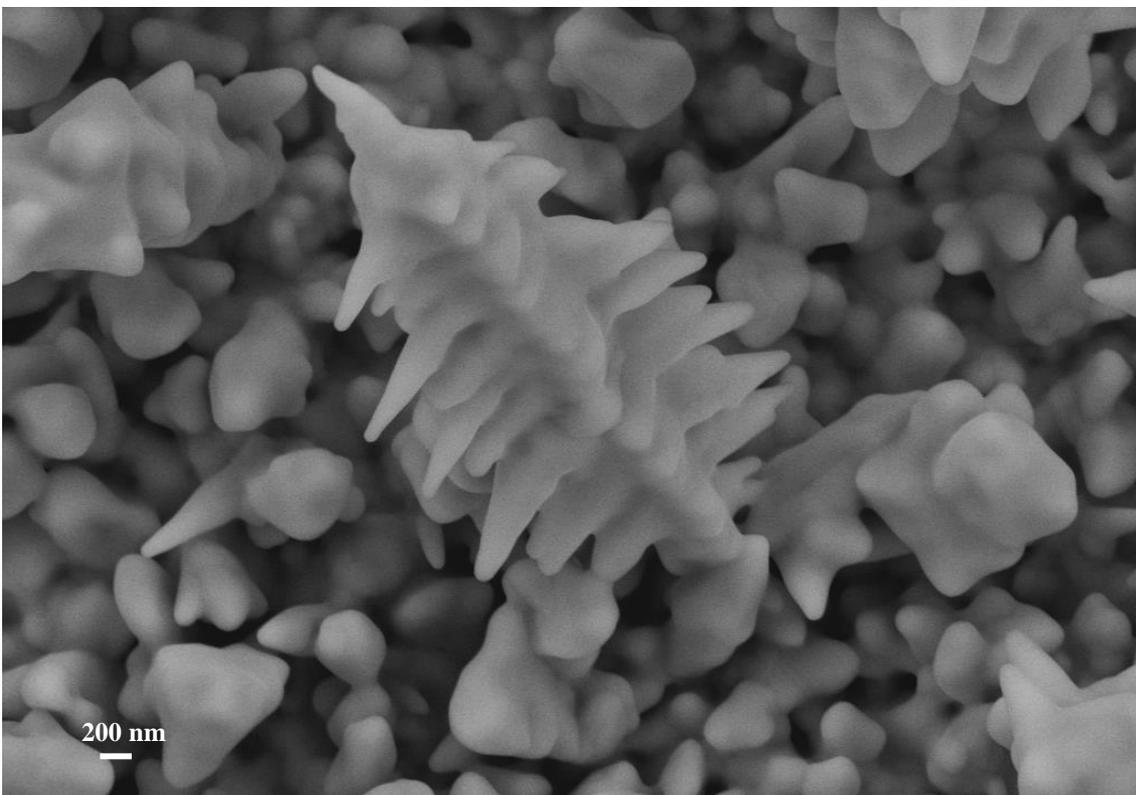


Imagem MEV das estruturas de ouro em face inicial de crescimento sobre EIC.

2.1. Bisfenol A

O 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, mais conhecidos como Bisfenol A (BPA), é uma substância orgânica constituída por dois anéis fenólicos ligados por uma ponte de metil, com dois grupos funcionais metil ligados à mesma⁷, tal como representado na Figura 2.

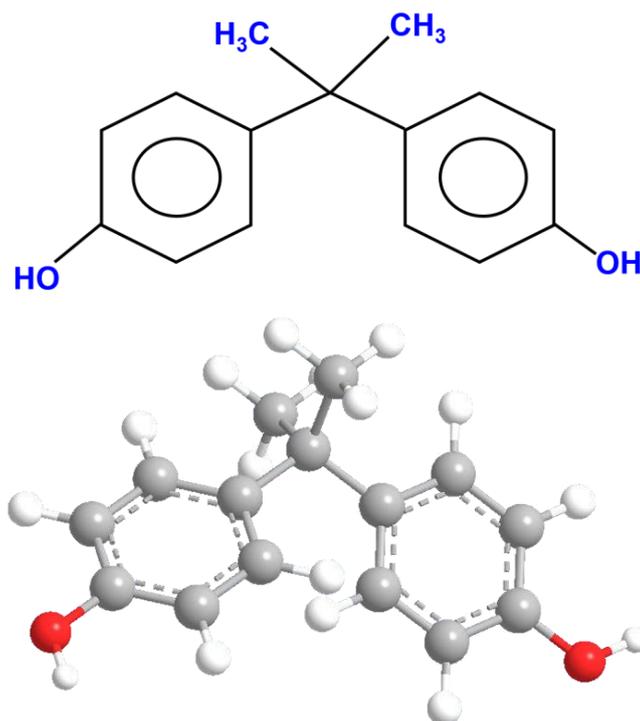


Figura 2. Representação da estrutura química do BPA. Adaptado da Ref. 7.

Em condições ambientais, o BPA é um sólido branco e cristalino, comercializado na forma de grânulos ou flocos, de baixas volatilidade e pressão de vapor⁸. É pouco solúvel em água (300 mg·L⁻¹), solúvel em solução aquosa alcalina, álcool, acetona e ligeiramente solúvel em tetracloreto de carbono⁹. Na Tabela 1 estão descritas algumas propriedades físico-químicas do BPA.

Tabela 1. Propriedades do Bisfenol A.

Parâmetros	Valores
Peso Molecular	228,29 g·mol ⁻¹
Fórmula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Temperatura de ebulição	220 ° C (a 5 h·Pa)
Temperatura de fusão	156° C
pKa	10,3
Solubilidade em água*	300 mg·L ⁻¹
Pressão de vapor*	4,0×10 ⁻⁸ mmHg

* valores medidos a 25° C

O BPA é obtido através da condensação de fenol e acetona em meio ácido ou básico¹⁰. A maior parte da produção de BPA é destinada para a obtenção de resinas epóxi e plásticos de policarbonato, retardadores de chama e outros produtos especiais¹¹⁻¹³.

As resinas epóxi são utilizadas como revestimentos de proteção em embalagens de latas, tampas de metal, peças de automóveis, adesivos, aplicações aeroespaciais e como revestimento para tubos de PVC¹⁴⁻¹⁶. Os plásticos de policarbonato são utilizados na fabricação de discos compactos, lentes automotivas, eletrodomésticos, embalagens de alimentos e garrafas de plástico, devido a sua alta resistência ao impacto, dureza, transparência, resistência a temperaturas (entre cerca de -40 °C e cerca de 145 °C) e resistência a muitos ácidos e óleos^{17,18}. O selantes dentários à base de resina e agentes de ligação também contém derivados de BPA na sua composição¹⁹.

A exposição humana ao BPA pode acontecer por via ocupacional, ambiental e alimentar²⁰. A exposição por via ocupacional, pode ocorrer em trabalhadores durante o

processo de produção, transporte e processamento, enquanto a exposição por via ambiental resulta da contaminação atmosférica de solos, rios e lagos, devido ao grande número de produtos à base de resinas epóxi e policarbonato que são descartados e que sofrem degradação liberando BPA^{21,22}. A exposição por via alimentar pode ocorrer por migração do BPA da embalagem para os alimentos, tornando a dieta a principal fonte de exposição, através da ingestão de alimentos enlatados e engarrafados em recipientes a base de policarbonato²³⁻²⁵. A polimerização incompleta, assim como a exposição ao calor, o contato com substâncias ácidas ou básicas pode resultar na migração de pequenas quantidades de BPA das embalagens para o produto^{26,27}. Este tipo de exposição é mais preocupante por atingir potencialmente um maior número de pessoas e porque, neste caso a exposição pode ocorrer durante longos períodos (possivelmente toda a vida) em pequenas doses e sem serem detectadas.

Considerado um disruptor endócrino com atividade estrogênica, o BPA é potencialmente tóxico para os organismos aquáticos. Alguns dos efeitos deletérios reportados incluem redução de hormônios masculinos, diminuição da densidade e motilidade dos espermatozoides, inibição da espermatogênese e produção de ovos, ausência ou atraso na ovulação²⁸.

Em estudos realizados em camundongos foi evidenciado que o rim e o fígado são os órgãos mais sensíveis para a ação do BPA, podendo causar perturbações graves na função hepática e renal^{29,30}. Asahi e colaboradores investigaram as alterações bioquímicas em hepatócitos para elucidar a base molecular do dano hepático induzido por BPA. Eles encontraram alongamento do retículo endoplasmático e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em hepatócitos tratados com BPA³¹. Outros estudos realizados em roedores, descrevem alterações no sistema reprodutivo masculino e feminino, fraqueza do sistema imunológico, aumentando assim o risco de câncer da glândula mamária e de próstata³². A exposição ao BPA em estágios iniciais de desenvolvimento causa toxicidade neuronal durante o desenvolvimento embrionário³³.

Considerando as crianças como o setor da população mais vulnerável aos efeitos tóxicos dessa substância³⁴, o Ministério de Saúde do Brasil, através da Resolução RDC N.º 41/2011, proibiu a importação e fabricação de mamadeiras que contenham Bisfenol A na sua composição³⁵.

Ainda existem muitas dúvidas que precisam ser esclarecidas sobre o potencial risco a saúde humana associada a exposição ao BPA³⁶. Em 2015, por precaução, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) diminuiu o limite de segurança para exposição humana. Assim, a dose de ingestão diária tolerável (TDI) baixou de 50 µg por Kg de peso corporal para 4 µg/Kg³⁷. Ajustado por categorias de idade e peso, bebês com idade entre 0–3 meses (peso ≤ 6,0 Kg), 4–6 meses (peso ≤ 7,9 Kg), 7–9 meses (peso ≤ 9,3 Kg) e 10–12 meses (peso ≤ 10,3 Kg) o TDI deve ser de 24,0; 31,6; 37,2 e 41,2 µg/dia, respectivamente. Entretanto, para um adulto de 70 Kg o consumo diário tolerável pode chegar a 280 µg.

A migração de BPA de latas de vegetais, de fórmulas infantis, de bebidas, e de carnes e peixes em conserva vêm sendo amplamente investigada nos últimos anos²³. Por citar alguns exemplos, Munguía López e colaboradores reportaram concentrações de BPA que variam de 7,1 a 105,4 µg·Kg⁻¹ em latas de atum³⁸. Em outro estudo foram encontradas quantidades de BPA que oscilam entre 21,86 ± 0,80 a 1858,71 ± 8,24 µg·Kg⁻¹ em alimentos enlatados tais como ervilhas, milho, molho de tomate, atum³⁹. Em 2014, na China, a ingestão diária de bisfenóis foi estimada, em 0.646 e 0.664 µg·Kg⁻¹ por dia para homens e mulheres, respectivamente⁴⁰. Na Nigéria, o BPA foi detectado em amostras de efluentes, lixiviados do solo, amostras de alimentos, água potável e produtos de consumo (colheres, chaleiras, escovas de dente, etc.)⁴¹ variando de 96,50 ± 1,19 a 2880 ± 8,35 µg·L⁻¹. No Brasil, Sodré e colaboradores encontraram 0,16±0,03 µg·L⁻¹ de BPA em amostras de água de torneira na cidade de Campinas⁴². Concentrações ligeiramente superiores foram encontradas em duas das oito amostras de água em São Luís de Maranhão⁴³, 1,11 e 3,61 µg·L⁻¹. Como pode ser observado, para atingir o TDI em alguns casos requer a ingestão de uma considerável quantidade de alimento. O que preocupa é que apesar do grande número de estudos sobre essa temática, em alguns países da África, sudeste asiático, e América do Sul e Central há pouco ou nenhum relato ao respeito⁴⁴.

A determinação de BPA nos produtos alimentícios requer a utilização de técnicas altamente sensíveis e seletivas, devido aos níveis de traço em que é frequentemente encontrado, e pela complexidade das matrizes. Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para sua quantificação, entre eles análise por espectrofotometria ultravioleta⁴⁵, cromatografia gasosa⁴⁶, cromatografia líquida de alta

eficiência⁴⁷, eletroforese capilar⁴⁸, colorimetria⁴⁹. A maioria dessas técnicas apresentam alta sensibilidade e precisão, porém muitos deles representam custo elevado, requerem pré-tratamentos demorados e exigem pessoal qualificado para a operação.

O BPA é uma molécula eletroativa, por tanto, a sua identificação e quantificação podem ser realizadas eletroquimicamente. Estudos eletroquímicos têm sido realizados utilizando eletrodos de carbono vítreo⁵⁰, eletrodos de diamante dopado com boro (EDDB)^{51,52}, eletrodo de pasta de carbono⁵³. Nesses casos foram relatados a adsorção da molécula ou dos produtos de oxidação na superfície do eletrodo. A afinidade do BPA pelo material de eletrodo pode ser aproveitada para aumentar a sensibilidade do método, através do efeito da pré-concentração da espécie previa a sua oxidação. Por outro lado, a adsorção de produtos da reação pode levar ao bloqueio da superfície, e conseqüentemente na diminuição da resposta analítica.

Para melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade, têm sido incorporados materiais nanoestruturados nas superfícies dos eletrodos, o que tem permitido um aumento significativo da resposta do eletrodo, além de promover uma diminuição no sobrepotencial de oxidação do BPA. Alguns exemplos incluem eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbono⁵⁴, eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno⁵⁵, eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro⁵⁶, eletrodo de lápis grafite modificado com nanopartículas de ouro e polivinilpirrolidona⁵⁷, eletrodo de platina modificado com grafeno⁵⁸, entre outros.

Em meio aquoso, foi sugerido que o processo de oxidação consiste na transferência de dois elétrons e de dois prótons conduzindo a formação de uma bisdienona⁵⁴⁻⁵⁸, como mostra a Figura 3.

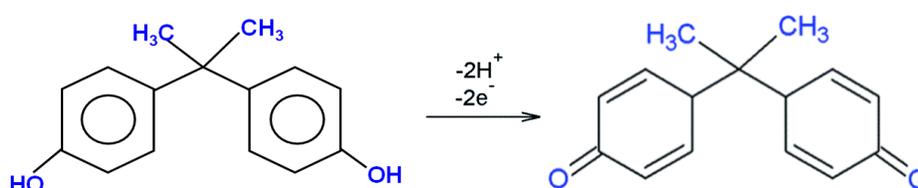


Figura 3. Representação da reação de oxidação do bisfenol A.

O mecanismo eletroquímico para a oxidação do BPA pode ser considerado semelhante à oxidação de fenóis em geral. A Figura 4 mostra que o processo inicial consiste na perda de um elétron para formar um cátion radical de fenol, seguido de uma desprotonação para formar um radical neutro, e por fim uma oxidação adicional para formar o cátion dienona (há alguma incerteza sobre se as reações ocorrem consecutivamente ou se a transferência de prótons pode ocorrer de forma concertada com a transferência de elétrons)⁵⁹.

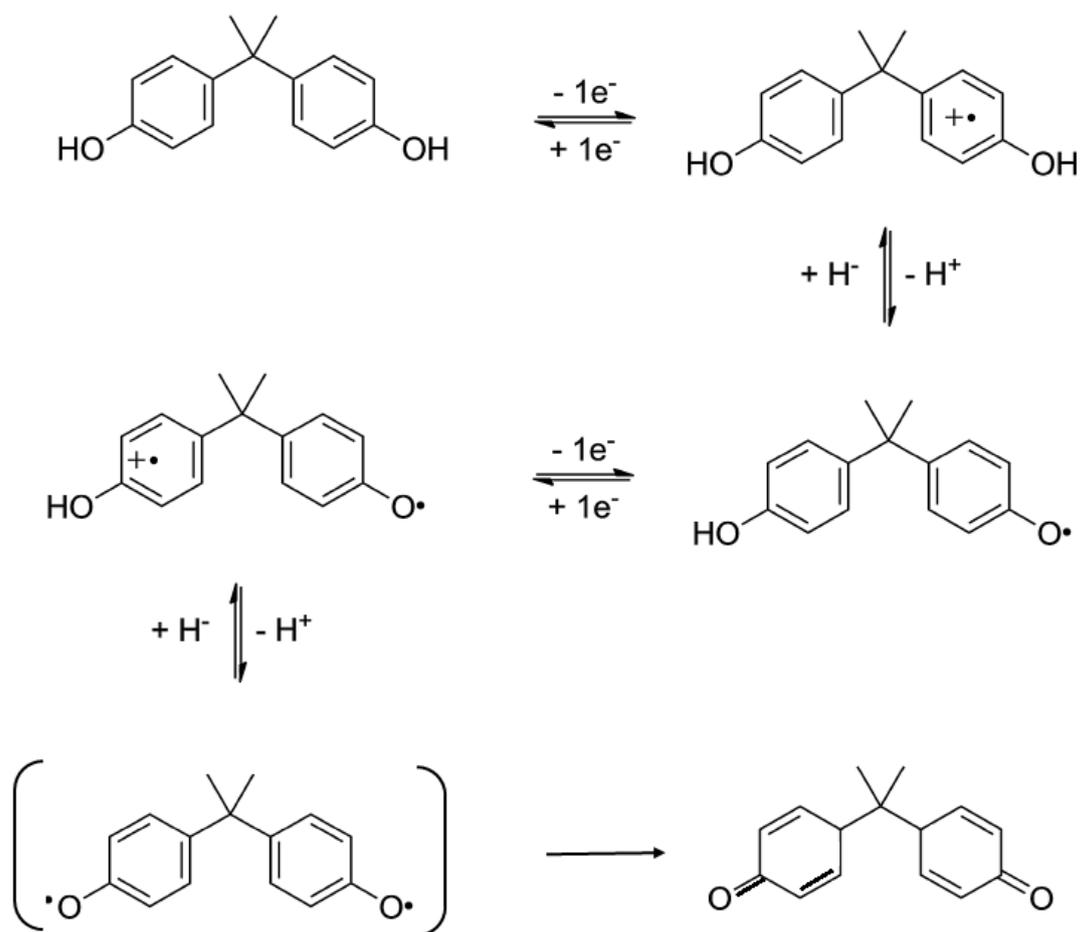


Figura 4. Mecanismo proposto para oxidação eletroquímica de BPA, adaptado da Ref.59.

Biossensores eletroquímicos a base da enzima tirosinase também tem mostrado ótimo desempenho na determinação do BPA. Neste caso, a enzima imobilizada no eletrodo é responsável pela oxidação da substância a qual é reduzido

posteriormente no eletrodo gerando o sinal analítico. A Figura 5 mostra a oxidação enzimática do BPA pela tirosinase produzindo a bisdienona, a qual é reduzida eletroquimicamente. A corrente gerada é proporcional a concentração do BPA.

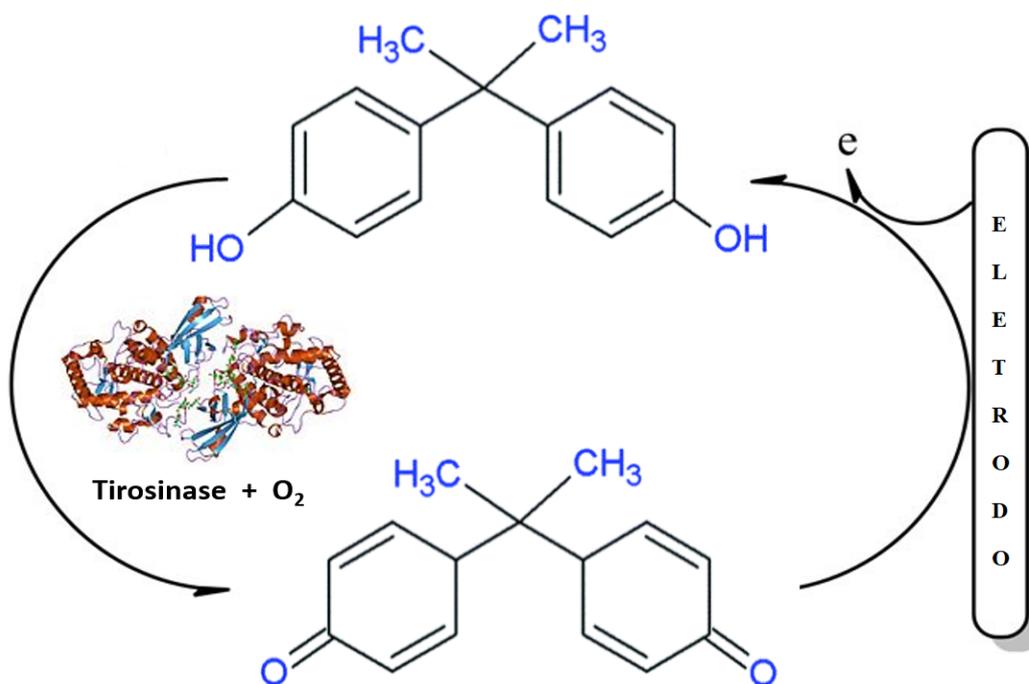


Figura 5. Representação das reações descritas para os biossensores a base de tirosinase para determinação de BPA. Fonte: o autor.

Vários exemplos podem ser encontrados na literatura, entre eles um biossensor construído através da imobilização sobre eletrodo de carbono vítreo de um nanocompósito a base de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs), polilisina e tirosinase⁶⁰. Em outro trabalho, a enzima foi aprisionada em uma matriz de sol-gel de TiO₂ modificada com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), polímero policatiônico poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), e Nafion⁶¹. Outro biossensor altamente sensível para determinação de BPA foi construído a partir da imobilização da enzima tirosinase sobre um eletrodo de diamante dopado com boro funcionalizado com sal de diazônio modificado com MWCNTs⁶². A enzima tirosinase também foi imobilizada sobre eletrodo de carbono vítreo através de nanfolhas de óxido de grafeno reduzido funcionalizado com líquido iônico⁶³. Outro exemplo é um

biossensor amperométrico fabricado pela imobilização da tirosinase sobre um eletrodo de carbono vitreo modificado com um composito constituído de MWCNTs, ftalocianina de cobalto (CoPc) e fibroína de seda⁶⁴.

2.2. Biossensor

2.2.1. Definição, constituição e classificação

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que incorpora um material biológico, que podem ser enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecidos animal e vegetal, células e organelas, conectado a um transdutor o qual converte um sinal biológico em sinal analítico mensurável⁶⁵. Na Figura 6 é apresentado um esquema mostrando os principais componentes de um biossensor.

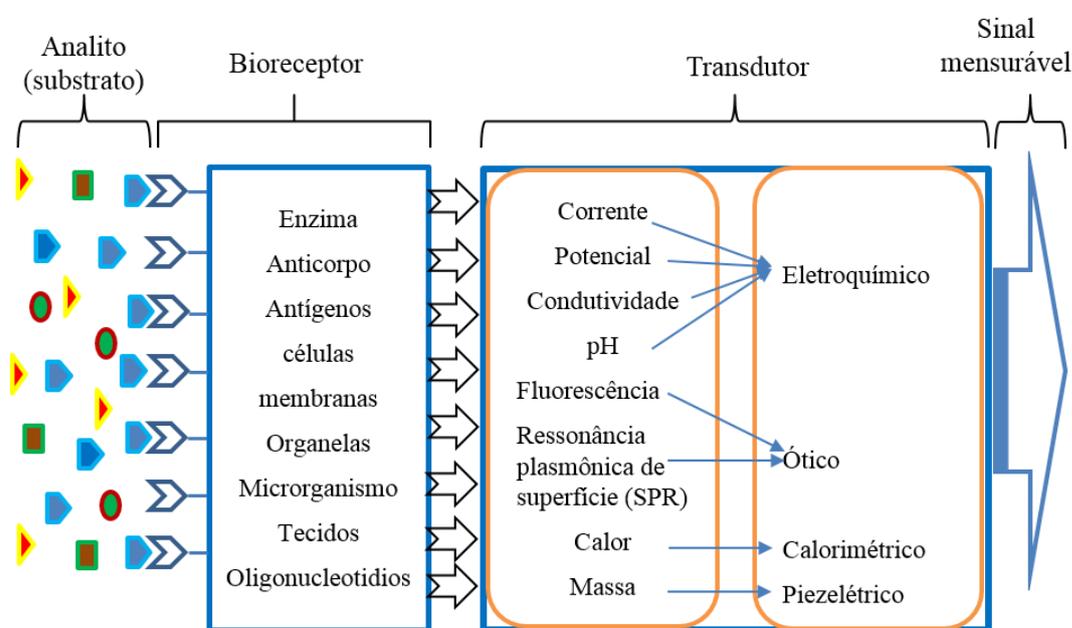


Figura 6. Representação esquemática demonstrando os principais constituintes da configuração básica de um biossensor, adaptado da Ref. 66.

O princípio de funcionamento de um biossensor está baseado no reconhecimento do analito pelo componente biológico ativo, e a subsequente transdução do sinal e leitura. Para isso, o material biológico é imobilizado em um suporte ou membrana adequada, que é acoplado à superfície do transdutor, o qual irá monitorar a resposta devido à presença ou ausência da substância de interesse ou substrato⁶⁷.

Os biossensores podem ser classificados em função do mecanismo de interação do material biológico com o analito, em biocatalíticos ou de bioafinidade⁶⁸. Os

primeiros estão constituídos principalmente de enzimas ou células, onde há um ciclo catalítico de regeneração do centro redox da enzima, diretamente ou através de um mediador redox imobilizado. Por outro lado, os biossensores de afinidade são baseados na interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o elemento em análise, como a reação de antígeno-anticorpo por exemplo.

Os biossensores, também, podem ser classificados quanto ao tipo de transdutor utilizado, em: eletroquímicos, óticos, calorimétricos, piezoelétricos, magnéticos⁶⁹. Entre os detectores eletroquímicos mais utilizados encontram-se os potenciométricos (no qual mede-se a diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência), e os amperométricos (através do qual é medida a corrente gerada pela oxidação e/ou redução da espécie eletroativa através da aplicação de um valor fixo de potencial), e voltamétricos (no qual a corrente é gerada através da varredura de potencial no eletrodo de trabalho)⁶⁹. Em todos os casos, há uma dependência do sinal gerado com a concentração do analito.

As propriedades da amostra e o tipo de sinal mensurável irão determinar a escolha do material biológico e do transdutor. Muitos biossensores utilizados em análise de alimentos são baseados em sistemas enzimáticos combinados a transdutores eletroquímicos^{70,71}, que constitui especial interesse para este trabalho.

Como já foi salientada, a seleção do material do eletrodo é muito importante na construção de um biossensor eletroquímico, uma vez que o tipo de eletrodo geralmente determina a escolha do método de imobilização e o custo do biossensor.

2.2.2. Métodos de imobilização

No caso das enzimas, os métodos de imobilização podem ser divididos nas seguintes categorias: **oclusão em gel**, método que envolve o confinamento (**aprisionamento**) da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel; **microencapsulação**, envolve o confinamento da enzima em pequenas esferas (microcápsulas) de membranas semipermeáveis, com poros variando de 5 a 300 µm, que permitem somente a livre movimentação de substratos e produtos da reação enzimática; **adsorção física e/ou química**, ocorre geralmente em interação do tipo iônico, polar, ligações de hidrogênio, ou hidrofóbicas de enzimas em suportes que possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes;

ligação covalente, neste tipo, a imobilização ocorre através da ligação covalente dos grupamentos aminos e carboxílicos da enzima a grupos reativos na superfície do suporte e **ligação covalente cruzada (cross-linking)**, através da utilização de reagentes bifuncionais tais como glutaraldeído, ácido bisdiazobenzidina, tricloro-o-triazina, entre outros⁷². Na Figura 7 são representados alguns dos métodos de imobilização citados.

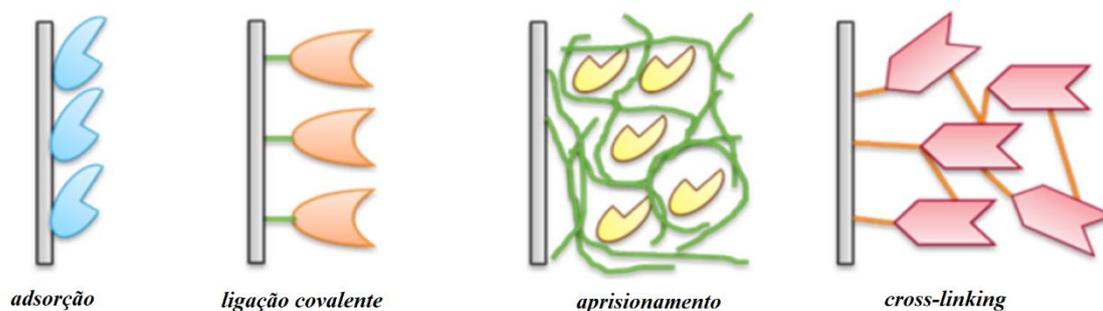


Figura 7. Representação de alguns métodos de imobilização, adaptado da Ref.73.

O Nafion® é um polímero, trocador de cátions sulfonado perfluorado, que tem sido amplamente utilizado na construção de sensores e biossensores devido a sua estabilidade química e térmica, resistência mecânica e propriedades anti-incrustantes⁷⁴. A estrutura do polímero é apresentada na Figura 8, a mesma está constituída basicamente de três regiões: a cadeia principal hidrofóbica de tetrafluoroetileno (TFE), grupos sulfônicos ácidos terminais hidrofílicos, e uma região interfacial constituída de radicais laterais de éter vinila perfluorados. Essa característica estrutural, juntamente com a sua estabilidade e insolubilidade em meio aquoso, faz do Nafion® um polímero bastante utilizado para imobilização de enzimas na construção de biossensores⁷⁵.

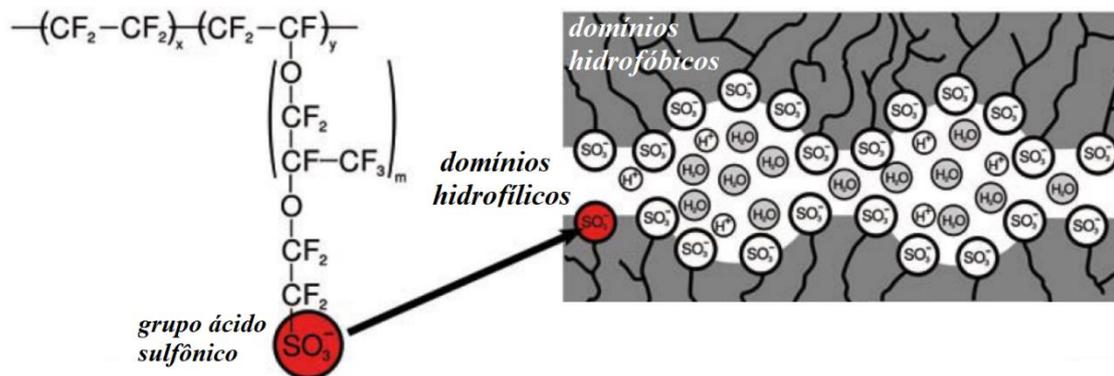


Figura 8. Estrutura química do Nafion®, adaptada da Ref. 76.

2.2.3. Fatores de desempenho dos biossensores

Entre as principais características almejadas num biossensor encontram-se: possuir **excelente estabilidade**, a qual está diretamente relacionada com o tipo de imobilização da camada do material biológico; apresentar **bom tempo de respostas**, que pode ser controlado por vários fatores químicos (concentração do biocatalisador, concentração do substrato, pH da solução, disponibilidade de cofatores, ativadores enzimáticos e inibidores enzimáticos), fatores físicos (temperatura, espessura da camada do biocatalisador, velocidade de agitação, espessura e permeabilidade da membrana externa) e fator instrumental (tempo de resposta do transdutor). Basicamente, o substrato deve difundir do seio da solução até a superfície do biossensor, atravessar a membrana externa se houver, e reagir com o sítio ativo do material biológico, e ainda, os produtos formados devem difundir-se até a base do sensor para serem detectados. Outras características importantes no biossensor são: **baixo limite de detecção** e **boa seletividade**. Assim, diversos parâmetros do biossensor devem ser investigados, como por exemplo: pH de operação, composição do tampão, concentração do material biológico imobilizado, espessura e tipo de imobilização da camada biológica, temperatura, efeito de ativadores, inibidores e interferentes.

2.3. Enzima tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1) (Tyr) é uma enzima oxidase, também designada por fenol oxidase, catecolases, fenolase, catecol oxidase ou ainda polifenol oxidase que

pode ser encontrada abundantemente na natureza, em plantas, fungos e animais⁷⁷. Ela contém o cobre como grupo prostético que é essencial para a atividade biológica dessas proteínas. A enzima possui dois sítios ativos, os quais consistem cada um de dois átomos de cobre coordenados com histidinas, conforme a estrutura mostrada na Figura 9.

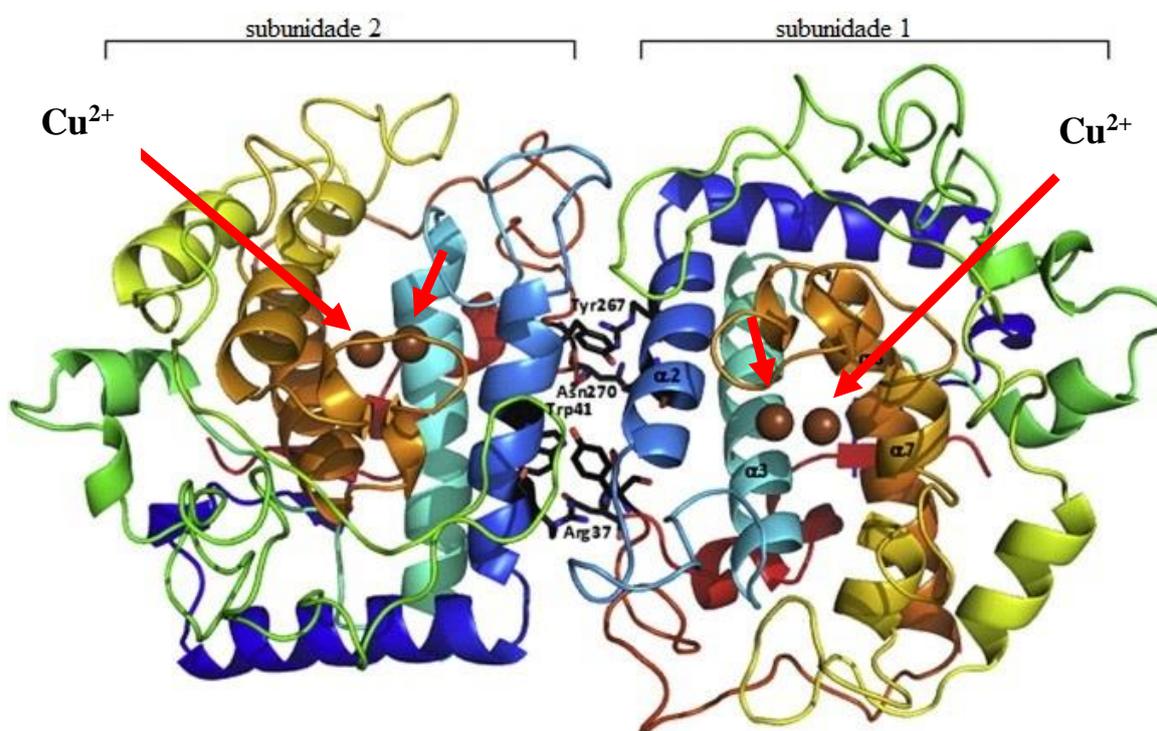


Figura 9. Representação tridimensional da tirosinase de *Bacillus megaterium* (adaptado da Ref. 78). Os sítios de cobre estão assinalados pelas setas.

De acordo com Ramsden e Riley, durante o ciclo catalítico podem ser identificados quatro estados de oxidação do sítio ativo: **meta**, **desoxi**, **oxi** e **inativa**⁷⁹. Como mostra a Figura 10, na forma meta, um íon hidroxila está ligado por dois Cu (II), nesta forma a enzima catalisa a reação de oxidação do *o*-difenoil a *o*-quinona, através da atividade difenolase. Essa reação leva à redução de Cu (II) a Cu (I) formando a desoxi-tirosinase, a qual reage rapidamente com o oxigênio (O_2) produzindo a oxi-tirosinase, na qual os dois átomos de oxigênio se ligam aos íons cobre. A oxi-tirosinase, por sua vez, pode oxidar fenóis por um mecanismo de monofenolase e oxidar catecóis por um mecanismo de difenolase. Assim, na presença de O_2 , tanto fenóis como catecóis são oxidados pela oxi-tirosinase em orto-quinonas através de ciclos oxidativos separados.

Ocasionalmente, uma molécula de catecol pode ser oxidado por um mecanismo de monofenolase levando à formação irreversível da forma inativa, na qual um dos átomos de cobre é reduzido a Cu (0), e acaba difundindo para fora do centro ativo, provocando a inativação da enzima. As reações são apresentadas na Figura 10.

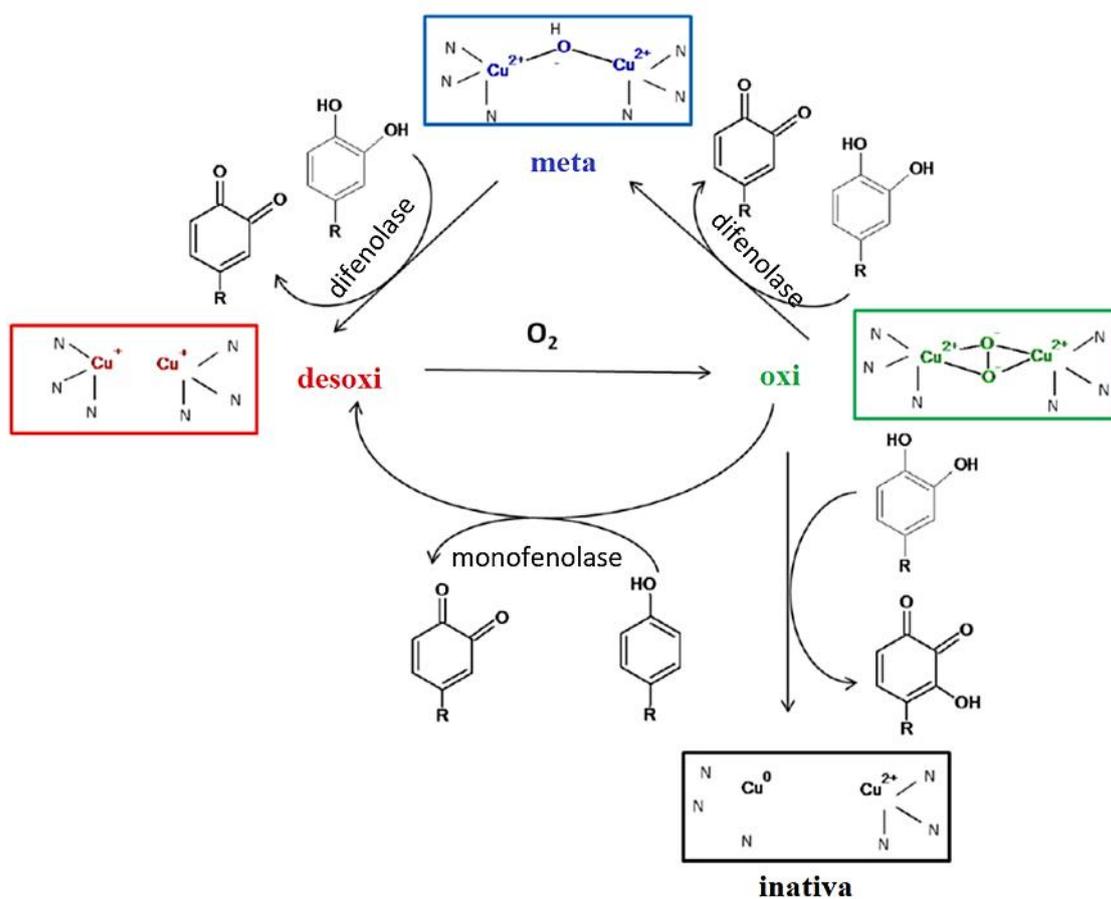


Figura 10. Estados de oxidação do sítio ativo da tirosinase e as reações de oxidações de fenóis e catecóis, adaptado da Ref. 79.

Diferentes tirosinases obtidas a partir de várias fontes biológicas possuem características estruturais e funcionais semelhantes. São de importância central em processos como a pigmentação de vertebrados e o escurecimento de frutas e vegetais e encontram-se amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais⁷⁷. Concentrada nos melanócitos, a tirosinase é responsável pela síntese da melanina a partir da oxidação da tirosina; a melanina por sua vez, é responsável pela pigmentação da pele, cabelos e olhos nos mamíferos⁸⁰. A tirosinase obtida a partir de cogumelos, é a

utilizada na maioria dos estudos com biossensores, por serem de fácil obtenção em quantidade relativamente grandes e de baixo-custo⁸¹.

2.4. Nanoestruturas de ouro

2.4.1. Propriedades e métodos de síntese

As nanoestruturas de ouro são fascinantes por suas propriedades ópticas, eletrônicas e químicas e encontram aplicações no desenvolvimento de sensores e biossensores tanto ópticos como eletroquímicos⁸²⁻⁸⁴. Eletrodos modificados com diferentes tipos de nano ou microestruturas de ouro têm se mostrado eficazes como plataforma para imobilização de diversos biocomponentes especialmente enzimas⁸⁵.

Muitas configurações de biossensores utilizam dispersões coloidais de ouro na modificação da superfície dos eletrodos devido a sua alta biocompatibilidade, que é necessária para reter a estrutura nativa e a atividade enzimática de proteínas ou enzimas⁸². A inclusão de nanopartículas de ouro (AuNPs) na interface proteína/eletrodo cria um microambiente favorável para a imobilização de proteínas, mantendo a atividade catalítica e eletroquímica⁸⁶. Além de elevada área superficial e boa estabilidade química, as superfícies modificadas podem favorecer uma orientação preferencial da proteína minimizando a distância entre o centro eletricamente ativo das enzimas e a superfície dos eletrodos⁸⁷.

Tendo em consideração que as propriedades óticas, elétricas, e catalíticas dependem em grande parte do tamanho e da forma das nanoestruturas⁸⁸, é relevante estabelecer condições de síntese que permitam regular a morfologia e o tamanho das mesmas.

A síntese de nanopartículas de ouro em solução aquosa, bem como em solventes orgânicos está bem estabelecida^{89, 90}, visto que as soluções de ouro coloidal vêm sendo utilizadas desde os primórdios para fins decorativos devido a suas propriedades óticas⁹¹.

Os primeiros relatos de síntese datam de 1857, em que a redução da solução de tetracloroáurico pelo fósforo foi realizada em dissulfeto de carbono⁹². Em 1951, Turkevich propôs o método do citrato⁹³, que foi melhorado por Frens em 1973⁹⁴, e depois por Giersing e Mulvaney em 1993⁹⁵. Outros métodos também foram reportados

nas últimas décadas tais como o método bifásico (Brust-Schiffrin) e o crescimento por sementes, o qual levou a aplicações bastante promissoras⁹⁶.

Na formação das nanopartículas de ouro a partir da redução química de íons Au^{3+} é indispensável a presença de um agente estabilizador, que pode ser o próprio redutor, surfactantes, tióis, polímeros, que permitem estabilizar e funcionalizar as nanopartículas formadas^{97,98}. Geralmente, espécies carregadas adsorvidas na superfície das nanopartículas evitam a sua aglomeração através de um simples efeito de repulsão de cargas.

No que diz respeito a modificação de eletrodos, a eletrodeposição representa uma alternativa fácil e rápida para formação e deposição de diferentes tipos de nanoestruturas diretamente na superfície do eletrodo⁹⁹. Variáveis experimentais tais como tempo, corrente, potencial, são facilmente controláveis e reguláveis.

2.4.2. Nanoestruturas dendríticas

A palavra “Dendrimer” surge da combinação duas palavras gregas “Dendron” que significa árvore ou ramos e “meros” que significa parte¹⁰⁰. Os dendrimeros também pode ser chamado de “arboris” por apresentarem estruturas hiper-ramificadas semelhantes as “árvores” ou ainda de “moléculas em cascata”¹⁰¹.

Os dendrímeros são macromoléculas sintéticas com estruturas bem definidas, monodispersas e homogêneas, que frequentemente adotam morfologias tridimensionais globulares constituídos de braços ou ramos semelhantes a árvores¹⁰². Estas estruturas podem apresentar três partes principais: um núcleo iniciador, camadas interiores compostas por unidades repetidas e radialmente conectadas ao núcleo, e a camada externa, onde geralmente são geradas funcionalidades que possibilitem a adição de compostos para aplicação específica¹⁰⁰.

Na obtenção das estruturas dendríticas são empregados dois métodos principais, denominados de divergente e convergente¹⁰³. No método divergente, a síntese começa a partir de um núcleo multifuncional (átomo ou grupo de átomos) ao qual os braços são ligados e estendidos para o exterior através de uma sequência de reações químicas. Cada etapa da reação deve ser concluída para evitar que alguns ramos sejam mais curtos do que outros. A principal desvantagem dessa abordagem é o surgimento de reações colaterais que originam crescimento incompleto que derivam na formação de

dendrimeros irregulares e com poucas ramificações. Para minimizar estas reações e imperfeições colaterais, recomenda-se a utilização de um grande excesso de reagentes¹⁰¹.

O método convergente segue um processo inverso ao divergente, isto é, os braços ou ramos individuais são sintetizados a partir da superfície para o núcleo ou ponto focal, o qual se torna o braço mais externo do dendrímero final. Neste método torna-se muito mais fácil eliminar impurezas e galhos mais curtos ao longo do caminho, de modo que o dendrímero final fique mais disperso^{102,103}. No entanto, esses dendrímeros não chegam a ser tão ramificados quanto os produzidos pelo método divergente, devido a efeitos estéricos¹⁰¹. A Figura 11 apresenta as etapas na formação dos dendrímeros pelos dois métodos.

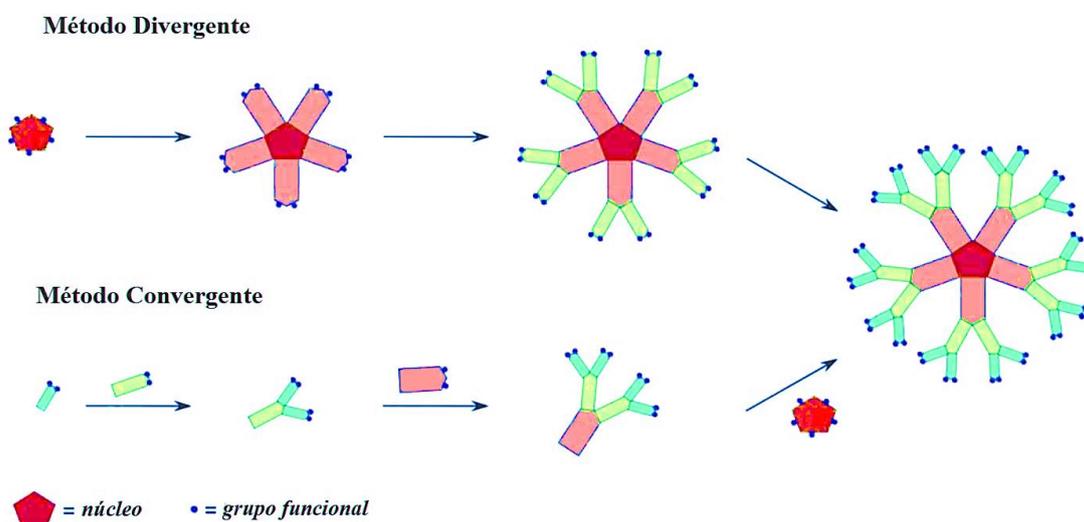


Figura 11. Formação de estruturas dendríticas pelos métodos convergente e divergente, esquema adaptada da Ref. 104.

Estas estruturas ramificadas possuem grandes áreas de superfície que podem ser funcionalizadas modificando assim suas propriedades físico-químicas ou biológicas, possibilitando uma ampla gama de possíveis aplicações¹⁰⁰⁻¹⁰². Devido a isso tem sido observado um crescente interesse na síntese controlada de estruturas dendríticas e o estudo das suas propriedades magnéticas, ópticas e eletrônicas decorrente principalmente da orientação espacial e disposição dos nanocristais.

Os métodos mais utilizados para obtenção de nanoestruturas dendríticas de ouro, envolvem a utilização de agentes direcionadores estruturais (templates) e métodos

eletroquímicos^{105,106}. A eletrodeposição representa um método simples, rápido e econômico para a preparação de estruturas dendríticas¹⁰⁷. Ele também oferece um alto grau de liberdade na alteração da interação entre a taxa de crescimento do cristal e a taxa de transporte de massa, o que o torna um método ideal para estudar sistematicamente o crescimento dendrítico de materiais inorgânicos¹⁰⁸.

2.5. Eletrodos de Lápis grafite

2.5.1. Grafite

O grafite foi descoberto em 1564 em Borrowdale na Inglaterra e, pelas suas características, pensava-se que era uma espécie de chumbo (do inglês lead)¹⁰⁹. Conseqüentemente, foi chamado de chumbo preto (black lead) ou plumbago (do latim, minério de chumbo). Foi neste contexto que muitas pessoas ficaram com a ideia de que a grafite no lápis é chumbo, apesar de não conter este elemento químico.

O grafite, apresenta uma estrutura cristalina na qual os átomos de carbono (unidos por ligação covalente) formam anéis hexagonais planos (folhas de carbono), sobrepostos uns aos outros que se mantem unidos por forças de Vander Waals¹¹⁰. Essas forças por serem fracas, permitem uma espécie de deslizamento ou deslocamento dos planos, este efeito é facilmente observado na escrita do lápis em que camadas de grafite são transferidos no papel. Esta característica também confere ao pó de grafite propriedades lubrificantes. A Figura 12 apresenta a estrutura lamelar do grafite.

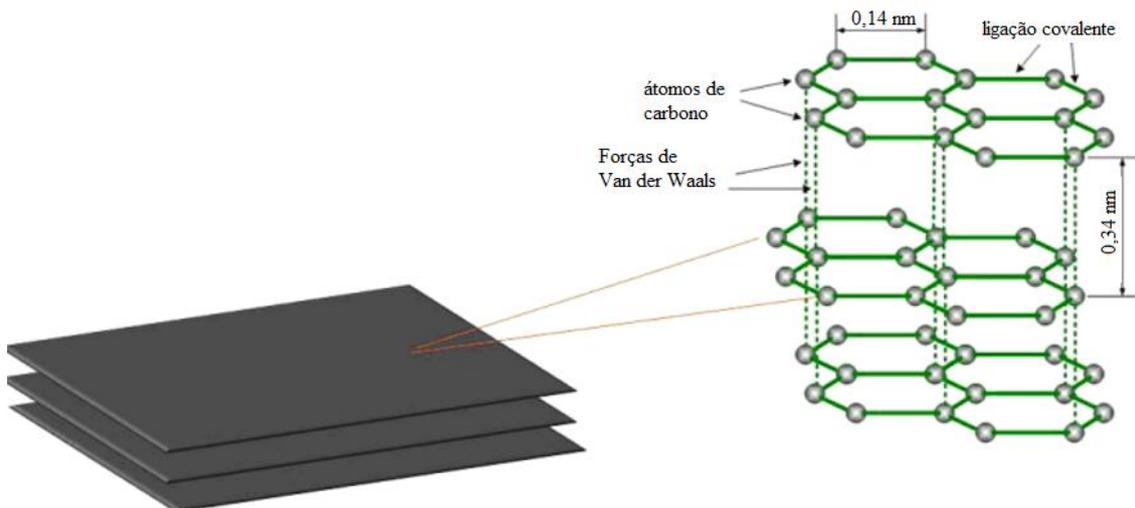


Figura 12. Estrutura do grafite na qual são ilustradas a posição dos átomos, as ligações químicas e a disposição das folhas de grafite, adaptado da Ref. 111.

Nos anéis hexagonais, o carbono assume uma hibridação sp^2 , onde apenas três dos quatro elétrons de valência do carbono formam ligações covalentes (ligações σ) com os átomos de carbono adjacentes, as ligações dentro dos planos da camada, apresentam forças de ligação química fortes. O quarto elétron ressoa entre as ligações de valência da estrutura, formando ligações π conjugadas¹¹². Estas ligações são mais fracas, permitindo a migração de elétrons entre os planos, e por tanto responsáveis pela condução elétrica que constitui uma das principais características e aplicações do grafite. Desse modo, as ligações entre os planos têm energias de ligação de cerca de 2% daquela dentro dos planos.

Em virtude de suas propriedades tais como inércia química, estabilidade térmica, alta condutividade elétrica e lubrificidade, o grafite torna-se adequado para muitas aplicações industriais, incluindo eletrônica, lubrificantes, metalurgia e fabricação de aço¹¹³. Misturado com argila em diferentes proporções forma parte da composição do lápis, com diversos graus de dureza.

2.5.2. Lápis grafite

O grafite do lápis detém na sua composição grafite e argila em diferentes proporções, e um aglutinante (cera, resinas ou polímero), os quais são misturados com água e submetidos a pressão a altas temperaturas para produzir finos bastões. Este

método, amplamente utilizado pelos fabricantes de lápis, foi desenvolvido pelo francês Nicolas-Jacques Conté em 1795¹¹⁴.

De acordo com a “escala de graus” europeia, lápis grafite são identificados com letras que derivam de palavras em inglês, H (Hard que significa duros), HB (hard and black), F (Fine Pointe que significa ponta fina) e B (Black que significa escuro/carregado) e, com números que variam de 1 a 9, para indicar o grau de dureza ou macies e o grau de tonalidade do mais claro ao mais escuro^{115,116}. Como mostrado na Figura 13, os lápis do tipo H, são mais duros, tem mais argila e apresentam um tom mais claro enquanto escrevem e nem deixam uma marca no papel. Os lápis do tipo B são mais suaves, contêm mais grafite e apresentam um tom mais escuro. O lápis HB contêm partes iguais de grafite e argila, o que dá uma densidade de linha média durante a escrita. É fácil de apagar, e é por isso que é usado por crianças para melhorar sua caligrafia na escola. No entanto, o lápis F, bastante semelhantes por natureza ao HB, tem um ponto mais fino e mais duro.

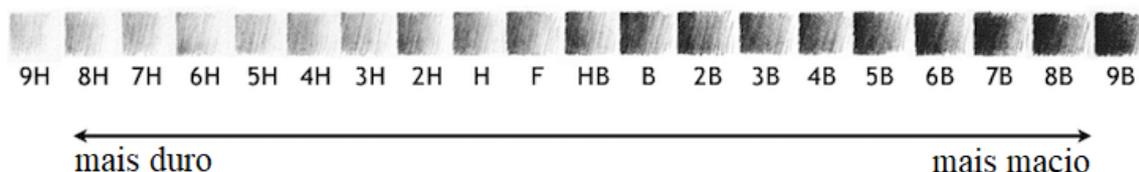


Figura 13. Tonalidade dos diferentes tipos de lápis, imagem adaptada da Ref. 117.

Os tons dos lápis são baseados na quantidade de argila e grafite usadas em sua produção. Se a quantidade de grafite for maior, o lápis terá uma ponta mais macia, enquanto, se a argila for maior, o lápis terá uma ponta mais dura. Embora essa relação dependa do fabricante, para fins comparativos, a Tabela 2 mostra a composição de grafite, argila e aglutinante para os lápis da marca Staedler¹¹⁸.

Tabela 2. Composição dos lápis grafite da marca Staedtler.

Tipo	% grafite	% argila	% aglutinante	Tipo	% grafite	% argila	% aglutinante
9H	41%	53%	5%	F	66%	28%	5%
8H	44%	50%	5%	HB	68%	26%	5%
7H	47%	47%	5%	B	71%	23%	5%
6H	50%	45%	5%	2B	74%	20%	5%
5H	52%	42%	5%	3B	76%	18%	5%
4H	55%	39%	5%	4B	79%	15%	5%
3H	58%	36%	5%	5B	82%	12%	5%
2H	60%	34%	5%	6B	84%	10%	5%
H	63%	31%	5%	7B	87%	07%	5%

2.5.3. Aplicações como eletrodos

Recentemente, o lápis grafite vêm, ganhando popularidade como material de eletrodo, recebendo a denominação de “Eletrodos de Lápis Grafite” (do inglês Pencil Graphite Electrode - PGEs)¹¹⁵. Comparado com outros eletrodos à base de carbono, tais como eletrodo de carbono vítreo e pasta de carbono, PGEs são mais baratos, podendo ser descartáveis, apresentam boa rigidez mecânica que permite seu polimento para renovar a superfície do eletrodo, fornecendo resultados reprodutíveis¹¹⁹.

Os primeiros relatos de utilização de lápis de grafite para produção de eletrodos são datados de 1931¹²⁰. Neste, o grafite, de aproximadamente 2,6 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento, foi removido do lápis 4B, inserido dentro de um tubo de vidro, selado com ajuda de uma cera e em seguida preenchido com mercúrio, e utilizado na determinação de quinidrona.

A partir desse artigo, vários outros foram surgindo nos últimos tempos, conforme mostra o gráfico da Figura 14, resultante da pesquisa na base de dados SCOPUS (acessado no dia 20/06/2018 as 16:58), utilizando as palavras chave: Pencil

Graphite Electrode. Como pode ser observado, houve um crescimento quase-exponencial a partir do ano 2000.

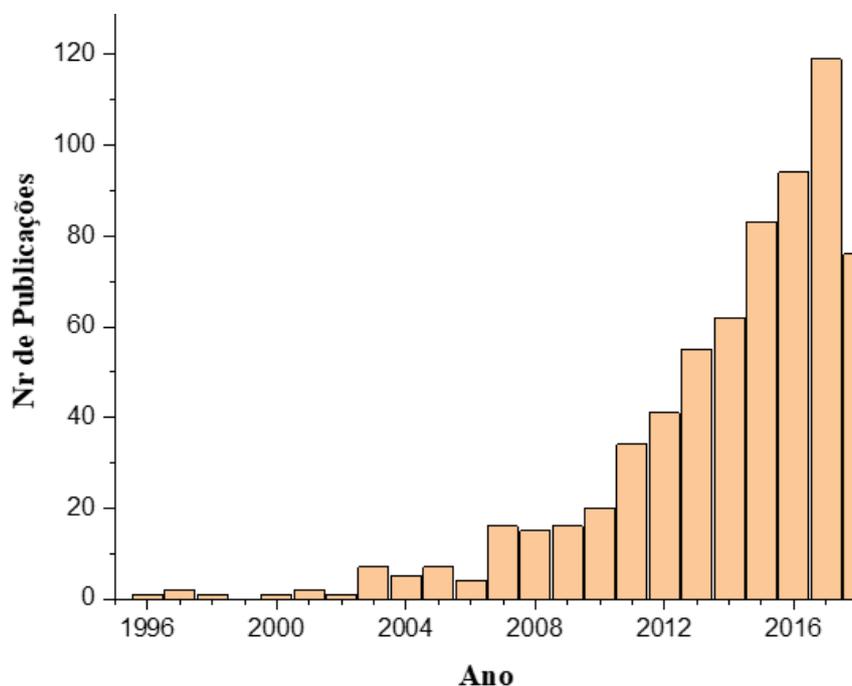


Figura 14. Histograma do número de publicações indexadas no SCOPUS sobre “Pencil Graphite Electrode” desde 1995, acessado no dia 20/06/2018 as 16:58.

Seguidamente serão apresentados alguns trabalhos que utilizaram lápis grafite como eletrodo de trabalho na construção de sensores e biossensores eletroquímicos.

O renomado professor Joseph Wang, e seus colaboradores, demonstraram em um estudo publicado em 2000, a elevada sensibilidade dos lápis B, F, HB, H, 4H, e 6H para medição direta de ADN (ácido desoxirribonucleico) e ARN (ácido ribonucleico) por potenciometria¹²¹. Os mesmos autores relataram um ano depois que essas superfícies são passíveis de modificação. Assim, a partir da imobilização de um oligonucleotídeo na superfície do eletrodo construíram um biossensor para detecção eletroquímica de hibridização de ADN¹²².

Outro biossensor foi construído para detecção da mutação de fator V Leiden em 2003. Desta vez, nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas com um dos

oligonucleotídeos, permitiu a confirmação da hibridização através do sinal de oxidação do ouro no PGE¹²³.

Filme de poli(amaranto) sintetizado eletroquimicamente sobre eletrodo de grafite demonstrou ser sensível e seletivo na determinação de dopamina na presença de ácido úrico¹²⁴. Ainda fazendo uso do método de eletrodeposição foram obtidas estruturas granulares pouco definidas de ouro na superfície de lápis grafite 2B; essa superfície foi então empregada para quantificar L-Dopa e ácido ascórbico em extratos de folhas e sementes de *Mucuna pruriens*¹²⁵.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura descrevem melhorias significativas no desempenho dos eletrodos de lápis grafite com a utilização dos nanomateriais. Em decorrência do pequeno tamanho, essas estruturas, geralmente, conferem uma maior área eletroativa, promovem reações de transferência de elétrons, diminuem sobrepotenciais, e ainda favorecem a reversibilidade de alguns processos. Assim, um biossensor a base de ADN e AuNPs foi construído para detecção de *Bacillus cereus* (uma das bactérias causadora de intoxicação alimentar)¹²⁶. Outro sensor eletroquímico ultrasensível para determinação do Bisfenol A foi desenvolvido modificando a superfície de PGE com AuNPs/polivinilpirrolidona⁵⁷.

Além das AuNPs, os nanotubos de carbono também têm sido amplamente utilizados para modificar PGEs. Um sensor eletroquímico não-enzimático para glicose foi preparado modificando o eletrodo com (E)-4-((5-metiltiazol-2-il)diazenil)-N-fenilnilina (MDPA) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNTs)¹²⁷. MWCNTs também foram utilizados com polianilina (PANI) e a enzima lacase na construção de eletrodos para biocélulas a combustível enzimáticas (EBFCs)¹²⁸.

Em 2018, Stradolini e colaboradores avaliaram 20 diferentes composições de lápis grafite a fim de determinar o melhor desempenho para oxidação de propofol (fármaco utilizado como anestésico geral). Nesse estudo eles demonstraram que ao aumentar o teor de grafite melhora a sensibilidade do eletrodo, mas por outro lado, ao aumentar a quantidade de argila diminui o efeito de adsorção da molécula na superfície o que conseqüentemente melhora a repetibilidade entre as medidas¹²⁹.

Diante do exposto, lápis grafite modificado ou sem modificar se mostra adequado como material de eletrodo para um grande número de analitos. Eles fornecem

boa sensibilidade e reprodutibilidade, e representam uma alternativa viável a outros eletrodos como ouro, carbono vítreo, platina, devido às suas propriedades elétricas comparáveis, mas principalmente por seu baixo custo e fácil disponibilidade, possibilitando aplicações descartáveis^{130,131}.

3. Parte Experimental

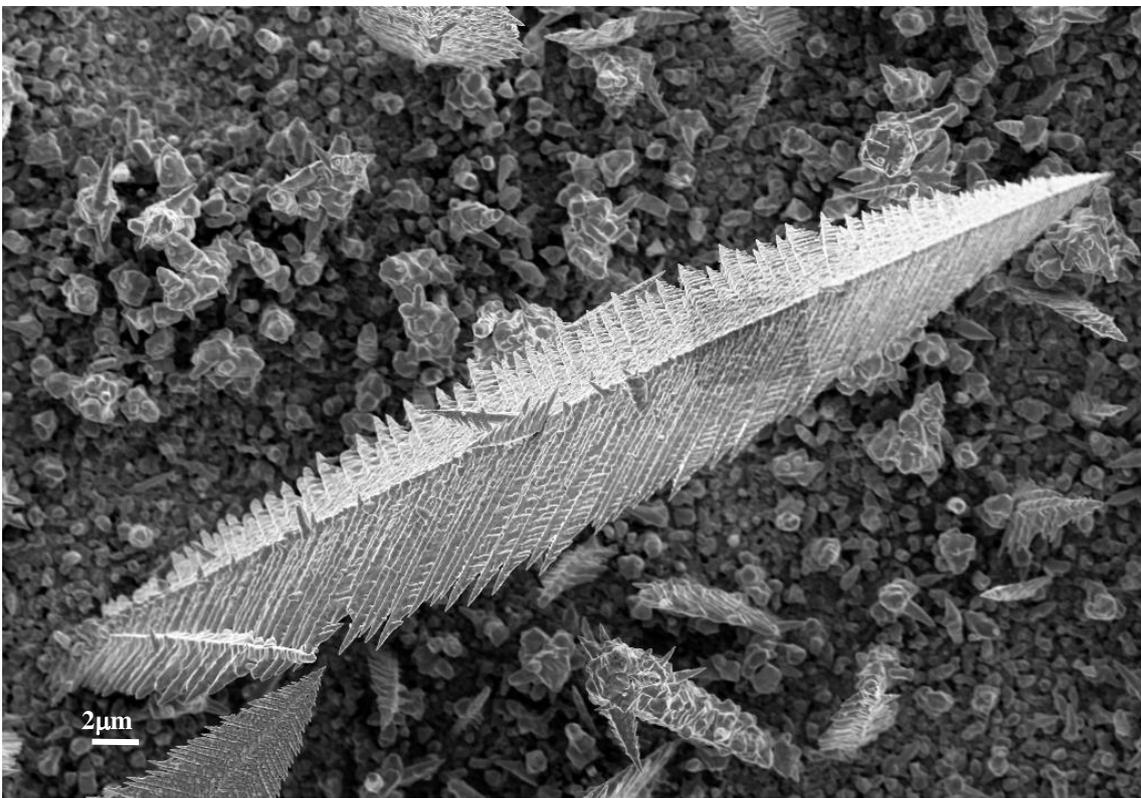


Imagem MEV das estruturas de ouro eletrodepositadas sobre EIC.

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico (P. A.). Ouro em pó, cloreto de potássio (KCl), hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), hexacianoferrato (II) de potássio ($K_4Fe(CN)_6$), 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano (Bisfenol A, BPA), solução de Nafion® 117 (~5% m/v), etanol (>99,9%), e a enzima tirosinase (Tir) extraída de cogumelos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Dihidrogenofosfato de sódio anidro (NaH_2PO_4) e hidrogenofosfato de sódio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), utilizados na preparação da solução tampão fosfato (TF) foram obtidos da empresa Tedia Brazil. As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da marca Millipore (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). A solução de ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) foi preparada a partir da dissolução de ouro em pó de 99,99 % de pureza em água regia, e posterior diluição para obter uma concentração de $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($= 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). O pó liofilizado da enzima tirosinase foi dissolvido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, numa concentração de $8,66 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $834 \text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.2. Técnicas utilizadas na preparação e caracterização do biossensor

3.2.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações sobre os processos eletroquímicos. O perfil do voltamograma revela informações sobre a termodinâmica de processos redox, a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a presença de reações químicas acopladas e a influência de processos adsorptivos¹³².

Durante o experimento de VC, uma varredura de potencial na forma de uma onda triangular é aplicada sobre o eletrodo de trabalho estacionário mantido em repouso na solução eletrolítica¹³³. Essa onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso como mostra a Figura 15A. O potencial no qual ocorre a reversão é chamado de potencial de inversão. Dependendo da informação desejada, podem ser realizados ciclos individuais ou múltiplos ciclos consecutivos. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada como função do potencial aplicado, esse gráfico é conhecido como voltamograma (Fig. 15B).

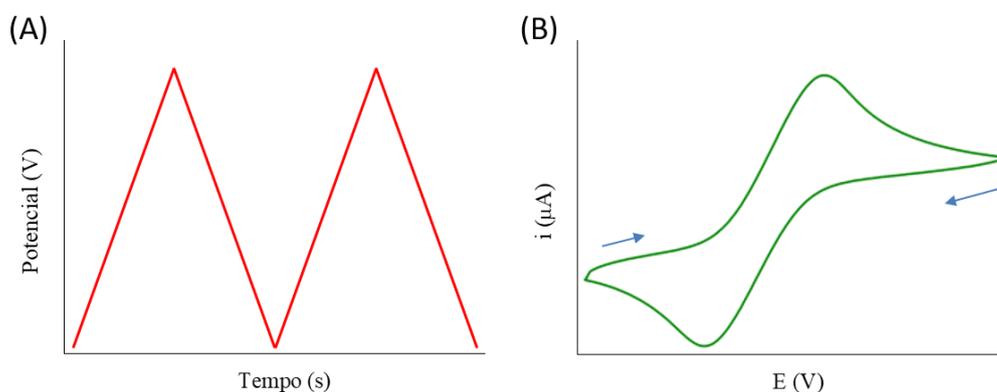


Figura 15. A) Sinal de excitação de potencial versus tempo empregados na voltametria cíclica. B) Voltamograma obtido para um sistema reversível.

O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox da espécie de interesse, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos de mecanismos. Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo: o transporte difusional do analito do seio da solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo. Em alguns casos ainda podem ocorrer reações químicas acopladas.

Os parâmetros a serem considerados em um voltamograma cíclico são o potencial de pico catódico (E_{pc}), o potencial de pico anódico (E_{pa}), a corrente de pico catódica (i_{pc}), e a corrente de pico anódica (i_{pa}).

Para cinéticas de transferência de elétrons rápidas, a constante ($K_s > 10^{-1} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), o processo se torna reversível, ou seja, os picos de corrente catódico e anódico são aproximadamente iguais em valores absolutos, mas com sinais opostos¹³⁴. Nesse caso a diferença entre os potenciais de pico (ΔE_p), deve ser próximo a $0,059/n$ (que provém da equação de Nernst), onde n é o número de elétrons envolvido na reação. As informações quantitativas são obtidas a partir da equação de Randles-Sevcik¹³³, que a 25°C consiste em:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), C_0 é a concentração da espécie em solução ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$) e v é a velocidade de varredura ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$). De acordo com essa expressão, para um processo reversível controlado por difusão, a corrente aumenta proporcionalmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Outros critérios para avaliar a reversibilidade são a razão da corrente de pico anódica e catódica (i_{pa}/i_{pc}) igual a unidade e independente de v , e a não variação do potencial de pico (E_p) com a velocidade de varredura, a razão $i_p/v^{1/2}$ se mantém constante e independe de v ¹³⁴.

A ausência de pico na varredura reversa é a principal característica de sistemas irreversíveis, isto geralmente acontece quando a cinética de transferência de elétrons é lenta ($K_s < 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). Neste caso, o coeficiente de transferência denotado pela letra “ α ” é incluído na expressão da corrente (o valor de α oscila entre 0,3 - 0,7; pode ser utilizado 0,5 quando o valor exato não for conhecido)¹³⁴.

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Eq. 2})$$

Outra característica de processos irreversíveis é o deslocamento do pico com o aumento da velocidade de varredura. De acordo com a teoria de Laviron¹³⁵, o potencial de pico é proporcional a velocidade de varredura como expressa a seguinte equação:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

F , R e T são a constante de Faraday, constante de gases e temperatura, respectivamente.

Para uma reação eletroquímica quase reversível ($10^{-1} > K_s > 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga¹³⁴. Neste caso, o pico na varredura no sentido inverso está presente, porém ΔE_p excede o valor de $0,059/n$.

Nesta tese, a técnica de voltametria cíclica foi utilizada para realizar a eletrodeposição do ouro sobre o eletrodo impresso de carbono, e para avaliar a resposta do biossensor na oxidação do BPA.

3.2.2. Cronoamperometria

A cronoamperometria (CA) é uma técnica eletroquímica que mede a corrente gerada, pela oxidação ou redução de espécies devido a um potencial aplicado em função do tempo (t)¹³⁶. O potencial no eletrodo de trabalho parte de um valor no qual nenhuma reação faradaica ocorre (E_1) a um potencial no qual o analito será oxidado ou reduzido (E_2), (ver Fig. 16).

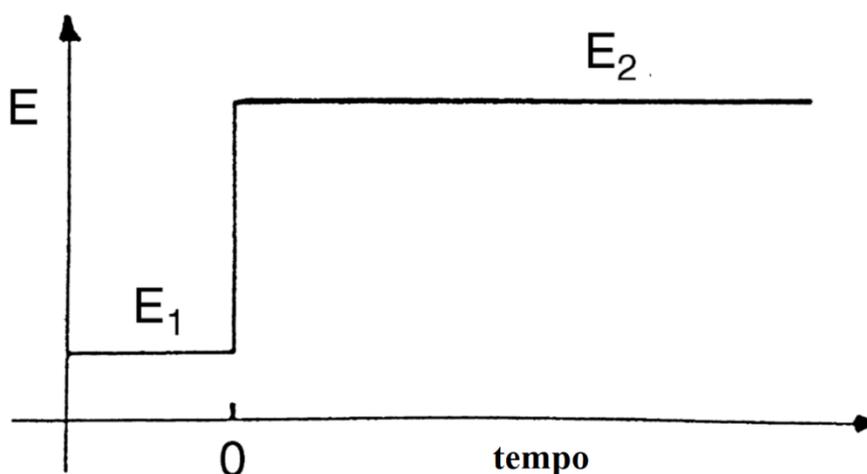


Figura 16. Degrau de potencial aplicado no eletrodo de trabalho, adaptado da Ref.136.

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato da marca Autolab (modelo PGSTAT128N) controlado pelo software NOVA 2.0.1.

3.2.3. Difração de raios X

A difratometria de raios X (XRD) é uma das principais técnicas utilizadas na caracterização de materiais cristalinos. Ela é utilizada principalmente para identificação da fase do cristal e pode fornecer informações sobre as dimensões da célula unitária¹³⁷.

Os raios X são uma forma de radiação eletromagnética de alta energia, entre 100 eV até 100 keV, numa faixa de pequenos comprimentos de onda, entre 0,01 a 10 nanômetros, os quais correspondem a ordem dos espaçamentos atômicos nos sólidos¹³⁸.

Quando um feixe de raios X, de comprimento de onda, λ , incide sobre um material sólido com um certo ângulo (θ), uma fração desse feixe será difratada pelos elétrons que estão associados a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe, como mostra a Figura 17.

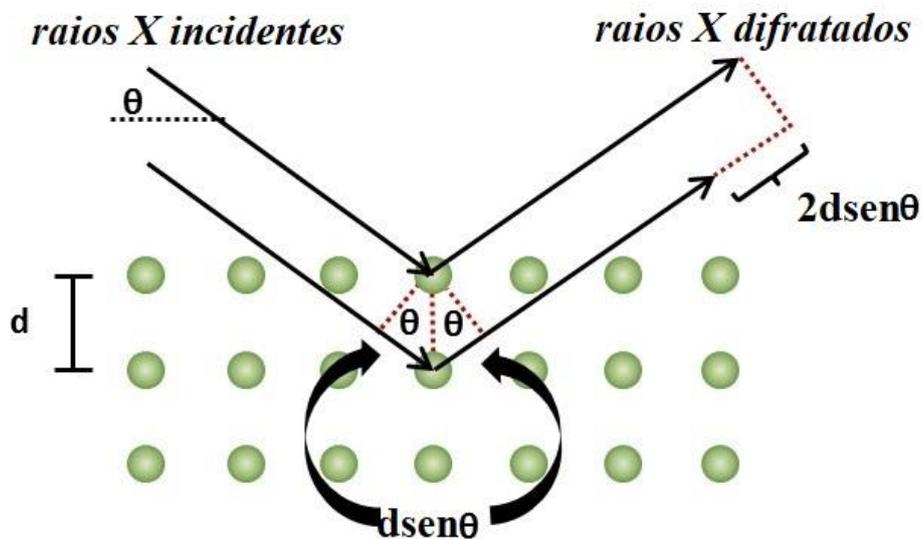


Figura 17. Fenômeno da difração de raios X em um cristal, adaptado da Ref. 137.

Quando é gerada uma interferência construtiva dos feixes que são difratados se cumpre a Lei de Bragg¹³⁹, que pode ser expressa segundo a equação:

$$n \lambda = 2 d \text{sen } \theta \quad (\text{Eq. 4})$$

Essa equação relaciona o comprimento de onda da fonte de raios X utilizado (a fonte mais usada é de cobre, Cu, $\lambda = 0,154184$ nm) com a distância interplanar (d) entre os planos cristalinos determinados pelos índices de Miller (hkl). Onde n é um número inteiro.

Na Figura 18 é apresentada as partes principais de um difratômetro, o qual está constituído basicamente de uma fonte de raios X, um porta-amostra, um goniômetro, e um sistema detector. A fonte é mantida fixa, enquanto a amostra gira a θ°/min e o detector gira a $2\theta^\circ/\text{min}$. A intensidade dos raios X difratados é gravada continuamente à

medida que a amostra e o detector giram através de seus respectivos ângulos. Um pico de intensidade ocorre quando o material contém planos de redes com espaçamentos “d” apropriados para difratar raios X naquele valor de θ .

O detector faz uma varredura dos ângulos em torno da amostra, a fim de coletar e medir a posição e a intensidade dos feixes difratados. A posição angular (2θ) e a intensidade do feixe difratado produzem um padrão bidimensional, o difratograma, que é característico de cada material (impressão digital).

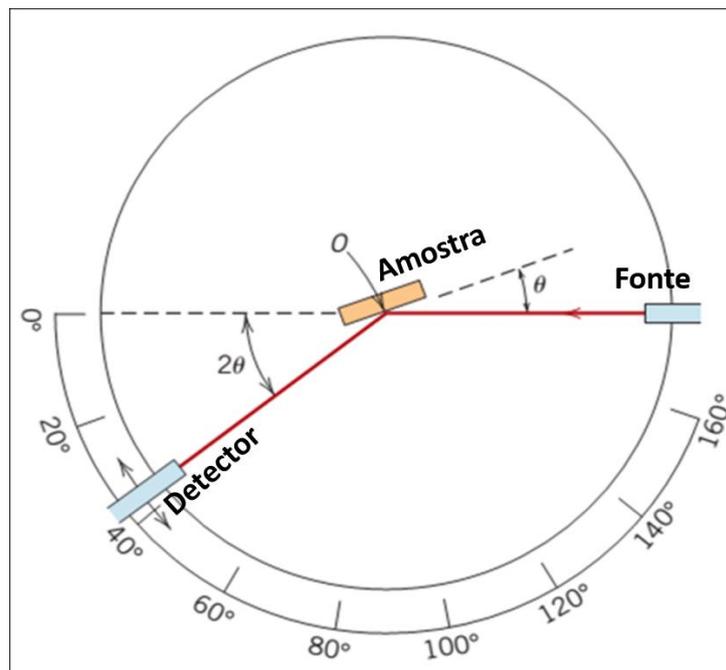


Figura 18. Diagrama esquemático do difratômetro de raios X, adaptado da Ref. 138.

Neste trabalho, as medições de difração de raios X das amostras em pó foram realizadas no equipamento Siemens Kristalloflex D500, usando radiação com o comprimento de onda da linha $K\alpha$ do cobre, $\lambda = 0,15418$ nm, com tensão de 40 KV e corrente de 17,4 mA, monocromador de grafite no feixe secundário. As medições foram realizadas a temperatura ambiente, com ângulo inicial de 30° e ângulo final de 80° , $\Delta 2\theta = 0,05^\circ$ e um incremento de $0,03^\circ$ a cada segundo. Com fenda de divergência = 1,0 mm e fenda receptora = 0,15 mm.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A resolução do olho humano é de aproximadamente 0,2 mm a uma distância padrão de 25 cm, o que significa que, a 25 cm de distância, o olho humano é capaz de discriminar linhas claras e escuras alternadas distantes entre si 0,2 mm. O limite de resolução dos microscópios ópticos está entorno de $0,2\mu$, cerca de 1000 vezes em relação ao olho humano. Com o desenvolvimento do microscópio eletrônico, o poder de resolução foi aumentado para cerca de 100 mil vezes em relação ao olho humano. Esse aumento significativo na resolução dos microscópios eletrônicos é devido a utilização de feixe de elétrons ao invés da luz utilizada nos microscópios ópticos. O comprimento de onda associado ao elétron é muito menor (0,005 nm) comparado ao comprimento de onda da luz (0,55 nm).

Em forma geral as imagens de microscopia eletrônica são consequência das interações dos elétrons acelerados com a matéria, e da inerente carga elétrica do elétron. Os microscópios eletrônicos usam feixes de elétrons proveniente de uma fonte de emissão, filamento de tungstênio (W) ou uma fonte de hexaboreto de lantânio (LaB_6), com certa intensidade e comprimento de onda definido, que gera diversos tipos de sinais, que quando captadas corretamente irão fornecer informações características sobre o material analisado. Como representado na Figura 19, quando um feixe primário incide sobre a amostra diferentes sinais podem ser emitidos¹⁴⁰.

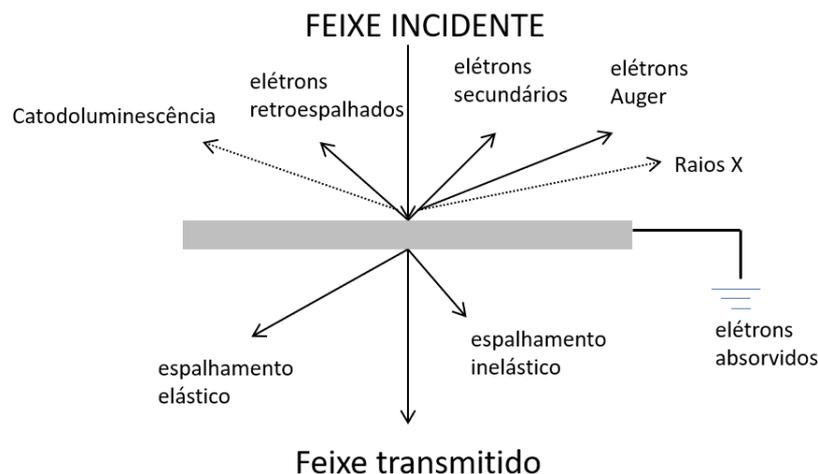


Figura 19. Representação esquemática das interações do feixe de elétrons com a amostra no microscópio eletrônico, adaptado da Ref. 140.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados, sendo estes últimos os de maior energia. Os elétrons secundários, com energia inferior a 50 eV, são produzidos a partir de interações inelásticas. A emissão de elétrons secundários no MEV proporciona informação detalhada sobre a topografia da amostra, uma vez que a maioria do sinal está confinado a uma região da superfície próxima do feixe incidente. Por outro lado, os elétrons retroespalhados possuem alta energia e são originados de interações de espalhamento elástico com os átomos da amostra. Os elementos com número atômico elevado refletem os elétrons mais intensamente que os elementos com baixo número atômico, portanto, aparecem mais brilhantes na imagem, deste modo os elétrons retroespalhados são utilizados para detectar contraste entre áreas com diferentes composições químicas.

Através da emissão de raios X é possível obter a composição química elementar, a nível semi-quantitativo, além de mapear a presença dos elementos em determinadas regiões da amostra.

A Figura 20 mostra os componentes básicos de um microscópio eletrônico de varredura. Como pode ser observado, antes de incidir sobre a amostra, o feixe de elétrons passa por um conjunto de lentes eletromagnéticas: as lentes condensadoras, que permitem diminuir o diâmetro do feixe, e as lentes objetivas que tem por finalidade ajustar o foco do feixe sobre a amostra. Entre as lentes condensadoras e objetivas estão localizadas, em geral, dois pares de bobinas de deflexão eletromagnéticas (bobinas de varredura), que movem o feixe de elétrons nas direções “x” e “y” sobre a superfície da amostra coletando as informações devido as interações elétron-amostra em cada ponto incidente da superfície. O sistema está constituído ainda de um detector que envia a informação ao sistema de visualização.

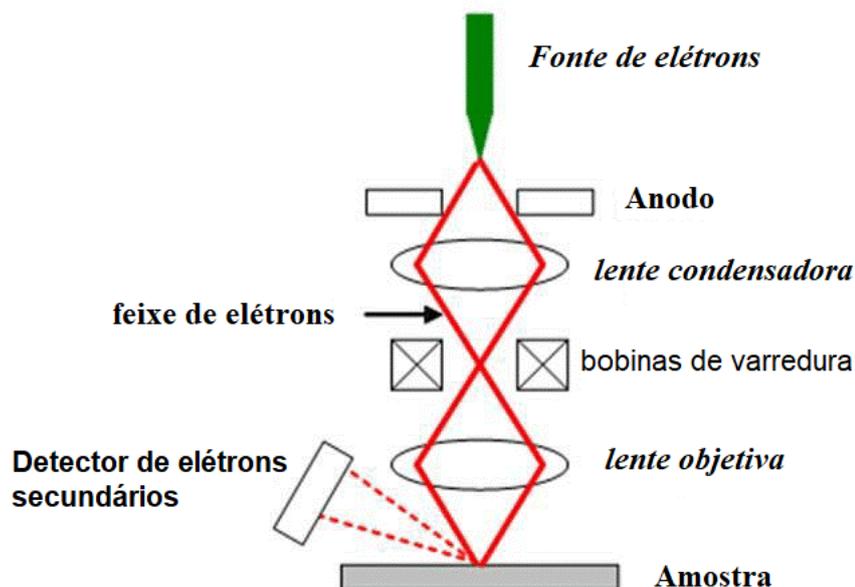


Figura 20. Esquema genérico de um microscópio eletrônico de varredura, adaptado da Ref. 138.

Neste trabalho, os eletrodos modificados foram caracterizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura marca JEOL JSM 6060, usando voltagem de 10 a 20 KV, corrente de filamento de 2.72 A, e vácuo no intervalo de 10^{-4} - 10^{-2} Pa. Também foi utilizado o microscópio Eletrônico FEB-SEM Auriga, usando voltagem de 15 KV na coluna Gemini®, com resolução nominal de 1 nm, e tensão entre 4 pA - 20 nA. As amostras em pó foram fixadas na superfície de um *stub* (porta-amostra de alumínio), com auxílio de uma fita de carbono dupla face. Na preparação das amostras de lápis foi necessário um cuidado especial ao cortar a porção de grafite, especialmente aqueles que detém maior porcentagem de grafite na sua composição, pois são mais moles, macios e esfrelam facilmente.

3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Enquanto a microscopia eletrônica de varredura cria a imagem detectando elétrons refletidos, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) usa elétrons transmitidos (elétrons que passam pela amostra) para criar a imagem¹⁴⁰. Como resultado, o MET oferece informações valiosas sobre a estrutura interna da amostra, como a estrutura cristalina, relações de orientação entre fases, a morfologia, defeitos,

enquanto o MEV fornece informações sobre a superfície da amostra e sua composição. A preparação da amostra, por tanto, também é diferente, ela deve ser extremamente fina para MET, para que os elétrons possam atravessá-la facilmente, interagindo levemente com ela. Pequenas telas metálicas (ou *grids*), de 3 mm de diâmetro, são utilizadas como suporte.

Um microscópio eletrônico de transmissão está constituído de uma coluna mantida a alto vácuo (10^{-7} mm Hg), na qual estão contidos um canhão de elétrons, um sistema de lentes condensadora, uma lente objetiva, lentes intermediárias e lente projetora, como representado na Figura 21A.

Um sistema de alta tensão com grande estabilidade, fornece uma corrente necessária para as lentes, as quais podem ser de tipo eletromagnético ou magnético. A fonte de elétrons pode vir de uma fonte de emissão termiônica, de uma fonte de emissão de campo (*field emission*) ou de uma fonte mista, sendo acelerados por um potencial da ordem de dezenas de KV em vácuo, e com uma densidade de corrente no intervalo de 5×10^4 a 10^{10} A·m⁻².

Os elétrons ao saírem da fonte, passam pelo sistema de lentes do condensador em duas orientações, a paralela e a desfocada. No caso do feixe incidindo paralelamente à amostra, esta ilumina uma maior área da amostra e conseqüentemente produz uma intensidade menor. No entanto, o feixe desfocado ilumina uma região menor da amostra mais com uma intensidade maior. Após atravessar a “*grid*” contendo a amostra, o feixe transmitido passa pela lente objetiva, a qual fornece uma imagem inicial ampliada do objeto no plano da imagem intermediária 1; uma lente intermediária fornece uma segunda imagem ampliada, no plano da imagem intermediária 2. Finalmente, os elétrons transmitidos passam pela lente projetora e atingem uma tela fluorescente formando uma imagem nítida e ampliada¹⁴⁰. A combinação de condições de abertura das lentes possibilita ajustar a incidência do feixe na amostra, que permite o ajuste do ângulo de convergência, intensidade e coerência. A Figura 21A mostra o trajeto dos raios para a formação da imagem do objeto.

Para obtenção de padrões de difração, ver Figura 21B, as lentes intermediárias e projetora devem ser removidas, permitindo que o plano focal anterior a primeira imagem seja projetada na tela fluorescente. Dessa forma, é possível a obtenção de

informação local cristalográfica, como a indexação dos planos de difração, além da determinação da direção de crescimento da amostra¹⁴⁰.

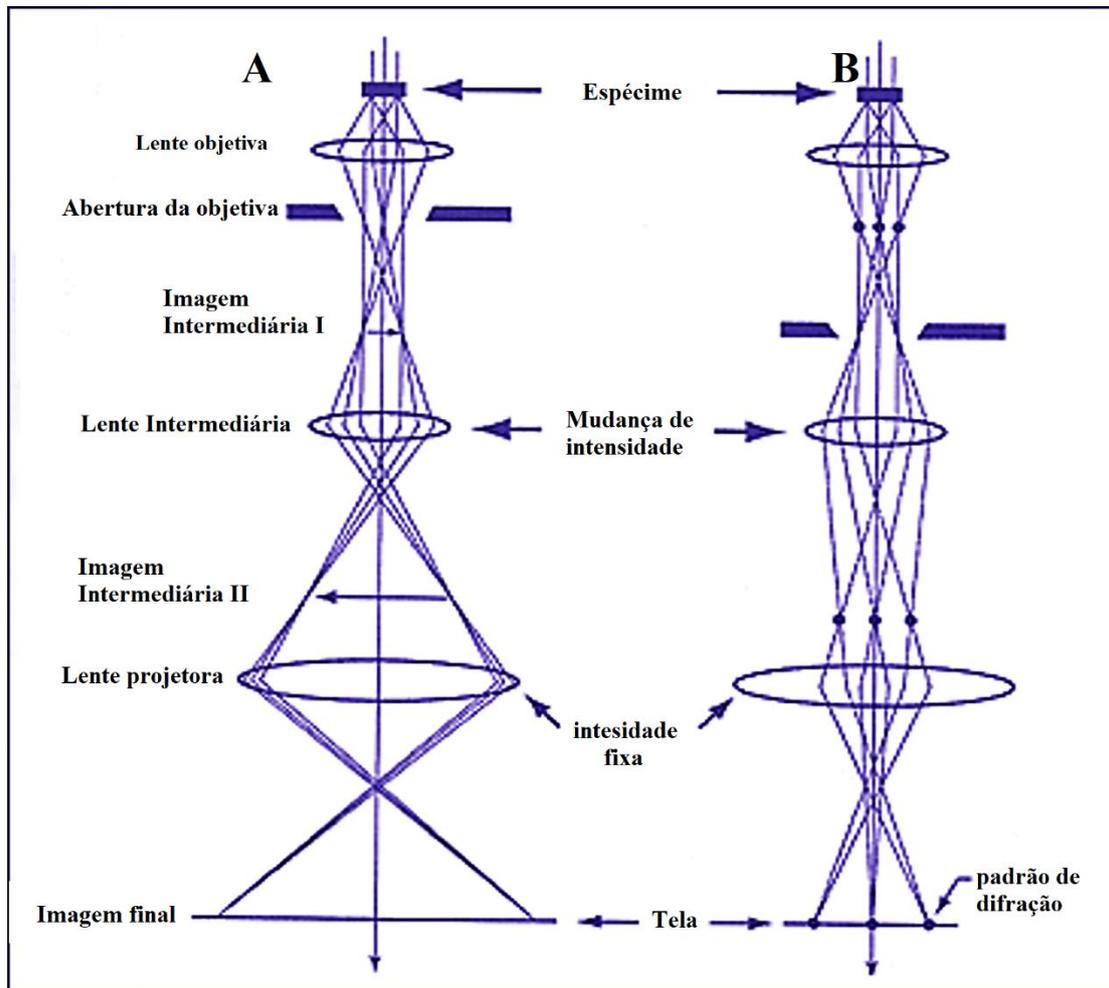


Figura 21. A) Representação do trajeto do feixe para a formação da imagem do objeto. B) Representação do trajeto para formar a imagem de difração, adaptada da Ref. 140.

Neste trabalho, as imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em um equipamento JEOL JEM 2010 operado a uma tensão de 200 KV. As amostras foram depositadas sobre *grids* de cobre de 300 mesh e de 3 mm de diâmetro, as quais estão recobertas por um filme fino de carbono de aproximadamente 15 nm de espessura.

5. Conclusões

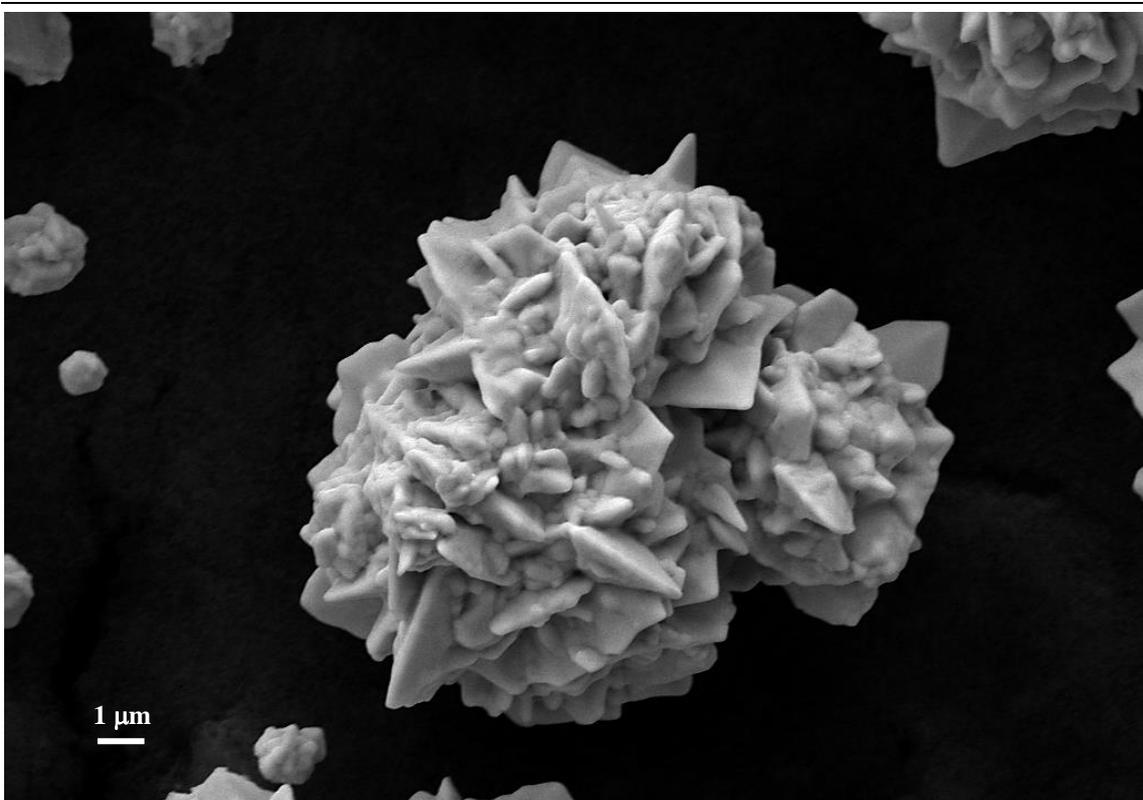


Imagem MEV das estruturas de ouro eletrodepositadas sobre EIC.

Com base nos experimentos realizados, chegaram-se as seguintes conclusões:

A eletrodeposição de ouro sobre eletrodo impresso de carbono, aplicando um potencial constante de $-0,6$ V durante 600 segundos, permitiu a formação de microestruturas semelhante a folhas bem definidas. Por outro lado, quando a redução do ácido cloroáurico foi conduzida através da técnica de voltametria cíclica a $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, as estruturas adquiriram formas diferentes, mais globulares, distribuídas uniformemente, porém isoladamente na superfície do eletrodo.

Utilizando o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, foi constatado que as estruturas em forma de folhas na superfície do eletrodo aumentaram significativamente a intensidade de corrente, devido ao aumento da área superficial. A separação dos potenciais de pico (ΔE_p) também foi afetada, foi evidenciada uma diminuição para valores mais próximos do valor teórico de 59 mV para processos reversíveis, o que denota que essas estruturas além de fornecer maior área efetiva, melhoraram significativamente a reação de transferência de elétron.

As nanoestruturas serviram de plataforma para a imobilização da enzima tirosinase, a qual, concomitantemente com a morfologia do ouro criou um ambiente favorável para a adsorção do BPA.

Nafion/Tir/Au/EIC apresentou boa faixa linear, baixo limite de detecção, excelente estabilidade e reprodutibilidade. Manteve sua atividade por aproximadamente 6 meses, demonstrando que o processo de preparação foi eficiente, uma vantagem do biossensor proposto para detecção de BPA.

O estudo com possíveis substâncias interferentes no sinal de oxidação do BPA (KCl, KNO_3 , NaCl, glicose, dopamina, e ácido ascórbico), mostrou que, apesar da dopamina apresentar um ligeiro aumento na intensidade de corrente, por apresentar pico de oxidação próximo ao do BPA, não houve variação significativa na corrente, com desvio padrão relativo abaixo de $\pm 5\%$, demonstrando, deste modo, que o biossensor mostrou-se eficaz.

O biossensor mostrou uma aplicação prática na determinação do BPA em amostras de água pelo teste de recuperação em amostras de água mineral e da torneira. Com uma taxa de recuperação média e desvios padrão relativos aceitáveis, estes resultados indicam a potencialidade do biossensor desenvolvido para a detecção de BPA em amostras de água.

A eletrodeposição de ouro sobre o lápis grafite, levou a formação de microestruturas dendríticas, as quais mostraram-se promissoras para a eletrooxidação do BPA em meio básico.

6. Referências bibliográficas

1. Global Industry Analyst, Inc. Bisphenol A Market Trends. **2015**
https://www.strategyr.com/MarketResearch/Bisphenol_A_Market_Trends.asp
2. Almeida S.; Raposo, A.; González, M.A.; Carrascosa, C. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2018**, *17*, 1503–1517.
3. Bernardo, P.E.M.; Navas, S.A.; Murata, L.T.F.; Alcântara, M.R.S. Bisfenol A : o uso em embalagens para alimentos , exposição e toxicidade – Uma Revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, **2015**, *74*(1), 1–11.
4. Tzatzarakis, M. N.; Karzi, V.; Vakonaki, E.; Goumenou, M.; Kavvalakis, M.; Stivaktakis, P.; Tsitsimpikou, C.; Tsakiris, I.; Rizos, A. K.; Tsatsakis, A. M. Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation. *Food Addit. Contam. B*, **2017**, *10*(2), 85–90.
5. Kang, J.H.; Kondo, F.; Katayama, Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, **2006**, *226* (2-3), 79–89.
6. Manoli, E.; Voutsas, D. Food Containers and Packaging Materials as Possible Source of Hazardous Chemicals to Food. In: Takada, H.; Karapanagioti, H. (Eds) Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment. *The Handbook of Environmental Chemistry*, **2016**, 78.
7. American Chemical Society. Molecule of the Week Archive Bisphenol A, January 09, **2012**. <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/b/bisphenol-a.html>
8. O'Neil, M. J. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, **2013**, 226.
9. Haynes, W.M. (ed.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 95^a Ed. CRC Press LLC, Boca Raton: FL **2014-2015**, 3–56.
10. Prokop, Z.; Hankova, L.; Jerábek, J. Bisphenol A synthesis – modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *React. Funct. Polym.*, **2004**, *60*, 77–83.
11. Ning, X.; Ishida, H. Phenolic materials via ring-opening polymerization: Synthesis and characterization of bisphenol-A based benzoxazines and their polymers. *J. Polym. Sci. A*, **1994**, *32* (6), 1121–1129.

12. Chen, X.; Jiao, C.; Li, S.; Sun, J. Flame retardant epoxy resins from bisphenol-A epoxy cured with hyperbranched polyphosphate ester. *J. Polym. Res.*, **2011**, 18, 2229–2237.
13. Scott, C. E.; Morris, J. C.; Bradley, J. R. Blends of bisphenol a polycarbonate and polyesters. *US Patent 6011124A*, **2000**.
14. Saba, N.; Jawaid, M.; Alothman, O. Y.; Paridah, M. T.; Hassan, A. Recent advances in epoxy resin, natural fiber-reinforced epoxy composites and their applications. *J. Reinf. Plast. Comp.*, **2016**, 35(6), 447–470.
15. Mohan, P. A Critical Review: The Modification, Properties, and Applications of Epoxy Resins. *Polym. Plast. Technol. Eng.*, **2013**, 52, 107–125.
16. May, C. A. Resins for Aerospace. *Applied Polymer Science*, 2nd Ed., **1985**, 557–580.
17. Handbook of Plastics Joining 2nd Ed. William Andrew Inc. (Elsevier), **2009**, 287–314.
18. Parvin, M.; Williams, J. G. The effect of temperature on the fracture of polycarbonate. *J. Mat. Sci.* **1975**, 10 (11), 1883–1888.
19. Chen, L.; In Suh, B. Bisphenol A in Dental Materials: A Review. *JSM Dent.* **2013**, 1, 1004.
20. Vandenberg, L.N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshons, W. V. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.*, **2007**, 24 (2), 139–177.
21. Ribeiro, E.; Ladeira, C.; Viegas, S. Occupational Exposure to Bisphenol A (BPA): A Reality That Still Needs to Be Unveiled. *Toxics*. **2017**, 5(3), 22.
22. Lin, Z.; Wang, L.; Jia, Y.; Zhang, Y.; Dong, Q.; Huang, C. *Water Air Soil Pollut.* **2017**, 228, 98.
23. Lorber, M.; Schechter, A.; Paepke, O.; Shropshire, W.; Christensen, K.; Birnbaum, L. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. *Environ. Intern.*, **2015**, 77, 55–62.
24. Cunha, S. C.; Alves, R. N.; Fernandes, J. O.; Casal, S.; Marques, A. First approach to assess the bioaccessibility of bisphenol A in canned seafood. *Food Chem.*, **2017**, 232, 501–507.
25. Guart, A.; Bono-Blay, F.; Borrell, A.; Lacorte, S. Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters. *Food Chem.*, **2014**, 156, 73–80

26. Kang, J. H.; Kito, K.; Kondo, F. Factors Influencing the Migration of Bisphenol A from Cans. *J. Food Prot.*, **2003**, 66 (8), 1444–1447.
27. Hoekstra, E. J.; Simoneau, C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, 53, 386–402.
28. Canesi, L.; Fabbri, E. Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. *Dose-Response Intern. J.*, **2015**, 1–14.
29. Kobroob, A.; Peerapanyasut, W.; Nipon Chattipakorn, N.; Wongmekiat, O. Damaging Effects of Bisphenol A on the Kidney and the Protection by Melatonin: Emerging Evidences from In Vivo and In Vitro Studies. *Oxid. Med. Cell. Long.*, **2018**, 3082438, 1–15.
30. Meng, Z.; Tian, S.; Yan, J.; Jia, M.; Yan, S.; Li, R.; Zhang, R.; Zhu, W.; Zhou, Z. Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environ. Pollut.*, **2019**, 247, 935–943.
31. Asahi, J.; Kamo, H.; Baba, R.; Doi, Y.; Yamashita, A.; Murakami, D.; Hirano, T. Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life Sci.*, **2010**, 87, 431–438.
32. Seachrist, D. D.; Bonk, K. W.; Ho, S. M.; Prins, G. S.; Soto, A. M.; Keri, R. A. A Review of the Carcinogenic Potential of Bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*, **2016**, 59, 167–182.
33. Kawai, K.; Nozaki, T.; Nishikata, H.; Aou, S.; Takii, M.; Kubo, C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, **2003**, 111, 175–178.
34. Ministério da Saúde. Agência Vigilância Sanitária. Resolução RDC N.º 41/2011. <http://portal.anvisa.gov.br>
35. Martínez, M. A.; Castro, I.; Rovira, J.; Ares, S.; Rodríguez, J. M.; Cunha, S. C.; Casal, S.; Fernandes, J. O.; Schuhmacher, M.; Nadal, M. Early-life intake of major trace elements, bisphenol A, tetrabromobisphenol A and fatty acids: Comparing human milk and commercial infant formulas. *Environ. Res.*, **2019**, 169, 246–255.
36. Vandenberg, L. N.; Chahoud, I.; Heindel, J. J.; Padmanabhan, V.; Paumgartten, F. J. R.; Schoenfelder, G. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies

- Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, **2010**, 118(8), 1055–1070.
37. EFSA explains the Safety of Bisphenol A. Scientific opinion on bisphenol A (2015). <http://www.efsa.europa.eu>
 38. Munguía-López, E. M.; Gerardo-Lugo, S.; Peralta, E.; Bolumen, S.; Soto-Valdez, H. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit. Contam.*, **2005**, 22(9), 892–898.
 39. Sungur, S.; Köroğlu, M.; Özkan, A. Determination of bisphenol a migrating from canned food and beverages in markets. *Food Chem.*, **2014**, 142, 87–91.
 40. Liao, C.; Kannan, K. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Addit. Contam. A*, **2014**, 31 (2), 319–329.
 41. Makinwa, T. T.; Uadia, P. O. A survey of the level of Bisphenol A in effluents, soil leachates, food samples, drinking water and consumer products in South Western Nigeria. *World Environ.*, **2015**, 5 (4), 135–139.
 42. Sodré, F. F.; Locatelli, M. A. F.; Jardim, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water Air Soil Pollut.*, **2010**, 206, 57–67.
 43. Melo, S.M.; Brito, M.N. Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-fluorescence detection. *Water Air Soil Pollut.*, **2014**, 225, 1783–1790.
 44. Baluka, S. A.; Rumbeiha, W. K. Bisphenol A and food safety: Lessons from developed to developing countries. *Food Chem. Toxicol.*, **2016**, 92, 58-63.
 45. Zhang P.; Gao, C.; Zhao, B.; Sun, G. Using data mining and UV-VIS spectrophotometric to determine the content of bisphenol A in plastics. *J. Chem. Pharm. Res.* **2014**, 6(6), 2553–2557.
 46. Selvaraj, K. K.; Shanmugam, G.; Sampath, S.; Larsson, D.G.; Ramaswamy, B.R. GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2014**, 99, 13–20.
 47. Yi, B.; Kim, C.; Yang, M. Biological monitoring of bisphenol A with HLPC/FLD and LC/MS/MS assays. *J. Chromatogr. B Anal. Technol Biomed. Life Sci.*, **2010**, 878(27), 2606–2610.
 48. Mei, S.; Wu, D.; Jiang, M.; Lu, B.; Lim, J. M.; Zhou, Y. K.; Lee, Y.-III.

- Determination of trace bisphenol A in complex samples using selective molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. *Microchem J.*, **2011**, 98(1), 150–155.
49. Zhang, D.; Yang, J.; Ye, J.; Xu, L.; Zhan, S.; Xia, B.; Wang, L. Colorimetric detection of bisphenol A based on unmodified aptamer and cationic polymer aggregated gold nanoparticles. *Anal. Biochem.*, **2016**, 499, 51–56.
 50. Kuramitz, H.; Nakata, Y.; Kawasaki, M.; Tanaka, S. Electrochemical oxidation of bisphenol A. Application to the removal of bisphenol A using a carbon fiber electrode. *Chemosphere*, **2001**, 45, 37–43.
 51. Murugananthan, M.; Yoshihara, S.; Rakuma, T.; Shirakashi, T. Mineralization of bisphenol A (BPA) by anodic oxidation with boron-doped diamond (BDD) electrode. *J. Hazard. Mater.*, **2008**, 154, 213–220.
 52. Pereira, G. F.; Andrade, L. S.; Rocha-Filho, R.C.; Bocchi, N.; Biaggio, S.R. Electrochemical determination of bisphenol A using a boron-doped diamond electrode. *Electrochim. Acta*, **2012**, 82, 3–8.
 53. Huang, W. Voltammetric Determination of Bisphenol A Using a Carbon Paste Electrode Based on the Enhancement Effect of Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB). *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2005**, 26, 1560–1564.
 54. Ławrywianiec, M.; Smajdor, J.; Paczosa-Bator, B.; Piech, R. High Sensitive Method for Determination of the Toxic Bisphenol A in Food/Beverage Packaging and Thermal Paper Using Glassy Carbon Electrode Modified with Carbon Black Nanoparticles. *Food Anal Methods*. **2017**, 10(12), 3825–3835.
 55. Ntsendwana, B.; Mamba, B. B.; Sampath, S.; Arotiba, O. A. Electrochemical Detection of Bisphenol A Using Graphene- Modified Glassy Carbon Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, 7, 3501–3512.
 56. Messaoud, N. B.; Ghica, M. E.; Dridi, C.; Ali, M. B.; Brett, C.M.A. Electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticle modified electrode for the sensitive detection of bisphenol A. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, 253, 513–522.
 57. Yaman, Y.T.; Abaci, S. Sensitive adsorptive voltammetric method for determination of Bisphenol A by gold nanoparticle/polyvinylpyrrolidone-modified pencil graphite electrode. *Sensors*. **2016**, 16 (6), 756–768.
 58. Kannan, P.K.; Hu, C.; Morgan, H.; Moshkalev, S.A.; Rout, C. S. Electrochemical sensing of bisphenol using a multilayer graphene nanobelt

- modified photolithography patterned platinum electrode. *Nanotechnology*, **2016**, 27, 375504.
59. Chan, Y. Y.; Yue, Y.; Li, Y.; Webster, R.D. Electrochemical/chemical oxidation of bisphenol A in a four-electron/two- proton process in aprotic organic solvents. *Electrochim Acta*. **2013**, 112, 287–294.
60. Han, M.; Qu, Y.; Chen, S.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Ma, M.; Wang, Z.; Zhan, G.; Li, C. Amperometric biosensor for bisphenol A based on a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite made from polylysine, single walled carbon nanotubes and tyrosinase. *Microchim Acta*. **2013**, 180, 989–996.
61. Kochana, J.; Wapiennik, K.; Kozak, J.; Knihnicki, P.; Pollap, A.; Woźniakiewicz, M.; Nowak, J.; Kościelniak, P. Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system. *Talanta*., **2015**, 144, 163–170.
62. Zehani, N.; Fortgang, P.; Lachgar, M. S.; Baraket, A.; Arab, M.; Dzyadevych, S. V.; Kherrat, R.; Jaffrezic-Renault, N. Highly sensitive electrochemical biosensor for bisphenol A detection based on a diazonium-functionalized boron-doped diamond electrode modified with a multi-walled carbon nanotube-tyrosinase hybrid film. *Biosens Bioelectron*. **2015**, 74, 830–835.
63. Li, R.; Wang, Y.; Deng, Y.; Liu, G.; Hou, X.; Huang, Y.; Li, C. Enhanced Biosensing of Bisphenol A Using a Nanointerface Based on Tyrosinase/Reduced Graphene Oxides Functionalized with Ionic Liquid. *Electroanalysis*. **2016**, 28(1), 96–102.
64. Yin H, Zhou Y, Xu J, Ai S, Cui L, Zhu L. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. *Anal. Chim. Acta.*, **2010**, 659(1-2), 144–150.
65. Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 121-131.
66. Ghoshal, S.; Mitra, D.; Roy, S.; Majumder, D. D. Biosensors and Biochips for Nanomedical Applications: A Review. *Sensors Transd. J.*, **2010**, 113(2), 1-17.
67. Justino, C.I.L.; Freitas, A.C.; Pereira, R.; Duarte A.C.; Rocha Santos, T.A.P. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **2015**, 68, 2–17.

68. De Oliveira, A.E.F.; Pereira, A.C. Biosensores e a indústria alimentar - revisão. *Rev Virtual Quim.* **2016**, *8*(5), 1311–1333.
69. Mello, L.D.; Kubota, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.*, **2002**, *77*(2), 237–256.
70. Rotariu, L.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N.; Bala, C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants –trends and perspective. *Trends Anal. Chem.*, **2016**, *79*, 80–87.
71. Vasilescu, A.; Nunes, G.; Hayat, A.; Latif, U.; Marty, J. L. Electrochemical Affinity Biosensors Based on Disposable Screen-Printed Electrodes for Detection of Food Allergens. *Sensors*, **2016**, *16*, 1863–1893.
72. Nguyen, H. H.; Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.*, **2017**, *26*(6), 157–163.
73. Dominguez-Benetton, X.; Srikanth, S.; Satyawali, Y.; Vanbroekhoven, K.; Pant, D. Enzymatic Electrosynthesis: An Overview on the Progress in Enzyme-Electrodes for the Production of Electricity, Fuels and Chemicals. *J. Microbial. Biochem. Technol.*, **2013**, S6-007.
74. Tsai, Y. C.; Li, S-C.; Chen, J. M. Cast Thin Film Biosensor Design Based on a Nafion Backbone, a Multiwalled Carbon Nanotube Conduit, and a Glucose Oxidase Function. *Langmuir*, **2005**, *21*, 3653-3658.
75. Perles, C. E. Propriedades físico-químicas relacionadas ao desenvolvimento de membranas de Nafion[®] para aplicações em células a combustível do tipo PEMFC. *Polim: Cienc. Tecnol.*, **2008**, *18* (4), 281-288.
76. Oriol, G. G.; García-Vall, R.; Giamberin, M. Membranes for artificial photosynthesis. *Seguridad y Medio Ambiente*, Fundación Mapfre, **2012**, *32*, N126, 1–12.
77. Kanteev, M.; Goldfeder, M.; Fishman, A. Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci.*, **2015**, *24*(9), 1360-1369.
78. Sendovski, M.; Kanteev, M.; Ben-Yosef, V. S.; Adir, N.; Fishman, A. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.*, **2011**, *405*(1), 227–237.
79. Ramsden C.A.; Riley, P.A. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Biorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 2388–2395.

80. Barton, D. E.; Kwon, B. S.; Francke, U. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14 → q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics*, **1988**, 3 (91), 17–24.
81. Seo, S.Y.; Sharma, V. K.; Sharma, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2837–285328.
82. Vidotti, M.; Carvalhal, R. F.; Mendes, R. K.; Ferreira, D. C.M.; Kubota, L. T. Biosensors based on gold nanostructures. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2011**, 22 (1), 3–20.
83. Zhang, Y.; Chu, W.; Foroushani, A. D.; Wang, H.; Li, D.; Liu, J.; Barrow, C. J.; Wang, X.; Yang, W. New Gold Nanostructures for Sensor Applications: A Review. *Materials*, **2014**, 7, 5169–5201.
84. Špačková, B.; Wrobel, P.; Bocková, M.; Hoola, J. Optical Biosensors Based on Plasmonic Nanostructures: A Review. *Proceedings of the IEEE*, **2016**, 104(12), 2380–2408.
85. Putzbach, W.; Ronkainen, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors*, **2013**, 13, 4811–4840.
86. Luz, R. A. S.; Crespilho, F. N. Gold nanoparticle-mediated electron transfer of cytochrome c on a self-assembled surface. *RSC Adv.*, **2016**, 6, 62585–62593.
87. Malel, E.; Mandler, D. Direct Electron Transfer between Glucose Oxidase and Gold Nanoparticles; When Size Matters. *ChemElectroChem*, **2019**, 6, 147–15.
88. Suchomel, P.; Kvitek, L.; Pucek, R.; Panacek, A.; Halder, A.; Vajda, S.; Zboril, R. Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Sci. Rep.*, **2018**, 8 (1), 4589.
89. Sharma N, Bhatt G, Kothiyal P. Gold Nanoparticles synthesis, properties, and forthcoming applications – A review. *Indian J.Pharm. Biol. Res.* **2015**,3(2), 13–27.
90. Hong, X.; Tan, C.; Chen, J.; Xu, Z.; Zhang, H. Synthesis, properties and applications of one- and two-dimensional gold nanostructures. *NANO Res.*, **2015**, 8(1), 40–55.
91. Sciau, P. Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval Ceramics. In: The delivery of nanoparticles, INTECH Open Access Publisher, **2012**, 525–540.

92. Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir*, **2009**, 25(24), 13840–13851.
93. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *J. Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55–75.
94. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sc.*, **1973**, 241, 20–22.
95. Giersig, M. Mulvaney, P. Formation of ordered two-dimensional gold colloid lattices by electrophoretic deposition. *Phys. Chem.*, **1993**, 97, 6334–6336.
96. Zhao, P.; Li, Na; Astruc, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordin. Chem. Rev.*, **2013**, 257, 638–665.
97. Al-Johani, H.; Abou-Hamad, E.; Jedidi, A.; Widdifield, C. M.; Viger-Gravel, J.; Sangaru, S. S.; Gajan, D.; Anjum, D. H.; Ould-Chikh, S.; Hedhili, M. N.; Gurinov, A.; Kelly, M. J.; El Eter, M.; Cavallo, L.; Emsley, L.; Basset, J. M. The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nat. Chem.*, **2017**, 9, 890–895.
98. Alexandridis, P. Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. *Chem. Eng. Technol.*, **2011**, 34(1), 15–28.
99. Saldan, I.; Dobrovetska, O.; Sus, L.; Makota, O.; Pereviznyk, O.; Kuntiyi, O.; Reshetnyak, O. Electrochemical synthesis and properties of gold nanomaterials. *J. Solid State Electrochem.*, **2018**, 22, 637–656.
100. Dykes, G. M. Dendrimers: A review of their appeal and applications. *J Chem Technol Biotechnol*. **2001**, 76(9), 903–918.
101. Baig, T.; Nayak, J.; Dwivedi, V.; Singh, A.; Srivastava, A.; Tripathi P.K. A Review about Dendrimers: Synthesis, Types, Characterization and Applications. *Int. J. Adv. Pharmacy., Biol. Chem.* **2015**, 4(1), 44–59.
102. Abbasi, E.; Aval, S.F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H. T.; Joo, S. W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9(1), 1–10.
103. Gupta, V.; Nayak, S.K. *Dendrimers: A review on synthetic approaches. J. Appl. Pharm. Sci.*, 2015, 5(3), 117–122.

104. Satija, J.; Sai, V. V.; Mukherji, S. S. Dendrimers in biosensors: Concept and applications. *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 14367–14386.
105. Huang, D.; Qi, Y.; Bai, X.; Lijuan Shi, L.; Jia, H.; Zhang, D.; Zheng, L. One-Pot Synthesis of Dendritic Gold Nanostructures in Aqueous Solutions of Quaternary Ammonium Cationic Surfactants: Effects of the Head Group and Hydrocarbon Chain Length. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4 (9), 4665–4671.
106. Xu, X.; Jia, J.; Xiurong Yang, X.; Dong, S. A Templateless, Surfactantless, Simple Electrochemical Route to a Dendritic Gold Nanostructure and Its Application to Oxygen Reduction. *Langmuir*, **2010**, 26, 10, 7627–7631.
107. Ye, W.; Yan, J.; Ye, Q.; Zhou, F. Template-free and direct electrochemical deposition of hierarchical dendritic gold microstructures: Growth and their multiple applications. *J. Phys. Chem. C.*, **2010**, 114(37), 15617–15624.
108. Lin, T. H.; Lin, C. W.; Liu, H.H; Sheu, J. T.; Hung, W. H. Potential-controlled electrodeposition of gold dendrites in the presence of cysteine. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 2044–2046.
109. Zumdahl, S. S.; Zumdahl, S. A.; DeCoste, D. J. Chemistry, 10^a Ed. Cengage Learning, **2014**, p. 303.
110. Charlier, J. C.; X. Gonze, X.; Michenaud, J. P. Graphite Interplanar Bonding: Electronic Delocalization and van der Waals Interaction. *Europhys. Lett.*, **1994**, 28(6), 403–408.
111. Kausar, A. Composites of Sulfonated Polystyrene-*block*-Poly (ethylene-ran-butylene)-*block*-Polystyrene and Graphite-Polyoxometalate: Preparation, Thermal and Electrical Conductivity. *Int. J. Mater. Chem.*, **2015**, 5 (4), 85–90.
112. Chung, D. D. L. Review Graphite. *J. Mater. Sci.*, 2002, **37** (8), 1475–1489.
113. Sengupta, R.; Bhattacharya, M.; Bandyopadhyay, S.; Bhowmick, A. K. A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites. *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, 36, 638–670.
114. Petroski, H. *The Pencil: A History of Design and Circumstance*. New York: Alfred A. Knopf, 1990.
115. David, I. G.; Popa, D. E.; Buleandra, M. Pencil graphite electrodes: A versatile tool in electroanalysis. *J. Anal. Methods Chem.*, 2017, 1–22.
116. Graphite grading scales. <http://pencils.com/hb-graphite-grading-scale/>

117. Lovely 16 Illustration Pencil Lead Hardness Chart. <https://www.unimog-international.com>
118. Staedtler Product Information. <https://engineermeetsart.wordpress.com>
119. Kariuki, J.; Ervin, E.; Olafson, C.; Development of a novel, low-cost, disposable wooden pencil graphite electrode for use in the determination of antioxidants and other biological compounds. *Sensors*, **2015**, 15(8), 18887–18900.
120. Morgan, J. L. R.; Lammert, O. M. The Quinhydrone Electrode III. *J. Am. Chem. Soc.*, **1931**, 53(6) 2154–2168.
121. Wang, J.; Kawde, A. N.; Sahlin, E. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst*, **2000**, 125(1), 5–7.
122. Wang, J.; Kawde, A. N. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 431(2), 219–224.
123. Ozsoz, M.; Erdem, A.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Tugrul, B.; Topcuoglu, N.; Ekren, H.; Taylan, M. Electrochemical Genosensor Based on Colloidal Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes, *Anal. Chem.*, **2003**, 75(9), 2181–2187.
124. Chandra, U.; Swamy, B. E. S.; Gilbert, O.; Pandurangachar, M.; Reddy, S.; Shankar, S.; Sherigara, B.S. Poly(amaranth) film based sensor for resolution of dopamine in the presence of uric acid: A voltammetric study. *Chinese Chem. Lett.*, **2010**, 21(12), 1490–1492.
125. Kalachar, H. C. B.; Basavanna, S.; Viswanatha, R.; Naik, Y. A.; Raj, D. A.; Sudha, P. N. Electrochemical determination of l-dopa in mucuna pruriens seeds, leaves and commercial siddha product using gold modified pencil graphite electrode. *Electroanalysis*, **2011**, 23(5), 1107–1115.
126. Izadi, Z.; Sheikh-Zeinoddin, M.; Ensafi, A. A.; Soleimanian-Zad, S. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for Bacillus cereus detection in milk and infant formula. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 80, 582–589.
127. Surucu, O.; Abaci, S. Electrochemical and nonenzymatic glucose biosensor based on MDPA/MWNT/PGE nanocomposite. *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, 78, 539–545.
128. Bandapati, M.; Dwivedi, P. K.; Krishnamurthy, B.; Kim, Y. H.; Kim, G. M.;

- Goel, S. Screening various pencil leads coated with MWCNT and PANI as enzymatic biofuel cell biocathode. *Int. J. Hydrogen Energy*, **2017**, 42(44), 27220–27229.
129. Stradolini, F.; Kilic, T.; Di Consiglio, A.; Ozsoz, M.; De Micheli, G.; Carrara, S. Long-term Monitoring of Propofol and Fouling Effect on Pencil Graphite Electrodes. *Electroanalysis*, **2018**, 30(7), 1363–1369.
130. Torrinha, A.; Amorim, C. G.; M. C. B. S. M. Montenegro, Araújo, A. N. Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, **2018**, 190, 235–247..
131. Narwal, V.; Deswal, R.; Pundir, C. S. Fabrication of an electrochemical H₂O₂ biosensor based on immobilization of hemoglobin nanoparticles onto pencil graphite electrode. *Process Biochem.*, **2018**, 71, 61–68.
132. Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; De Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Rev. Virtual Química*, **2013**, 5(4), 516–537.
133. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8^a Ed. Grassi, M. T., trad.; Pioneira Thomson Learning: São Paulo, **2006**.
134. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 2^a Ed., Wiley, **2001**.
135. Laviron, E. Adsorption autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **1974**, 52, 355– 393.
136. Wang, J. *Analytica Eletrochemistry*, 2^a Ed. New York: Wiley-VCH, **2000**.
137. Drago, R.S. *Physical Methods for Chemists*, 2^a Ed. Surfside Scientifica Publishers, **1977**.
138. Callister Jr., D.; Rethwisch, W.G.; *Ciência e Engenharia de Materiais - Uma Introdução*, 8^a Ed. LTC editora, **2012**.
139. Bragg, W.H.; Bragg, W.L. The Reflexion of X-rays by Crystals. *Proc. R. Soc. Lond. A.*, **1913**, 88(605), 428–438.
140. Farina, M. *Uma Introdução à Microscopia Eletrônica de Transmissão*, Livraria da Física: São Paulo, **2010**.
141. Hau, N. Y.; Yang, P.; Liu, C.; Wang, J.; Lee, P. H.; Feng, S. P. Aminosilane-Assisted Electrodeposition of Gold Nanodendrites and Their Catalytic Properties. *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 39839, 1–10.

142. Trasatti, S.; Petrii, O.A. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl Chem.*, **1991**, 63(5), 711-734.
143. Mita, D.G.; Attanasio, A.; Arduini, F.; Diano, N.; Grano, V.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; Amine, A.; Moscone, D. Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. *Biosens Bioelectron.* **2007**, 23(1), 60–65.
144. Alkasir, R.S.J.; Ganesana, M.; Won, Y.H.; Stanciu, L.; Andreescu, S. Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: A comparative study with applications for the detection of bisphenol A. *Biosens Bioelectron.* **2010**, 26(1), 43–49.