



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Emanuela Grechi Döll

**Biossensor baseado em grafeno e AuNPs estabilizadas em extrato
de *Prunus persica* para detecção de BHA**

Florianópolis

2022

Emanuela Grechi Döll

**Biossensor baseado em grafeno e AuNPs estabilizadas em extrato
de *Prunus persica* para detecção de BHA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profª. Dra. Iolanda Cruz Vieira

Coorientador: Dr. Edson Roberto Santana

Florianópolis

2022

"Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio à fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia"

(Johann Joachim Becher - Physica Subterrânea, 1667).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar e me dar sabedoria. Sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Tristana e Döll, por sempre me apoiarem e me incentivarem nos momentos difíceis.

À professora Dra. Iolanda Cruz Vieira, pela amizade, ensinamentos, confiança, e por acreditar em mim e me ajudar do começo ao fim deste trabalho.

Às duas pessoas que tornaram este trabalho possível: João e Edinho – meus mentores e grandes amigos que quero levar para a vida toda. Serei eternamente grata a vocês!

Aos meus colegas de trabalho do LaBios: Aline, Luan e Vinicius, pela amizade, ensinamentos e momentos alegres.

Aos meus irmãos, Sharon e David que eu tanto amo.

A todos os integrantes da banca, por aceitarem fazer parte da mesma.

À Universidade Federal de Santa Catarina, essencial no meu processo de formação profissional.

E por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Este trabalho descreve a construção de um biossensor para a determinação de 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), baseado em grafeno e nanopartículas de ouro, sintetizadas a partir do extrato vegetal de pêssego (*Prunus persica*). O material resultante foi utilizado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE), dando origem ao biossensor Gr-AuNP-ext/GCE. As nanopartículas de ouro foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia UV-Visível, e os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica. O biossensor forneceu maiores respostas de corrente, e menores resistências a transferência de carga em relação ao GCE sem modificação. Sob as condições otimizadas de trabalho estabelecidas (solução tampão Britton–Robinson 0,1 mol L⁻¹, pH 4,0 e voltametria de pulso diferencial), a curva de calibração apresentou uma faixa linear de 0,2 µmol L⁻¹ a 10,2 µmol L⁻¹, com limite de detecção de 16,6 nmol L⁻¹. Portanto, o biossensor representa uma ferramenta analítica útil para a determinação adequada de BHA, e poderá auxiliar no controle de qualidade de alimentos.

Palavras-chave: Biossensores. Nanopartículas de ouro. Grafeno. BHA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de síntese biológica.....	17
Figura 2. Representação do grafeno como um material de construção 2D para materiais de carbono de todas as outras dimensionalidades. Pode ser embrulhado para formar fulerenos (0D), enrolado para formar nanotubos (1D) ou empilhado para formar grafite (3D).	18
Figura 3. Esquema da estrutura e do princípio operacional de um biossensor.	21
Figura 4. Estrutura química dos principais antioxidantes fenólicos sintéticos empregados em alimentos.	22
Figura 5. Bandas de absorvância UV-vis para (a) extrato puro <i>Prunus persica</i> e (b) AuNPs sintetizadas a partir do extrato de <i>Prunus persica</i>	29
Figura 6. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_4[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em diferentes eletrodos. (B) Gráficos de Nyquist obtidos por EIS usando uma mistura equimolar de $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrodos: (a) GCE, (b) ext/GCE, (c) AuNPs-ext/GCE, (d) Gr-ext/GCE e (e) Gr-AuNPs-ext/GCE.	31
Figura 7. (A) Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre diferentes eletrodos.	32
Figura 8. Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando o eletrodo modificado Gr-AuNP-ext/GCE em solução tampão BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes valores de pH: (A) pH 2,0 a 5 e (B) pH 6,0 a 11,0.	33
Figura 9. (A) Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do eletrodo composto de Gr-AuNP-ext/GCE em solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em diferentes velocidades de varredura: (a)–(i) 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mV s^{-1} . (B) Relação entre $\log I_{pa}$ vs. $\log v$. (C) Relação entre E_{po} vs. $\log v$	35
Figura 10. Esquema de reação para a oxidação do BHA.	36
Figura 11. Voltamogramas para BHA $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o biossensor em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), em velocidade de variação de potencial igual a 50 mV s^{-1} , obtidos com diferentes técnicas eletroanalíticas: DPV, SWV, e LSV.	37
Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA sobre o eletrodo Gr-AuNP-ext/GCE em diferentes concentrações: (a) 0,2; (b) 0,4; (c) 0,8; (d) 1,2; (e) 1,8; (f) 2,2; (g) 2,6; (h) 3,0; (i) 3,4; (j) 3,8; (k) 4,2; (l) 4,6; (m) 5,0; (n) 5,4; (o) 5,8; (p) 6,2; (q) 6,6;	

(r) 7,0; (s) 7,4; (t) 7,8; (u) 8,2; (v) 8,6; (w) 9,0; (x) 9,4; (y) 9,8 e (z) 10,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0)..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de pulso diferencial para a determinação de BHA.....	39
Tabela 2. Parâmetros analíticos obtidos a partir da curva de calibração.....	40
Tabela 3. Comparação geral com outros sensores para a detecção de BHA.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a – coeficiente angular

AgNP – Nanopartículas de prata

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuNP – Nanopartículas de ouro

BHA – 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol

BHT – hidroxitolueno butilado

B-R – Solução tampão Britton-Robinson

CE – eletroforese capilar

CG – Cromatografia gasosa

CV – Voltametria cíclica

DPV – Voltametria de pulso diferencial

E – Potencial

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica

E_{po} – Potencial de pico de oxidação

E_{pulso} – Amplitude de pulso de potencial

EQM – eletrodo quimicamente modificado

GCE (do inglês, *glassy carbon electrode*) – Eletrodo de Carbono Vítreo

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

I – Corrente

I_{pa} – corrente de pico anódica

I_{pc} – corrente de pico catódica

LOD (do inglês, *limit of detection*) – limite de detecção

LOQ (do inglês, *limit of quantification*) – limite de quantificação

LSV – voltametria de varredura linear

PG –propilgalato

R_{ct} (do inglês, *resistance to charge transfer*) – Resistência a transferência de carga

SPAs – antioxidantes fenólicos sintéticos

SWV – Voltametria de onda quadrada

TBHQ – *terc*-butil-hidrquinona

TLC – Cromatografia em camada fina

t_{pulso} – Tempo de duração do pulso

v – Velocidade de varredura de potencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Nanopartículas de ouro	15
2.1.1	Síntese Verde	16
2.2	Grafeno	18
2.3	Eletrodos modificados	19
2.4	Biossensor.....	20
2.5	BHA.....	21
3	Objetivos	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Reagentes e soluções	25
4.2	Instrumentação.....	25
4.3	Parte experimental	26
4.3.1	Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro	26
4.3.2	Construção do biossensor.....	26
4.3.3	Medidas eletroquímicas.....	27
4.4	Segurança no laboratório e tratamento de resíduos	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Caracterização espectroscópica das AuNPs	28
5.2	Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados.....	29
5.3	Comportamento eletroquímico do BHA.....	31
5.4	Estudo do pH	32
5.5	Efeito da velocidade de varredura	34

5.6	Seleção da Técnica Eletroanalítica	36
5.7	Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial	38
5.8	Curva de calibração para o BHA usando o biossensor Gr-AuNP-ext/GCE	39
6	PERSPECTIVAS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes sintéticos têm sido amplamente utilizados nos alimentos processados para prevenir ou retardar a oxidação lipídica. O 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) é um composto fenólico que está entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria alimentícia. Visto que o BHA é suspeito de ser responsável por danos hepáticos e carcinogênese em animais de laboratório, seus potenciais efeitos nocivos à saúde têm sido amplamente discutidos e estudados. Portanto, em vários países, o uso desse aditivo está sujeito a regulamentações, que estabelecem níveis de uso permitidos.

No Brasil, o uso desse antioxidante é regulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que limita a quantidade de 200 mg kg⁻¹. Assim, a determinação de BHA em alimentos é necessária para garantir o cumprimento dos requisitos legais, bem como dos procedimentos de controle de qualidade na indústria alimentícia.

Sendo assim, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas simples, rápidas e reprodutíveis para o monitoramento e controle de qualidade dos teores de BHA em alimentos consumidos pelos brasileiros é de grande relevância. Entre os métodos eletroquímicos existentes para análises de compostos antioxidantes, os biossensores se destacam como uma estratégia analítica extremamente importante, devido ao fato de dispensarem longos e dispendiosos pré-tratamentos das amostras, como ocorre em outras técnicas, além de baixo custo e fácil construção.

Neste campo, os biossensores são dispositivos analíticos que utilizam reações biológicas para a detecção de um determinado analito. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade, seletividade e reatividade desse instrumento, novos materiais vêm sendo empregados na sua construção, possibilitando o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas com excelentes desempenhos.

Dentre os materiais aplicados para melhorar o desempenho, destacam-se os polímeros, surfactantes, nanopartículas metálicas, como de ouro e prata, e materiais nanoestruturados de carbono. As nanopartículas de ouro (AuNPs) possuem propriedades atrativas, como uma elevada razão área superficial/volume, que aumenta a sensibilidade para a detecção de moléculas alvo. Porém, seus métodos de síntese usualmente empregados utilizam agentes redutores e estabilizantes potencialmente tóxicos. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias favoráveis ao meio ambiente para a

obtenção das AuNPs. Uma alternativa é a síntese verde, um método que utiliza extratos de plantas como fonte de agentes redutores e/ou estabilizantes para a síntese de nanopartículas metálicas.

Além das nanopartículas metálicas, os alótropos de carbono, como o grafeno, estão entre os materiais mais discutidos, pesquisados e aplicados nas mais diversas áreas. O grafeno é composto por uma camada bidimensional de átomos de carbono organizados em estruturas hexagonais. Devido à sua característica condutora e elevada área superficial, o uso deste material se estabeleceu como uma alternativa no desenvolvimento de novos sensores para aplicação em eletroquímica e eletroanalítica.

Neste estudo, um extrato de pêsego (*Prunus persica*) foi obtido e utilizado como agente redutor e estabilizante na síntese de AuNPs. Para melhorar o desempenho do sensor proposto, foi adicionado grafeno. O biossensor será utilizado para a determinação de BHA.

Até o momento, não foram encontrados na literatura relatos sobre a síntese de nanopartículas de ouro com extrato de pêsego e seu uso no desenvolvimento de um biossensor com grafeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas são aglomerados de átomos com dimensões entre 10-100 nm, que podem possuir forma esférica, cúbica, tetragonal, octagonal, placa triangular ou barra retangular. Dentre os vários tipos de nanopartículas metálicas existentes, as nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) são as mais estudadas¹.

Em comparação com outras nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro são conhecidas por serem as mais estáveis, possuírem propriedades optoeletrônicas únicas, alta condutividade, além de exibirem excelente biocompatibilidade e elevada relação superfície-volume, podendo essas características ser ajustadas e potencializadas através do controle do seu tamanho e morfologia. Essas propriedades tornam as AuNPs atrativas para o desenvolvimento de novos dispositivos químicos e biológicos, como os sensores eletroquímicos^{2,3,4}.

A abordagem mais comum para a produção de AuNPs é a síntese química, baseada na redução química de um precursor de ouro adequado, normalmente HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico) ou NaAuCl_4 (tetracloroaurato de sódio), por um agente redutor, como o borohidreto de sódio, ou o citrato de sódio⁵. Para evitar a agregação e controlar o tamanho das nanopartículas, também devem ser utilizados agentes estabilizantes, como os surfactantes, líquidos iônicos ou polímeros.

Apesar de ser um método frequentemente usado, a síntese química envolve o uso de produtos químicos que além de ter um valor elevado, também podem ser tóxicos, limitando sua aplicação em biologia e medicina, por exemplo, e tendo um impacto significativo no meio ambiente⁶.

Por essa razão, nos últimos anos, esforços crescentes têm sido feitos para desenvolver processos verdes e ambientalmente sustentáveis para a síntese de nanopartículas de ouro. Algumas estratégias envolvem a síntese de nanopartículas por microrganismos (bactérias, fungos e microalgas) ou extratos vegetais⁷.

A síntese por meio de extratos vegetais tem sido considerada a mais atrativa, devido à sua simplicidade, viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental⁸.

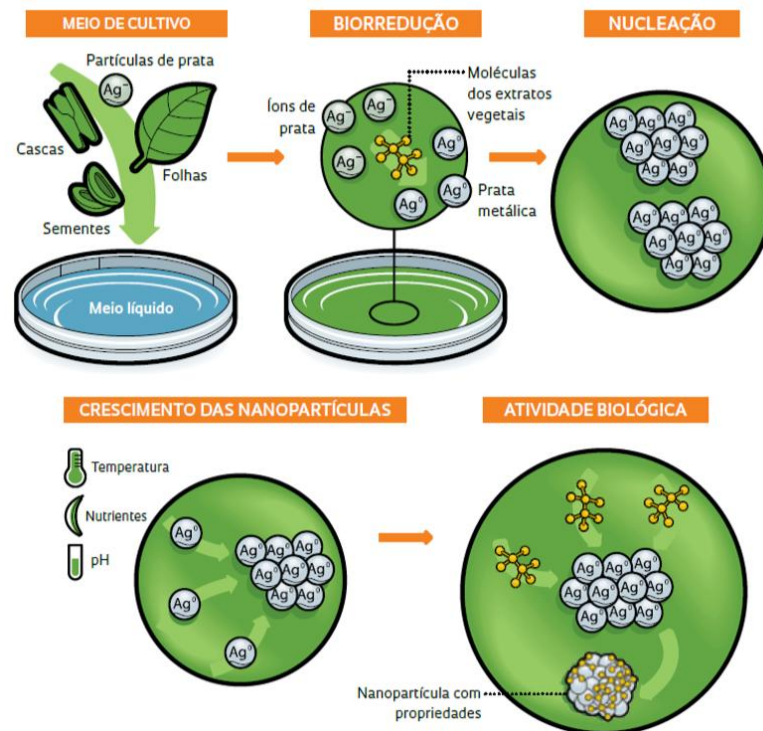
2.1.1 Síntese Verde

Em 2002, JOSE-YACAMAN et al. relataram pela primeira vez a formação de nanopartículas de ouro e prata através de plantas de alfafa⁹. E desde então, diversos grupos alcançaram sucesso na síntese de nanopartículas de Ag, Au e Pd utilizando organismos unicelulares como bactérias¹⁹ e fungos¹¹, bem como extratos de partes de plantas, como folhas de gerânio¹², capim-limão¹³, folhas de neem¹⁴, aloe vera¹², entre outros.

Em extratos vegetais de folhas, frutos, raízes ou sementes, são encontradas muitas substâncias, como as enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, fenóis, taninos, e outros metabólitos. No método de síntese biológica por meio de plantas, esses compostos estão envolvidos na formação de nanopartículas metálicas, onde atuam como agentes redutores, reagindo com os íons do sal metálico para resultar na formação de nanopartículas metálicas. Em algumas situações, os biocompostos presentes nas plantas podem formar uma camada estabilizante em torno das nanopartículas, evitando que se agreguem¹⁵.

A Figura 1 representa a síntese de nanopartículas metálicas (neste exemplo, de prata) através da síntese verde. Nesse esquema, cascas, sementes, frutos e/ou folhas são adicionadas em meio líquido com partículas de prata, e acontece o processo químico de biorredução. Esse processo, mediado por biomoléculas de extratos vegetais, promove a redução dos cátions de prata para prata metálica. Os átomos de prata metálica começam a se agregar formando, assim, as nanopartículas deste elemento. Depois, ocorre a biorredução de outros íons metálicos e novos átomos de prata metálica agregam-se ao núcleo da nanopartícula formada, etapa que pode ser controlada por temperatura, pH e/ou concentração dos reagentes. Parte das moléculas do extrato vegetal se adere à superfície das nanopartículas, formando uma camada estabilizante, na superfície das mesmas, evitando que elas se agreguem ou cresçam demais durante sua produção. Esse processo é semelhante para a síntese verde de todas as nanopartículas metálicas¹⁵.

Figura 1. Processo de síntese biológica.



Fonte: Adaptado de ERENO, 2014²⁴.

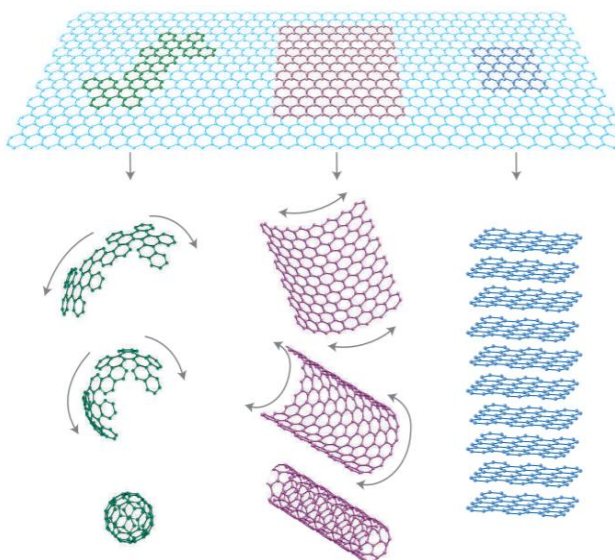
O uso de partes de plantas inteiras na síntese de nanopartículas é uma possibilidade interessante que é relativamente pouco explorada. A síntese verde oferece um avanço em relação ao método físico e químico, pois é econômico, amigável ao meio ambiente, além de dispensar o uso de alta pressão, energia, temperatura e produtos químicos tóxicos.

Dentre os diversos bioredutores possíveis, o extrato de pêssigo (*Prunus persica*) é uma possibilidade a ser explorada. O pêssigo é originário do continente asiático, e é cultivado em muitos países, mas preferencialmente em regiões temperadas, pois requer água em abundância¹⁶. Essa fruta contém grande quantidade de água, açúcar e proteínas, juntamente com vitaminas e minerais. Além de uma série de compostos fenólicos que poderão atuar como agentes redutores na síntese verde, incluindo ácido clorogênico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, rutina e cianidina-3-glicosídeo. A polifenol oxidase (PPO) e a pectinametilesterase (PME) são endoenzimas que também estão presentes nessa fruta, sendo amplamente difundidas em frutas e hortaliças^{17, 18}.

2.2 GRAFENO

O grafeno é um material composto por uma camada bidimensional de átomos de carbono organizados em estruturas hexagonais, e é um bloco de construção básico para materiais grafiticos de todas as outras dimensionalidades (Figura 2)¹⁹. Ele foi descoberto em 2004 por dois cientistas da Universidade de Manchester, trabalho que lhes rendeu o Nobel de Física em 2010, e desde então vem sendo considerado como um dos materiais mais promissores descobertos na última década.

Figura 2. Representação do grafeno como um material de construção 2D para materiais de carbono de todas as outras dimensionalidades. Pode ser embrulhado para formar fulerenos (0D), enrolado para formar nanotubos (1D) ou empilhado para formar grafite (3D).



Fonte: Extraído de GEIM, 2007¹⁹.

As ligações químicas formadas entre os átomos de carbono, além da espessura do grafeno, conferem a ele propriedades interessantes, como uma grande área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), que é maior que a do grafite ($10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e nanotubos de carbono ($1315 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$); alta resistência mecânica (200 vezes maior que aço), alta condutividade elétrica (100 vezes maior que a do cobre), alta elasticidade e condutividade térmica^{20,21}.

Devido à sua forma planar e estrutura química, o grafeno possui diversas vantagens em relação a outros materiais para a construção de sensores eletroquímicos. A espessura atômica

da folha de grafeno e sua elevada razão superfície-volume tornam o sensor modificado com esse material altamente sensível, o que é importante no campo de detecção, uma vez que os átomos de carbono irão interagir com os analitos de interesse, contribuindo assim para a fabricação de sensores eletroquímicos e biossensores aprimorados^{22,23}.

Para aprimorar ainda mais suas características, o grafeno pode ser funcionalizado com nanopartículas, melhorando principalmente sua sensibilidade, limite de detecção e reprodutibilidade, e assim, promovendo uma maior resposta analítica de sensores²⁴. No estudo realizado por LUO et al.²⁵, por exemplo, um sensor eletroquímico baseado em eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de cobre e grafeno foi proposto para a detecção de glicose. A combinação desses nanomateriais proporcionou melhor resposta analítica do que os mesmos sensores sem grafeno, com propriedades eletrocatalíticas muito melhores para a oxidação da glicose quando comparado ao sensor apenas com nanopartículas de cobre, o que é atribuído à grande área superficial, alta condutividade e rápida transferência de elétrons fornecida por folhas de grafeno.

Outra possibilidade se dá pela integração do grafeno com as nanopartículas de ouro. A atividade eletrocatalítica do ouro é comprovadamente potencializada com a adição do grafeno, devido ao efeito sinérgico entre esses dois componentes^{26,27}.

2.3 ELETRODOS MODIFICADOS

O conceito de um eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi concebido inicialmente por Murray et. al. em 1975²⁸. Nessa data, o grupo utilizou o termo para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, e imobilizadas em suas superfícies. Em comparação com outros eletrodos utilizados em eletroquímica, a característica distintiva dos eletrodos quimicamente modificados (EQM) se deve a uma película fina de um produto químico revestindo a superfície do eletrodo base (carbono vítreo, ouro, platina) para concedê-lo propriedades químicas, eletroquímicas, ópticas, elétricas, de transporte, e outras propriedades desejáveis do filme. A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas voltamétricas e amperométricas, além de aplicações como eletrodos íon seletivos²⁹.

A modificação da superfície do eletrodo para aplicação em eletroanálise é uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando a criação de dispositivos com respostas adequadas para diversas aplicações^{29,30}.

Previamente aos primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas, eram utilizados eletrodos de materiais “inertes”, como o carbono, ouro, platina e mercúrio. Esses continuam sendo os materiais utilizados como eletrodo base, cuja superfície será modificada, sendo o carbono vítreo o que mais se destaca, devido à sua boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e robustez. Tais características propiciam a utilização dos eletrodos de GCE como base para modificação e assim, o monitoramento de processos de transferência de carga, suporte para polímeros eletroativos e modificadores de superfície³¹.

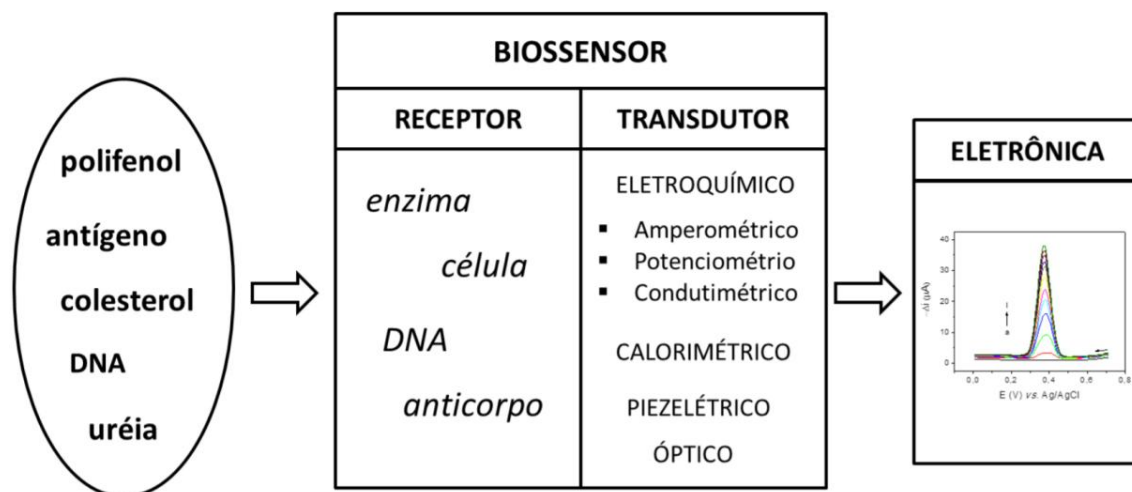
Os materiais responsáveis pela modificação dos eletrodos são, principalmente, polímeros, nanopartículas metálicas, nanocompósitos, nanotubos de carbono e líquidos iônicos. Dentre esses, os materiais nanoestruturados têm se destacado e conquistado interesse, por apresentarem propriedades físicas e químicas únicas³².

2.4 BIOSSENSOR

Um biossensor é um tipo especial de EQM baseado no processo de reconhecimento bioquímico, constituído, essencialmente, do elemento biológico, um transdutor e uma parte eletrônica, como mostra a Figura 3. A superfície do biossensor é modificada pela incorporação de um biocomponente (por exemplo, enzima, antígeno/anticorpo, certos filmes de Langmuir-Blodgett, lipossomas, tecido vegetal ou animal, etc.) que funciona como o quimiorreceptor, tendo a propriedade de reconhecer e interagir com o analito³³.

A interação biossensor-analito resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas, como a modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor e liberação de gases ou íons, que são detectadas e medidas pelo transdutor. O sinal eletrônico é proporcional à concentração de um analito, ou grupo de analitos específicos, que interagem com o elemento biossensível³⁴.

Figura 3. Esquema da estrutura e do princípio operacional de um biossensor.



Fonte: Extraído de BRUGNEROTTO, 2015³⁵.

Desde a descoberta dos biossensores, há 40 anos, as tecnologias envolvidas tiveram um crescimento considerável. Nos últimos anos, principalmente, com o desenvolvimento do campo da nanotecnologia, esse crescimento acelerou de maneira expressiva. Os biossensores baseados em nanomateriais melhoram significativamente a sensibilidade e especificidade da detecção de biomoléculas, têm a capacidade de detectar ou manipular átomos e moléculas e têm grande potencial em aplicações como reconhecimento biomolecular, diagnóstico patogênico e monitoramento ambiental³⁶.

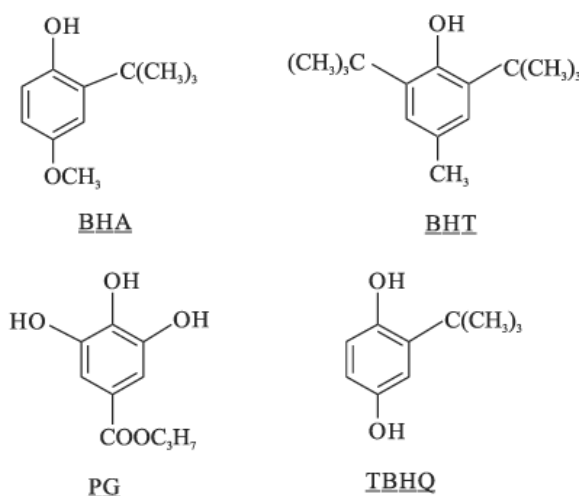
O emprego industrial dos biossensores tende a crescer principalmente nas indústrias químicas e demais setores correlatos, devido ao seu baixo custo e alta eficiência. Na indústria alimentícia, os biossensores têm sido empregados em análises de qualidade dos alimentos, principalmente na detecção de compostos químicos e biológicos, como por exemplo, os antioxidantes³⁷.

2.5 BHA

Os antioxidantes têm sido utilizados pelas indústrias alimentícias há mais de 50 anos, e desempenham um papel importante como aditivos alimentares para prevenir ou retardar a oxidação lipídica. A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para consumo³⁸.

O uso de antioxidantes permite maior vida útil desses produtos, e como os antioxidantes naturais geralmente são de baixa estabilidade, os fabricantes preferem usar antioxidantes fenólicos sintéticos (SPAs), como o hidroxianisol butilado (BHA), propilgalato(PG), terc-butil-hidrquinona (TBHQ), e hidroxitolueno butilado (BHT), apresentados na Figura 4³⁹.

Figura 4. Estrutura química dos principais antioxidantes fenólicos sintéticos empregados em alimentos.



O BHA vendido comercialmente geralmente consiste em dois isômeros: 10% 2-terc-butil-4-hidroxianisol (2-BHA) e 90% 3-terc-butil-4-hidroxianisol (3-BHA). Este antioxidante pode ser adicionado isoladamente ou em combinação com BHT ou TBHQ em óleos e gorduras, temperos e condimentos, alimentação animal, goma de mascar e outros suplementos alimentares⁴⁰.

O uso desses SPAs, no entanto, não é isento de problemas. O BHA e o BHT são responsáveis por danos no fígado e carcinogênese em animais de laboratório. Além disso, estudos recentes observaram a ocorrência de SPAs em humanos (tecidos adiposos, soro, urina, leite materno e unhas)⁴¹.

Assim, o uso de antioxidantes sintéticos em alimentos é estritamente regulamentado pela legislação específica de cada país. No Brasil, a legislação vigente permite a adição de BHA em óleos e gorduras no limite máximo de 200 mg/kg⁴². Assim, a determinação de SPAs em alimentos é necessária para garantir o cumprimento dos requisitos legais, bem como dos procedimentos de controle de qualidade nas indústrias alimentícias.

Atualmente, as análises de compostos antioxidantes são conduzidas principalmente por meio de métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)⁴³, cromatografia em camada fina (TLC)⁴⁴, cromatografia gasosa (GC)⁴⁵ e eletroforese capilar (CE)⁴⁶. Porém, estes métodos exigem tratamentos prévios das amostras (como pré-concentrações, extrações e diluições), além disso, os métodos cromatográficos são muito dispendiosos e requerem longos tempos de execução. Os métodos espectrofotométricos, devido à sua simplicidade, costumavam ser uma técnica analítica popular. Entretanto, esses métodos estão sujeitos a severas interferências da matriz amostral⁴⁷.

No Brasil, os dados sobre os níveis reais de antioxidantes presentes nos alimentos são escassos. Portanto, é de fundamental importância desenvolver um método analítico que seja adequado para a determinação de antioxidantes sintéticos permitidos pela legislação brasileira. Recomenda-se que o método que seja simples, reprodutível e rápido, permitindo que órgãos oficiais fiscalizem e garantam que os alimentos estejam dentro de padrões de qualidade aceitáveis para consumo. Frente a este problema, os sensores eletroquímicos se destacam como uma estratégia analítica importante, tendo em vista o desenvolvimento de dispositivos de baixo custo, fácil construção e que não dispensem longos e dispendiosos pré-tratamentos das amostras.

Alguns trabalhos envolvendo um sensor para quantificação de BHA são descritos na literatura, como por exemplo, um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro para determinação de BHA, BHT e TBHQ. Nesse eletrodo, por meio da LSV, foi observada uma resposta de corrente alta em comparação com o GCE sem modificação⁴⁸. Em outro trabalho, foi construído um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli L-cisteína [poli(LCys/GCE)], para a determinação de BHA em óleos. O eletrodo modificado mostrou boa atividade eletrocatalítica para a oxidação do BHA em condições ótimas e exibiu um limite de detecção baixo⁴⁹.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo geral a construção de um biossensor a base de grafeno e nanopartículas de ouro sintetizadas a partir do extrato vegetal de *Prunus persica*, para detecção de BHA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as nanopartículas de ouro através do extrato vegetal de pêsego;
- Caracterizar as AuNPs usando espectrofotometria UV-Vis;
- Modificar a superfície do eletrodo de carbono vítreo com as nanopartículas de ouro e grafeno;
- Realizar a caracterização destes filmes através de medidas de impedância eletroquímica, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial;
- Otimizar as condições experimentais de trabalho, tais como: pH do eletrólito de suporte, bem como os parâmetros da técnica (voltametria pulso diferencial);
- Criar curva de calibração para determinação do antioxidante BHA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico e adquiridos a partir de fontes comerciais. Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura purificada em sistema Milli-Q. Para a construção do eletrodo foi empregado um eletrodo de carbono vítreo (GCE) obtido da Metrohm, com diâmetro de 2,0 mm. Ácido cloroáurico (Sigma-Aldrich) e grafeno (2DM) foram utilizados para modificação do eletrodo.

Foram utilizadas soluções tampão Britton–Robinson - uma mistura de ácido bórico, ácido fosfórico e ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2,0 a 11). O ajuste do pH destas soluções foi realizado através da adição de hidróxido de sódio ou ácido fosfórico (Vetec), conforme necessário.

A solução estoque de BHA (Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para pesagem de todos os materiais e reagentes foi utilizada a balança analítica Shimadzu AUW220D.

O extrato vegetal foi centrifugado em uma centrífuga modelo Centrifuge5424 R. A análise espectrofotométrica das AuNPs foi realizada em espectrômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, EUA) com cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm).

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro da Micronal modelo B-475 com um eletrodo de vidro combinado. Um banho ultrassônico (Unique 1400A) foi utilizado no preparo das soluções e amostras.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101, conectado ao software de processamento de dados (NOVA 1.8). Para execução das análises utilizou-se uma cela de vidro (capacidade máxima aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de Teflon provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Foi utilizado um sistema de três eletrodos: o eletrodo desenvolvido, no laboratório, como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl

(KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e uma placa de platina (0,5 cm²) como contra-eletrodo.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

Para a síntese das nanopartículas de ouro, foi utilizada uma mistura de uma solução de H₂AuCl₄ 6,0 mmol L⁻¹ com extrato de pêssigo (*Prunus persica*), adquirido no comércio local.

Após descascar o vegetal, pesou-se cerca de 5,0 g, e macerou-se com 20 mL de água ultrapura, e com o auxílio de uma gaze, a fim de obter apenas um extrato translúcido. Posteriormente, o extrato obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por três minutos, a uma temperatura de 25°C, adquirindo assim, uma dispersão límpida.

Após esse procedimento, 1 mL da solução centrifugada e 2,25 mL de água ultrapura foram misturadas em um béquer com agitação de aproximadamente 500 rpm e temperatura ambiente (25°C). Em seguida, 0,25 mL da solução de H₂AuCl₄, foi adicionada, rapidamente, à dispersão, a qual foi mantida sob agitação durante cerca de três minutos, onde atingiu coloração avermelhada, confirmando, desse modo, a formação das nanopartículas de ouro. A caracterização das nanopartículas formadas foi feita por espectroscopia UV-VIS.

4.3.2 Construção do biossensor

Para a construção do biossensor, primeiramente o eletrodo de carbono vítreo (do inglês *glassy carbon electrode* - GCE) foi polido, mecanicamente, em uma suspensão aquosa de alumina (granulometria de 0,05 µm) sobre feltro, fazendo movimentos em forma de oito, durante dois minutos. Para remover os resíduos de alumina, o eletrodo foi lavado com água ultrapura, seco com auxílio de um papel e utilizado na construção do eletrodo proposto.

A dispersão grafeno-nanopartículas de ouro estabilizadas no extrato de pêssigo (Gr-AuNP-ext/GCE) foi realizada adicionando-se 100 µL de AuNP e 0,5 mg de grafeno (Gr). A mistura foi agitada por 1 minuto e colocada no banho de ultrassom até a homogeneização do sistema.

A modificação do eletrodo foi feita pelo método *drop coating* através do gotejamento de uma alíquota de 2 μL da solução anteriormente preparada, com o auxílio de uma micropipeta, sobre a superfície do GCE limpo.

Em seguida, após a secagem do filme em dessecador à vácuo por 15 minutos, o eletrodo foi usado como eletrodo de trabalho.

4.3.3 Medidas eletroquímicas

As medidas utilizando técnicas voltamétricas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C) em uma célula eletroquímica contendo 15,0 mL de eletrólito de suporte (solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4) e um determinado volume do analito BHA, de acordo com cada análise. Os voltamogramas foram registrados após agitação magnética durante sessenta segundos, tempo necessário para a homogeneização da solução na célula. Todas as medidas de potencial foram obtidas vs. Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl).

Os voltamogramas cíclicos foram realizados em intervalo de potencial de $-0,3$ a $+0,8$ V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

As medidas de DPV foram realizadas em intervalo de potencial de $+0,3$ a $+0,7$ V, velocidade de varredura de $10,0$ a 100 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 10 a 120 mV e tempo de duração do pulso de $1,0$ a $30,0 \text{ ms}$, após adições de analito com auxílio de uma micropipeta. Os parâmetros foram otimizados para 60 mV s^{-1} , 100 mV e $5,0 \text{ ms}$.

4.4 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Em todos os experimentos realizados no laboratório, foi imprescindível a utilização de jaleco, calças, sapato fechado, e luvas. Além da utilização da capela, quando era necessária a manipulação de reagentes potencialmente tóxicos.

Os resíduos gerados foram armazenados, primeiramente, no laboratório de pesquisa, em frascos separados e devidamente identificados. Sendo após coletados e devidamente tratados por uma empresa contratada pela universidade.

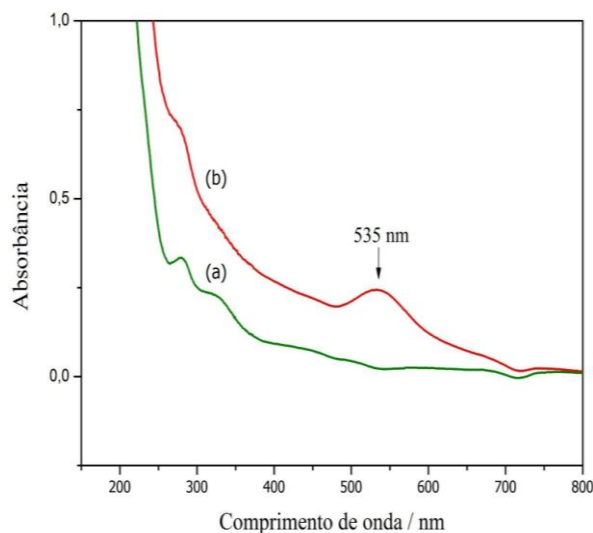
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS AUNPS

Quanto o extrato de pêssego foi misturado com o ácido cloroáurico, a solução começou a ficar com uma coloração avermelhada em 3 minutos, indicando que a reação ocorreu e houve a redução do íon metálico (Au^{3+}) causada pelos compostos bioativos presentes no extrato. Estudos anteriores relataram que o pêssego é rico em compostos fenólicos como ácido clorogênico, catequinas, epicatequinas; e antocianinas; juntamente com uma série de outros compostos, como as enzimas polifenoloxidase, que supostamente estariam envolvidos na biorredução do substrato metálico para AuNPs.

Como é conhecido que as nanopartículas de ouro exibem coloração do vermelho ao violeta, dependendo do tamanho das partículas, a mudança de cor indicou a formação de nanopartículas de ouro, que foi confirmada através do espectro UV-Vis, mostrado na Figura 5. Através do espectro é possível ver que as nanopartículas de ouro preparadas absorvem luz no comprimento de onda de 535 nm, que coincidem com as bandas plasmônicas de superfície características de AuNPs⁵⁰. Além disso, pela literatura sabe-se que com dimensões entre 2 e 40 nm, as nanopartículas de ouro apresentam intensa coloração vermelha. Entretanto, em tamanhos maiores as nanopartículas passam a exibir uma coloração tendendo ao violeta.

Figura 5. Bandas de absorbância UV-vis para (a) extrato puro *Prunus persica* e (b) AuNPs sintetizadas a partir do extrato de *Prunus persica*.



5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS

Todas as etapas de modificação da superfície estudada foram monitoradas por meio das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em um eletrodo recém desenvolvido com a finalidade de avaliar o quão promissor pode ser este novo dispositivo para aplicações eletroanalíticas. O sistema foi o ferri/ferrocianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), o qual apresenta um processo reversível de transferência de elétrons que é controlado por difusão e já é conhecido na literatura⁵¹.

A impedância eletroquímica é uma técnica eficaz para estudar as características elétricas da superfície de eletrodos modificados. A voltametria cíclica é uma das formas mais úteis para obter informações sobre as velocidades e os mecanismos de processos de oxidação e redução, sendo usualmente empregada no estudo de sistemas desconhecidos.

A Figura 6 mostra o perfil voltamétrico (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ diante da superfície de carbono vítreo. A Figura 6A apresenta os voltamogramas cíclicos para os diferentes eletrodos: GCE, ext/GCE, AuNPs-ext/GCE, Gr-ext/GCE e Gr-AuNPs-ext/GCE. As menores intensidades de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) foram obtidas pelo eletrodo sem

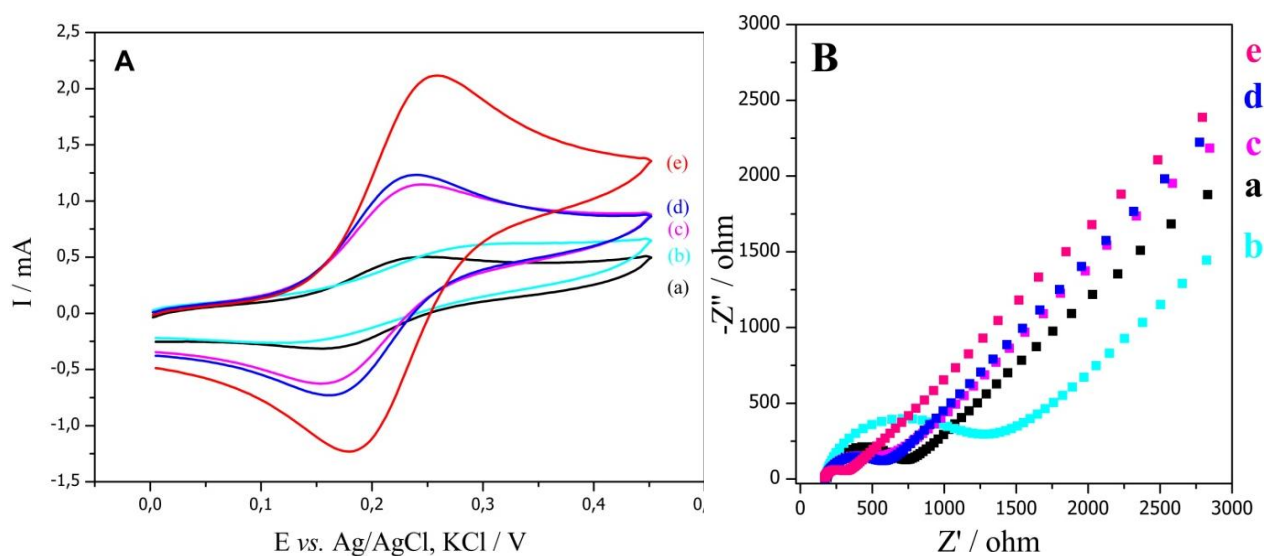
modificação GCE. Usando o eletrodo AuNPs-ext/GCE houve um aumento em ambas as correntes em relação ao GCE. E como pode ser visto, uma maior resposta foi obtida para o biossensor contendo grafeno e AuNPs, o que pode ser atribuído à elevada condutividade de ambos os modificadores, e o efeito quando combinados.

A Figura 6B expõe os gráficos de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para GCE, ext/GCE, AuNPs-ext/GCE, Gr-ext/GCE e Gr-AuNPs-ext/GCE. Por meio deste gráfico é possível extrair a resistência de transferência de carga (R_{ct}). O R_{ct} corresponde ao diâmetro do semicírculo no gráfico.

Após o recobrimento do eletrodo com o extrato vegetal (curva b) a resistência de transferência de carga foi observada por meio do semicírculo obtido, sendo a maior resistência à passagem de corrente registrada neste estudo ($R_{ct} = 1330 \Omega$), ainda maior que o GCE sem modificação ($R_{ct} = 669 \Omega$). Quando o eletrodo foi preparado com AuNPs estabilizadas no extrato vegetal (curva c) houve uma diminuição na resistência de transferência de carga ($R_{ct} = 586 \Omega$), o que também ocorreu quando o eletrodo foi modificado com grafeno e extrato vegetal ($R_{ct} = 515 \Omega$). A diminuição ocorre devido à interface condutiva das AuNPs e também do grafeno. Por fim, a contribuição mais efetiva para a melhoria na transferência de elétrons no sistema foi na presença de grafeno com nanopartículas de ouro estabilizadas em extrato de pêssego (curva e). É possível observar que uma baixa resistência de transferência de carga foi observada para este eletrodo ($R_{ct} = 219 \Omega$), isto demonstra uma grande vantagem da modificação do eletrodo proposto, pois a diminuição da resistência no sistema facilita a transferência de elétrons na superfície do eletrodo e, conseqüentemente, a reação de oxidação do analito de interesse.

Podemos observar que as tendências vistas na voltametria cíclica são reforçadas pelos dados de espectroscopia de impedância eletroquímica. Fornecendo menores resistências a transferência de carga e também maiores intensidades de corrente, o eletrodo modificado com grafeno e AuNPs se apresentara como um dispositivo com uma melhor eletroatividade que o GCE, sendo promissor para aplicações eletroanalíticas.

Figura 6. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_4[Fe(CN)_6]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em diferentes eletrodos. (B) Gráficos de Nyquist obtidos por EIS usando uma mistura equimolar de $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrodos: (a) GCE, (b) ext/GCE, (c) AuNPs-ext/GCE, (d) Gr-ext/GCE e (e) Gr-AuNPs-ext/GCE.



5.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO BHA

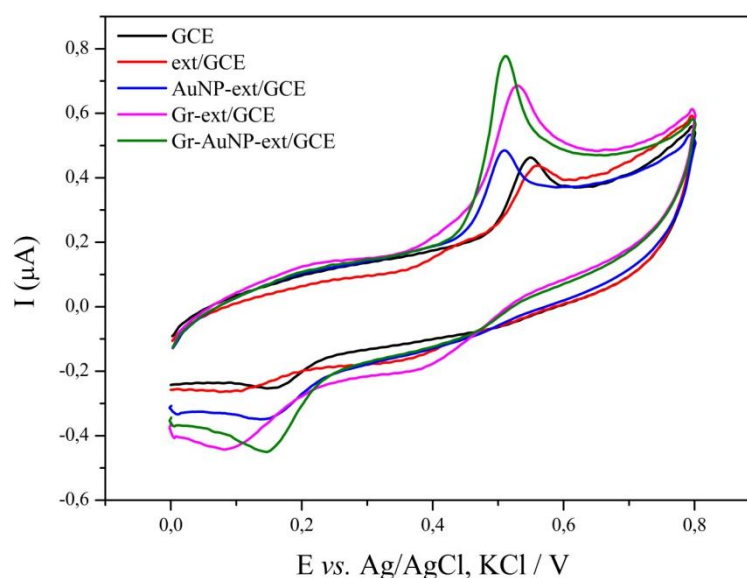
O comportamento eletroquímico do BHA sobre diferentes etapas de modificação do eletrodo foi investigado por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos para o BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre cada um dos eletrodos foi obtido aplicando uma variação de potencial de 0 a $+0,8 \text{ V}$, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, conforme apresenta a Figura 7.

Conforme a Figura 7, os voltamogramas cíclicos para BHA em todos os eletrodos testados apresentam picos de oxidação e redução distantes entre si. A separação entre os picos de oxidação e redução ($\Delta E_p \sim 0,380 \text{ V}$), foi maior do que o valor de $(0,0592/n) \text{ V}$, sendo n o número de elétrons transferidos, que no caso do BHA é $n = 2$. Sendo assim, o comportamento eletroquímico do BHA sobre os eletrodos testados foi considerado irreversível.

Em relação as intensidades de corrente, os menores valores foram obtidos com o GCE sem modificação, com $I_{pa} = 0,180 \mu\text{A}$ e $I_{pc} = -0,061 \mu\text{A}$ ($\Delta E_p = 0,385 \text{ V}$). Com o eletrodo modificado com extrato de pêsego (ext/GCE) houve uma pequena diminuição nas

intensidades de corrente, visto que o extrato não é uma substância condutora e dificultou a reação de transferência de carga ($\Delta E_p = 0,450$ V). Com a inserção das AuNPs no eletrodo (AuNP-ext/GCE), as intensidades de corrente aumentaram na ordem de 1,5 vezes com $\Delta E_p = 0,310$ V, como consequência das propriedades condutoras eletrocatalíticas das AuNPs. O eletrodo contendo apenas o grafeno no extrato de pêssego (Gr-ext/GCE) forneceu o dobro de respostas de corrente em relação ao AuNP-ext/GCE, no entanto, dificultou a transferência de carga ($\Delta E_p = 0,420$ V). Por fim, o eletrodo Gr-AuNP-ext/GCE gerou intensidades de corrente na ordem de 2,5 vezes superior ao GCE sem modificação, como resultado das propriedades condutoras do grafeno e das AuNPs, com $\Delta E_p = 0,320$ V. Sendo assim, o eletrodo Gr-AuNP-ext/GCE foi adotado para os estudos subsequentes visando desenvolver um método eletroanalítico sensível para o monitoramento de BHA.

Figura 7. (A) Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre diferentes eletrodos.



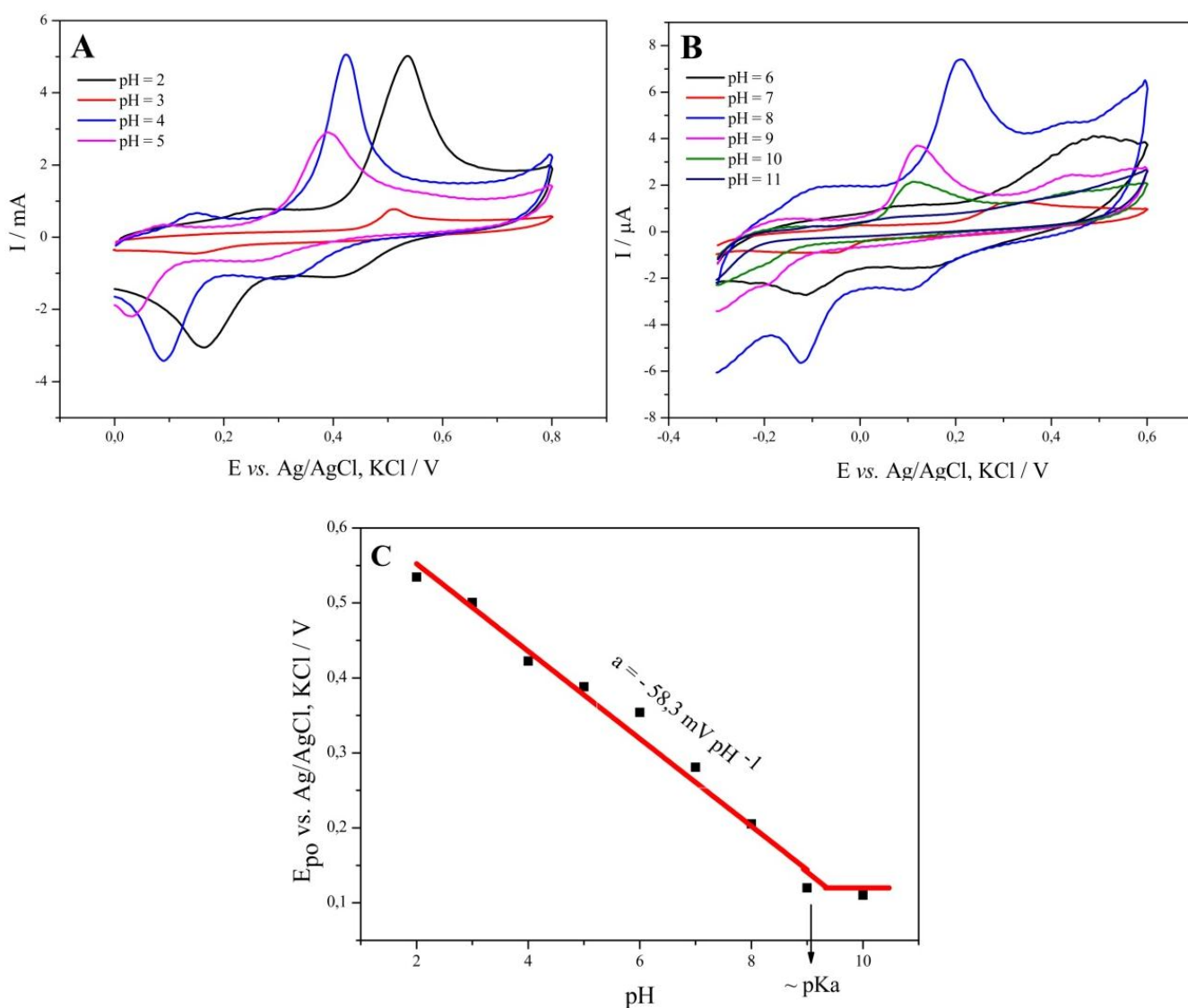
5.4 ESTUDO DO PH

O estudo do pH do eletrólito de suporte é essencial para a sensibilidade dos biossensores, pois a acidez ou basicidade do meio pode afetar a forma como a espécie eletroativa se encontra em solução (protonada ou desprotonada), alterando assim o modo

como o analito irá reagir na superfície do eletrodo, e podendo gerar variações nos valores de corrente e potencial obtido na medida voltamétrica, refletindo negativamente na sensibilidade do método.

O potencial de pico de corrente para o BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 2,0 a 11,0 foi investigado por voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 8.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando o eletrodo modificado Gr-AuNP-ext/GCE em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes valores de pH: (A) pH 2,0 a 5,0 e (B) pH 6,0 a 11,0.



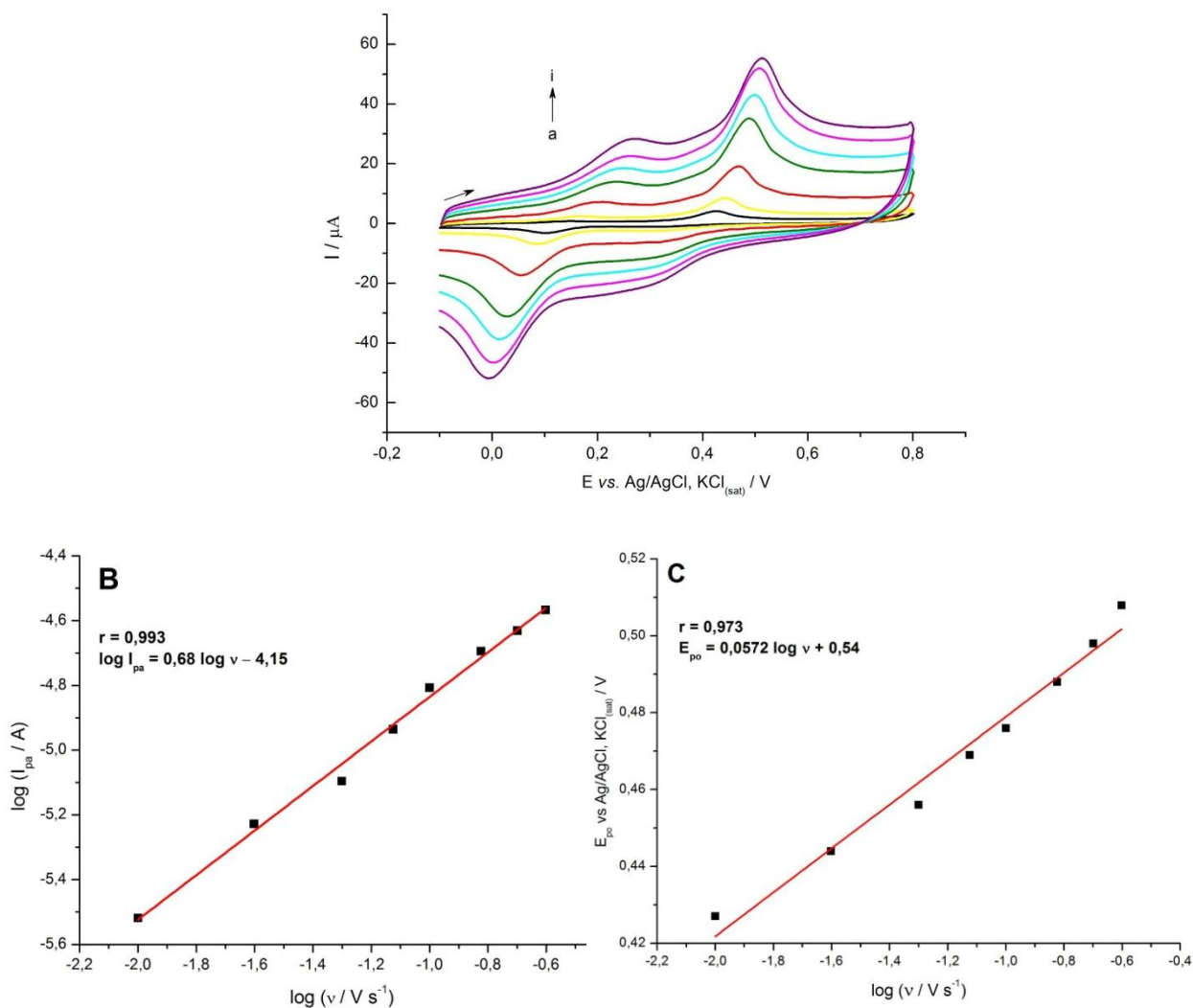
A relação entre o E_{po} e o pH é mostrada na Figura 8C. De acordo com os resultados mostrados, a relação linear tem uma inclinação igual a $-58,3 \text{ mV pH}^{-1}$. Isso indica que o mecanismo de oxidação/redução associado ao BHA é um processo envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons, que está próximo do valor teórico de Nernst ($-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$) para uma reação envolvendo o mesmo número de mols de prótons e elétrons, tal como descrito em diversos estudos relatados na literatura^{48,49}. Outra informação possível de ser extraída da Figura 8C é o valor de pKa a partir da interseção da reta. A interseção ocorre próximo ao pH 9,0; corroborando com o valor teórico de pKa de 8,90, quando o BHA sofre desprotonação⁵².

Pode-se notar o deslocamento do potencial para valores mais negativos conforme aumenta o pH da solução. Este deslocamento favorece a reação redox. A maior intensidade da corrente de pico foi obtida no valor de pH de 4,0. Sendo assim, buscando uma melhor sensibilidade para determinação do analito, adotou-se o pH 4,0 para as análises subsequentes.

5.5 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

A fim de estudar a natureza do processo que ocorre na superfície do eletrodo, voltamogramas cíclicos foram registrados para o biossensor em várias velocidades de varredura ($10\text{-}300 \text{ mV s}^{-1}$). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 9. É observado que à medida que a velocidade de varredura aumenta, a corrente dos picos anódicos e catódicos aumentam. Além disso, os potenciais de pico se deslocam com o aumento da velocidade, e também, a distância entre os picos aumenta, indicando uma irreversibilidade do sistema.

Figura 9. (A) Voltamogramas cíclicos para BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do eletrodo composto de Gr-AuNP-ext/GCE em solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em diferentes velocidades de varredura: (a)–(i) 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mV s^{-1} . (B) Relação entre $\log I_{\text{pa}}$ vs. $\log v$. (C) Relação entre E_{po} vs. $\log v$.



Por meio destes estudos, observou-se que o gráfico (Figura 9B) do logaritmo da corrente de pico anódica ($\log I_{\text{pa}}$) versus o logaritmo da velocidade de varredura de potencial ($\log v$) apresentou comportamento linear, obtendo-se a equação $\log I_{\text{pa}} = 0,68 \log v - 4,15$. Uma maneira de saber se a etapa determinante da reação é a difusão ou a adsorção, é através do gráfico $\log i$ vs. $\log v$. Através da literatura, sabe-se que um coeficiente angular próximo de 0,5 indica que o processo redox é controlado por difusão, mas se for 1,0 o processo é adsorptivo⁵¹. Como o valor do coeficiente angular obtido foi de 0,68, concluiu-se que a etapa limitante da velocidade da reação de oxidação sobre a superfície do eletrodo foi a difusão, com contribuição da adsorção⁵³.

Na Figura 9C é observado que a relação entre o potencial de pico (E_{po}) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) é linear ($E_{po} = 0,0572 \log v + 0,54$). De acordo com a equação de Laviron⁵⁴ para um processo irreversível, a relação entre E_{po} e $\log v$ pode ser expressa como se segue:

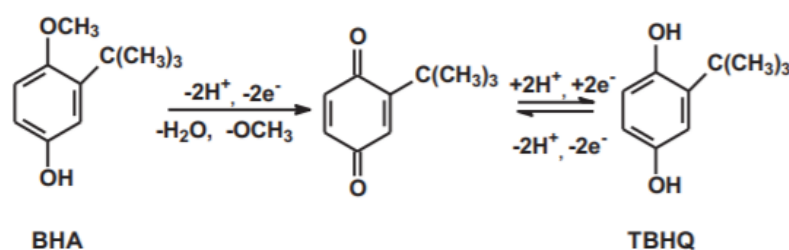
$$E_{po} = E^{\circ} + \left(\frac{2,303RT}{(1-\alpha)zF} \right) \log \left(\frac{RTk^{\circ}}{(1-\alpha)zF} \right) + \left(\frac{2,303RT}{(1-\alpha)zF} \right) \log v$$

Onde: E° é o potencial padrão; k° é a constante de velocidade heterogênea da reação; α é o coeficiente de transferência de elétrons; z é o número de elétrons transferidos no processo; R , T e F são as notações usuais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$).

De acordo com as regressões lineares de E_{po} versus $\log v$, conforme mencionado acima, os coeficientes angulares das equações são equivalentes a $2,303RT/(1-\alpha)zF$. Comumente, atribui-se a α o valor de 0,5 para processos irreversíveis.

Deste modo, calculou-se o número de elétrons envolvidos (z) na oxidação do BHA, e este valor foi igual a 2. Os resultados obtidos na Seção 5.3 mostraram que o mesmo número de mols de prótons e elétrons foram envolvidos na reação de oxidação do BHA. Portanto, pode-se afirmar que as reações envolveram dois prótons e dois elétrons, como é observado na reação da Figura 10. Essa proposta de reação corrobora com a literatura⁶³.

Figura 10. Esquema de reação para a oxidação do BHA.



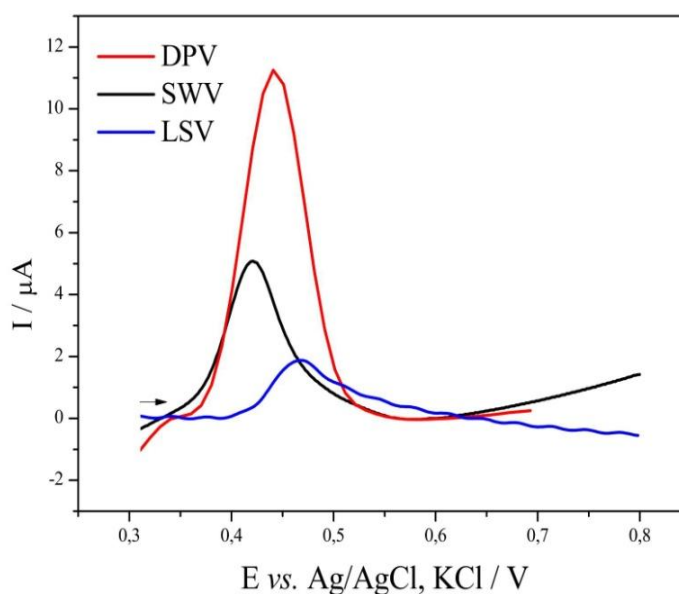
Fonte: Adaptado de Fatibello-Filho, 2010⁵⁵.

5.6 SELEÇÃO DA TÉCNICA ELETROANALÍTICA

A fim de desenvolver um método sensível para a quantificação de BHA, foram investigadas três diferentes técnicas eletroanalíticas e a magnitude do sinal analítico fornecido por elas. Avaliou-se a desempenho da voltametria de varredura linear (LSV), pulso diferencial

(DPV) e onda quadrada (SWV). Os parâmetros de cada técnica foram ajustados de modo a se obter a mesma velocidade de varredura de potencial para as medidas. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos utilizando as três técnicas voltamétricas.

Figura 11. Voltamogramas para BHA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o biossensor em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), em velocidade de variação de potencial igual a 50 mV s^{-1} , obtidos com diferentes técnicas eletroanalíticas: DPV, SWV e LSV.



Por meio dos voltamogramas, é possível perceber que a técnica de pulso diferencial apresentou a maior resposta de corrente para o analito.

Na DPV, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. A primeira corrente é subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O objetivo de se fazer duas medidas da corrente e trabalhar com a diferença entre elas é a supressão da corrente capacitiva. Dessa forma, desvinculando o valor da primeira leitura de corrente da segunda, obtém-se uma minimização da contribuição da corrente capacitiva, o que não ocorre na LSV, por exemplo. Em relação a SWV, a DPV apresenta maior eficiência quando operada em velocidades mais baixas, o que possibilita acompanhar melhor reações de cinética lenta.

Portanto, a voltametria de pulso diferencial foi escolhida para estudos posteriores, por ser uma técnica eficaz e com vantagens bem estabelecidas, incluindo baixa da contribuição da corrente de fundo, e baixos limites de detecção.

5.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

Para a otimização da técnica de voltametria de pulso diferencial escolhida, alguns parâmetros instrumentais como a velocidade de varredura de potencial (v), amplitude de pulso de potencial (E_{pulso}) e tempo de duração do pulso (t_{pulso}) foram avaliados, a fim de observar os efeitos destes parâmetros sobre a resposta de pico da corrente, e para se obter as melhores condições experimentais para o biossensor proposto.

A velocidade de varredura de potencial foi variada de 10,0 a 100 mV s^{-1} , enquanto manteve-se fixo os outros parâmetros em $E_{\text{pulso}} = 50,0 \text{ mV}$ e $t_{\text{pulso}} = 10,0 \text{ ms}$. A maior intensidade de corrente foi obtida na velocidade de 60 mV s^{-1} . Portanto, neste valor, a velocidade de varredura consegue acompanhar a cinética da reação, e assim, é possível fazer um registro sensível de todo o processo. Outro parâmetro avaliado foi o t_{pulso} , com valores variando na faixa de 1,0 a 30,0 ms, e mantendo-se fixo a $E_{\text{pulso}} = 50,0 \text{ mV}$ e $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$. Selecionou-se o tempo de 5,0 ms, pois a maior corrente de resposta para o BHA ocorreu nesse valor. A amplitude de pulso foi investigada em uma faixa de 10 a 120 mV, fixando-se a $t_{\text{pulso}} = 5,0 \text{ ms}$, e $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$. A amplitude escolhida foi de 100 mV, pois houve um crescimento linear da intensidade da corrente de pico até este ponto, mantendo-se constante em valores maiores.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de pulso diferencial estudados, a faixa analisada e os valores selecionados para a determinação de BHA.

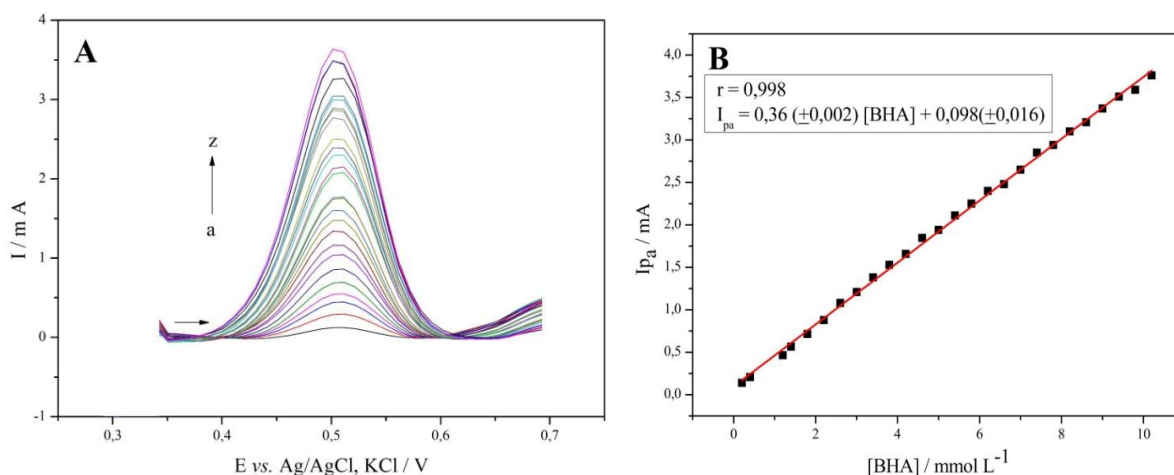
Tabela 1. Otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de pulso diferencial para a determinação de BHA.

Parâmetro da técnica	Faixa avaliada	Valor selecionado
Velocidade (mV s^{-1})	10,0 - 100	60,0
Tempo de duração do pulso (ms)	1,0 - 30,0	5,0
Amplitude do pulso (mV)	10,0 - 120,0	100,0

5.8 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O BHA USANDO O BIOSSENSOR GR-AUNP-EXT/GCE

Construiu-se a curva de calibração para o BHA utilizando as condições experimentais otimizadas. Os voltamogramas de pulso diferencial são mostrados na Figura 12A. Foi registrado um pico definido em +0,50 V, que corresponde a oxidação do BHA. Observou-se que as intensidades de corrente aumentaram proporcionalmente com o aumento da concentração do analito no intervalo de 0,2 a 10,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A regressão linear (Figura 12B) pode ser expressa de acordo com: $I_{\text{pa}} = 0,36 (\pm 0,002) [\text{BHA}] + 0,098 (\pm 0,016)$, onde I_{pa} é igual a corrente de pico anódico em μA , e $[\text{BHA}]$ é a concentração de hidroxianisol butilado em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA sobre o eletrodo Gr-AuNP-ext/GCE em diferentes concentrações: (a) 0,2; (b) 0,4; (c) 0,8; (d) 1,2; (e) 1,4; (f) 1,8; (g) 2,2; (h) 2,6; (i) 3,0; (j) 3,4; (k) 3,8; (l) 4,2; (m) 4,6; (n) 5,0; (o) 5,4; (p) 5,8; (q) 6,2; (r) 6,6; (s) 7,0; (t) 7,4; (u) 7,8; (v) 8,2; (w) 8,6; (x) 9,0; (y) 9,4; (z) 9,8 e (z) 10,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão



BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

A partir dos dados obtidos nas análises e da curva analítica para o analito, calculou-se os parâmetros de validação (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros analíticos obtidos a partir da curva de calibração.

Parâmetros analíticos	BHA
Potencial de pico (V)	0,5
Faixa linear (μmol L ⁻¹)	0,2 - 10,2
Coefficiente de correlação - r	0,998
Coefficiente angular (μA L μmol ⁻¹)	0,36
Desvio padrão do coeficiente angular	0,002
Coefficiente linear (μA)	0,098
Desvio padrão do coeficiente linear	0,016
LOD (nmol L ⁻¹)	16,6
LOQ (nmol L ⁻¹)	55,5

Conforme mostrado na Tabela 3, o biossensor proposto exibiu um limite de detecção inferior a outros trabalhos encontrados na literatura. Sendo assim, este biossensor mostrou-se promissor, podendo ser aplicado na determinação de BHA em amostras de alimentos como um controle de qualidade.

Tabela 3. Comparação geral com outros sensores para a detecção de BHA.

Sensor	Técnica	pH	LOD / nmol L ⁻¹	Referência
SPE–MWCNT ^a	LSV	Tampão BR (pH 2,0)	176	56
MCCE–Cu ₃ (PO ₄) ₂ -Poly ^b	SWV	KNO ₃ /10% etanol (v/v) (pH 6,7)	72	57
AuNPs/GCE	LSV	Tampão BR (pH 2,0)	39	58
Gr/Ch/GCE ^c	DPV	Tampão PBS (3,0)	190	48
CoHCF-grafite ^d	Amperometria	Tampão PBS (pH 7.0)	190	58
Gr-AuNP-ext/GCE	DPV	Tampão BR (pH 4,0)	16,6	Este trabalho

^aEletrodo impresso em tela modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

^bEletrodo compósito de carbono modificado com fosfato de cobre (II) imobilizado em poliéster. ^cCarbono vítreo modificado com monocamada de colina e grafeno. ^dEletrodo compósito de grafite e parafina modificado com hexacianoferrato de cobalto.

6 PERSPECTIVAS

O presente estudo mostrou uma rota simples, rápida e econômica para sintetizar nanopartículas de ouro utilizando extrato de *Prunus persica*, que permitiu o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de AuNPs e grafeno para a determinação de BHA. A integração do grafeno com as nanopartículas de ouro melhorou a resposta de corrente para do biossensor para a determinação de BHA.

Os resultados deste estudo indicam que o pêssego pode ser efetivamente utilizado como fonte de agentes redutores e estabilizantes para a síntese de AuNPs estáveis. No entanto, como todos os vegetais, sua composição pode mudar conforme o fruto e o estágio de desenvolvimento. Portanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar até que ponto essas mudanças podem afetar as características das nanopartículas resultantes.

Através dos estudos de voltametria cíclica, concluiu-se que o processo de oxidação do BHA é caracterizado como de difusão, irreversível e é acompanhado por uma troca de dois elétrons e dois prótons.

Bons resultados foram alcançados pelo uso da técnica DPV. O biossensor apresentou características analíticas favoráveis sob as condições ótimas de trabalho estabelecidas (tampão Britton–Robinson 0,1 mol L⁻¹, pH 4,0) incluindo boa faixa linear (0,2 μmol L⁻¹ a 10,2 μmol L⁻¹), limite de detecção 16,6 nmol L⁻¹ e aplicabilidade na determinação de BHA.

Pode-se destacar que o biossensor proposto exibiu alta sensibilidade, e além disso, o baixo custo, simplicidade e rapidez para a construção e aplicação dos biossensores, tornam esse método vantajoso em relação a outras técnicas utilizadas para a determinação de BHA.

REFERÊNCIAS

- ¹ FARAMARZI, M. A.; SADIGHI, A. Insights into Biogenic and Chemical Production of Inorganic Nanomaterials and Nanostructures. **Adv. Colloid Interface Sci.**, vol. 189–190, 1–20, 2013.
- ² SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chem Rev**, 112, 2739–2779, 2012.
- ³ DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, 104, 293-346, 2004.
- ⁴ Haick, H. J. Chemical sensors based on molecularly modified metallic nanoparticles. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, 40, 7173, 2007.
- ⁵ SOUZA, C. D.; NOGUEIRA, B. R.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, Volume 798, 2019.
- ⁶ NADEEM, M.; ABBASI, B.H.; YOUNAS M.; AHMAD, W.; KHAN, T. A review of the green syntheses and antimicrobial applications of gold nanoparticles, **Green Chemistry Letters and Reviews**, 10, 216–227, 2017.
- ⁷ BHATTARAI, B.; ZAKER, Y.; BIGIONI, T.P., Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Challenges and opportunities, **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 12, 91–100, 2018.
- ⁸ NORUZI, M., Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 38, 1–14, 2015.
- ⁹ GARDEA-TORRESDEY, J.L.; PARSONS, J.G.; GOMEZ, E.; PERALTA-VIDEA, J.R.; TROIANI, H.E.; SANTIAGO, P.; YACAMAN, M. J. Formation of Au nanoparticle inside live alfalfa plants. **Nano Lett.** 2, 397–401, 2002a.
- ¹⁰ PETIT, C.; LIXON, P.; PILENI, M.P. In situ synthesis of silver nanocluster in AOT reverse micelles, **J. Phys. Chem**, 97, 12974–12983, 1993.
- ¹¹ MALLICK, K.; WITCOMBB, M. J.; SCURRELLA, M.S. Self-assembly of silver nanoparticles in a polymer solvent: formation of a nanochain through nanoscale soldering, **Mater. Chem. Phys**, 90, 221–224, 2005.
- ¹² A.B. Smetana, K.J. Klabunde, C.M. Sorensen, Synthesis of spherical silver nanoparticles by digestive ripening, stabilization with various agents, and their 3-D and 2-D superlattice formation, **J. Colloid Interf. Sci.** 284 (2005) 521–526.

- ¹³ RAVINDRAN, T.R.; ARORA, A.K.; BALAMURAGAN, B.; MEHTA, B.R. Inhomogeneous broadening in the photoluminescence spectrum of CdS nanoparticles. **Nanostruct Mater**, 11, 603–609, 1999.
- ¹⁴ PATTABI, M.; UCHIL, J. Synthesis of cadmium sulphide nanoparticles. **Solar Energ. Mater. Solar Cell**, 63, 309–314, 2000.
- ¹⁵ ERENO, Dinorah. Nanopartículas Verdes. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, p. 70-74, setembro, 2014.
- ¹⁶ SCORZA, R. Peach and Apricot. **Processing Fruits: Science and Technology**, 2nd ed.; CRC Press: New York, 481– 483, 2005.
- ¹⁷ JAYANTA, K. P.; KWANG-HYUN, B. Green synthesis of silver chloride nanoparticles using *Prunus persica* L. outer peel extract and investigation of antibacterial, anticandidal, antioxidant potential. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 132-142, 2016.
- ¹⁸ ZHAO, X.; ZHANG, W.; YIN, X.; SU, M.; SUN, C.; LI, X.; Chen, K. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Different Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] Cultivars in China. **Int. J. Mol. Sci**, 16, 5762–5778, 2015.
- ¹⁹ HUANG, X.; YIN, Z.; WU, S. ; QI, X.; HE, Q.; ZHANG, Q.; YAN, Q.; BOEY, F.; ZHANG, H. Graphene-based materials: synthesis, characterization, properties, and applications, **Small**, 7 1876e1902, 2011.
- ¹⁹ GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S.; The rise of graphene. **Nature materials**, 6, 183-191, 2007.
- ²⁰ BOLLELLA, P.; FUSCO, G.; TORTOLINI, C.; SANZO, G.; FAVERO, G.; GORTON, L. ; ANTIOCHIA, R. Beyond graphene: electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosens. Bioelectron**, 89, 152e166, 2017.
- ²¹ BAHADIR, E.B.; SEZGINTÜRK, M.K. Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing. **Trends Anal. Chem.** 76, 1e14, 2015.
- ²² HE, Q.; WU, S.; YIN, Z.; ZHANG, N. Graphene-based electronic sensors. **Chem. Sci**, 3 1764e1772, 2012.
- ²³ PUMERA, M.; AMBROSI, A.; BONANNI, A.; CHING, E.L.K.; POH, H.L. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **Trends Anal. Chem**, 29, 954e965, 2010.
- ²⁴ WU, L.D. et al. Chen, Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. **Biosens. Bioelectron**, 35, 193e199, 2012.
- ²⁵ LUO, J. S. et al. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode, **Anal. Chim. Acta**, 709, 47e53, 2012.

- ²⁶ SONG, M.; YU, L.; WU, Y. Simple synthesis and enhanced performance of graphene oxide-gold composites,” *Journal of Nanomaterials*, 135138, 2012. _
- ²⁷ GUO, W.; WU, L.; FAN, K. et al. Reduced graphene oxide-gold nanoparticle nanoframework as a highly selective separation material for aflatoxins. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, article 14484, 2017.
- ²⁸ MOSES, P. R.; WIER, P; MURRAY, R. W.; Chemically Modified Tin Oxide Electrode. *Anal. Chem.*, v. 47, n. 12, 1975.
- ²⁹ SOUZA, Maria de Fátima Brito. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Química Nova*. 1997, v. 20, n. 2, p. 191-195.
- ³⁰ CARVALHO, Sâmea E. Q. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com Hexacianoferratos dos metais Fe, Ni e Co**. Orientador: Luiz Henrique Mazo (mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.
- ³¹ MALEKI, H; COJOCARU, C.D.; BRETT; C. M. A; JENKING, G. M.; SELMAN, J. R. Changes in the electrochemical behavior of polymeric carbon induced by heat- treatment and doping with lithium ions. *J. Electroch. Soc.* New Jersey, v. 145. n. 3, 1998.
- ³² MORILLO, Ana Cristina V. **Eletrodo quimicamente modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em heparina aplicado na determinação de ácido clorogênico**. Orientadora: Iolanda da Cruz Vieira. (Graduação) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- ³³ DURST, R. A. et al. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 69, No. 6, pp. 1317-1323, 1997.
- ³⁴ FURTADO, Roselayne Ferro; et al. Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. *Embrapa Agroindústria Tropical*, Fortaleza, Novembro, 2008.
- ³⁵ BRUGNEROTTO, Patricia. **Biossensor à base de nanopartículas de ouro estabilizadas em ciclodextrina e imobilizadas com lacase para determinação de rutina**. Orientador: Iolanda da Cruz Vieira. (Graduação) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- ³⁶ ZHANG, XUEQING et al. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors (Basel)*, vol. 9, fevereiro, 2009.
- ³⁷ OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar - Revisão. *Rev. Virtual Quim.* 2016.
- ³⁸ MCCARTHY, T. L., KERRY, J. P., KERRY, J. F., LYNCH, P. B., BUCKLEY, D. J. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, 57, 45–52, 2001.

- ³⁹ FORMANEK, Z., KERRY, J. P., HIGGINS, F. M., BUCKLEY, D. J., MORRISSEY, P. A., & FARKAS, J. Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. **Meat Science**, 58, 337–341, 2001.
- ⁴⁰ Nieva-Echevarría, B.; Manzanos, M. J.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D., 2,6-Di-tert-butylhydroxytoluene and its metabolites in foods. **Compr. Rev. Food. Sci. F.** 2015.
- ⁴¹ LIU, R., & MABURY, S. A. Synthetic Phenolic Antioxidants: A Review of Environmental Occurrence, Fate, Human Exposure, and Toxicity. **Environmental Science & Technology**, 2020.
- ⁴² Brasil. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 Aprova "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas", acesso em fev. 2022.
- ⁴³ KAROVICOVA, J.; SIMKO, P. Review: determination of synthetic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 882, 271–281, 2020.
- ⁴⁴ RAGAZZI, E., & VERONESE, G. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatography separation. **Journal of Chromatography**, 77, 369–375, 1973.
- ⁴⁵ GONZALEZ, M., GALLEGO, M., & VALCÁRCEL, M. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods. **Journal of Chromatography A**, 848, 529–536, 1999.
- ⁴⁶ BOYCE, M. C.; SPICKETT, E. E. Separation of food grade antioxidants (synthetic and natural) using mixed micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 1970–1975, 1999.
- ⁴⁷ KHALID, W.E.F.; ARIP, M.N.M.; JASMANI, L.; LEE, Y.H. A new sensor for methyl paraben using an electrode made of a cellulose nanocrystal–reduced graphene oxide nanocomposite. **Sensors**, 19, 2726, 2019.
- ⁴⁸ LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S. Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, 54-56, 2013.
- ⁴⁹ THOMAS, D. et al. Study of kinetic parameters and development of a voltammetric sensor for the determination of butylated hydroxyanisole (BHA) in oil samples. **J Food Sci Technol**, 52, 6719–6726, 2015.
- ⁵⁰ HUANG, X.; MOSTAFA, A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, 13-28, 2090-1232, 2010.

- ⁵¹ SHIH, Y.; ZEN, J.M.; KUMAR, A.S.; CHEN, P.Y. Flow injection analysis of zinc pyrrhione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, 62, 912–917, 2004.
- ⁵² WANG, Y.; LI, X.; SUN, X. The transformation mechanism and eco-toxicity evaluation of butylated hydroxyanisole in environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 113179, 0147-6513, 2022.
- ⁵³ BARD, A.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001.
- ⁵⁴ LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 101, 19–28, 1979.
- ⁵⁵ Medeiros, R.A.; Rocha-Filho, R.C.; Fatibello-Filho, O.. **Food Chem.** 123 (2010) 886–891.
- ⁵⁶ CARAMIT, R. P.. et al. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Fuel**, 306-313, 0016-2361, 2013.
- ⁵⁷ FREITAS, K. H. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin. **Talanta**, 1102-1108, ISSN 0039-9140, 2010.
- ⁵⁸ WANG, P. et al. Electrochemical determination of tert-butylhydroquinone and butylated hydroxyanisole at choline functionalized film supported graphene interface. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 885-891, ISSN 0925-4005, 2016.
- ⁵⁹ PRABAKAR, S.J.R., NARAYANAN, S.S. Surface modification of amine-functionalised graphite for preparation of cobalt hexacyanoferrate (CoHCF)-modified electrode: an amperometric sensor for determination of butylated hydroxyanisole (BHA). **Anal Bioanal Chem** 386, 2107–2115, 2006.

Emanuela Grechi Döll

Edson Roberto Santana
(Coorientador)

Iolanda Cruz Vieira
(Orientadora)