



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



TESE DE DOUTORADO

***UTILIZAÇÃO DA MONTMORILONITA NA CONSTRUÇÃO DE
SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM
ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE CLORPIRIFÓS***

CAROLINE POLINI LUPI

**ARARAQUARA
2019**

CAROLINE POLINI LUPI

***UTILIZAÇÃO DA MONTMORILONITA NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES
ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE
CLORPIRIFÓS***

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Fertonani

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira

**Araraquara
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

L965u Lupi, Caroline Polini
Utilização da montmorilonita na construção de sensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterase para detecção de clorpirifós / Caroline Polini Lupi. – Araraquara : [s.n.], 2019
98 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Fernando Luis Fertoni
Coorientador: Antonio Aparecido Pupim Ferreira

1. Montmorilonita. 2. Inibidores de colinesterase. 3. Análise térmica. 4. Compostos organofosforados. 5. Espectroscopia de impedância. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Utilização da monomorfonita na construção de sensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterase para detecção de dopamina"

AUTORA: CAROLINE POLINI LUPI

ORIENTADOR: FERNANDO LUIS FERTONANI

COORIENTADOR: ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO LUIS FERTONANI

Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. MARIA APARECIDA ZAGHETE BERTOCHI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. HIDEKO YAMANAKA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. WENDEL ANDRADE ALVES

Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Prof. Dr. MARYSTELA FERREIRA

Departamento de Física, Química e Matemática / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba

Araraquara, 29 de janeiro de 2019

DEDICATÓRIA

*À minha família, base de tudo, que me dá forças todos os dias para seguir sonhando e lutando: ao meu esposo **Juliano**, por me apoiar e estar sempre ao meu lado; às minhas filhas, **Lavínia** e **Manuela**, razão do meu viver; aos meus pais, **Domingos** e **Olinda**, por todo amor e incentivo.*

“Há duas formas para viver a sua vida. Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem o qual nada sou, por me dar forças e colocar pessoas tão especiais em meu caminho.

Ao meu esposo Juliano por todo amor, amizade, companheirismo, incentivo, por me ajudar a tornar sonhos em realidades. Essa vitória também é sua!

Às minhas filhas, Lavínia e Manuela, que ressignificaram minha existência, dando novo sentido aos meus dias.

Aos meus pais, Domingos e Olinda, pelo amor, carinho, por acreditarem, me apoiarem, não medindo esforços para me ajudarem a alcançar meus sonhos.

À toda minha família, pelo amor e respeito.

Ao Professor Dr. Fernando Luis Fertonani pela atenção, disponibilidade, dedicação e orientação, de maneira tão amigável e carinhosa durante esses anos, proporcionando-me crescimento intelectual, e, acima de tudo, pessoal.

Ao Professor Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira pela co-orientação e amizade, por todo o ensinamento proporcionado ao longo dos anos, por ser exemplo de profissional e de ser humano.

À Profa. Dra. Hideko Yamanaka que acompanhou meu projeto, sempre disposta a discutir e contribuir com o desenvolvimento do trabalho, bem como forneceu toda infraestrutura para o desenvolvimento do mesmo.

Ao Prof. Dr. Assis Vicente Bendetti e à Profa. Dra. Hideko Yamanaka pelas valiosas sugestões dadas no exame geral de qualificação.

Aos integrantes do GEAr, por toda a ajuda e disponibilidade durante o período de desenvolvimento desse trabalho: Marcos, Juliana, Rafael, Mariele e Bárbara.

Aos colegas do Laboratório de Fotoquímica, IBILCE – São José do Rio Preto, pelas contribuições na realização das análises térmicas: Bruno e Filipe.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!

RESUMO

A produção agrícola tem recebido inquestionáveis benefícios devido ao uso de pesticidas, entretanto, essas substâncias podem causar sérios danos aos organismos vivos, devido sua toxicidade, baixa biodegradabilidade e alto potencial carcinogênico. Dessa forma, a determinação de pesticidas, em nível de traços, se faz de extrema importância, sendo necessário encontrar abordagens analíticas simples e efetivas para seu monitoramento. Nesse sentido, diversos tipos de biossensores enzimáticos, têm sido investigados e fundamentados na inibição de acetilcolinesterase, enzima envolvida na transmissão dos impulsos nervosos. Os pesticidas das classes dos organofosforados interagem com essa classe de enzimas, inativando-as e provocando intoxicações agudas, podendo levar, como consequência, à morte do indivíduo. A montmorilonita é um argilomineral do grupo das esmectitas, que possui excelentes propriedades de intercalação e inchamento, alto potencial de adsorção e elevada afinidade com diversas substâncias orgânicas e inorgânicas. Essas características as constituem como um adequado meio de imobilização de moléculas orgânicas/inorgânicas e biológicas, tais como enzimas e nanopartículas metálicas. Recentemente, eletrodos modificados com montmorilonita têm atraído considerável atenção na área de eletroanalítica/eletroquímica, revelando como propriedades: alta sensibilidade, boa seletividade, custo relativamente baixo, resposta rápida e possibilidade de miniaturização, dentre outras vantagens. Nesse sentido, este trabalho buscou evidenciar a possibilidade de modificação da montmorilonita com três sequências peptídicas sintéticas, propostas por modelagem molecular, que mimetizam o sítio ativo da acetilcolinesterase, e a aplicação dessa argila modificada na construção de sensores, utilizados na detecção eletroquímica, por espectroscopia de impedância eletroquímica, de clorpirifós, pesticida da classe dos organofosforados. As sequências peptídicas utilizadas foram ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$); ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$); ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$). Essas sequências biomiméticas, que já haviam sido propostas e estudadas anteriormente, apresentaram uma alta constante de afinidade pelos pesticidas da classe dos organofosforados. A modificação da montmorilonita foi demonstrada pelas técnicas de caracterização análise térmica, difração de raios X, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. A interação das argilas modificadas com o clorpirifós foi demonstrada por DSC, e as três sequências peptídicas apresentaram comportamentos diferentes frente ao pesticida, podendo, duas delas, serem utilizadas satisfatoriamente em substituição à enzima original na construção de sensores impedimétricos. Os sensores construídos apresentaram boa linearidade na faixa de concentração de 1×10^{-8} a $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (sensor 1: $R = 0,9997$; sensor 3: $R = 0,9999$) e também de 1×10^{-7} a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (sensor 3: $R = 0,9950$), limites de detecção entre $1,41 \times 10^{-10}$ e $2,40 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, e foram satisfatoriamente aplicados na detecção da clorpirifós em amostra de tomate.

Palavras-Chave: Montmorilonita. Acetilcolinesterase. Espectroscopia de impedância eletroquímica. Análise térmica. Clorpirifós.

ABSTRACT

Agricultural production has received unquestionable benefits due to the use of pesticides; however, these substances can cause serious damage to living organisms due to their toxicity, low biodegradability and high carcinogenic potential. Thus, the determination of pesticides at trace level is extremely important, and it is necessary to find simple and effective analytical approaches for its monitoring. In this sense, several types of enzymatic biosensors have been investigated and based on the inhibition of acetylcholinesterase, an enzyme involved in the transmission of nerve impulses. The pesticides of the classes of organophosphates interact with this class of enzymes, inactivating them and provoking acute intoxications, which can lead, as a consequence, to the death of the individual. The montmorillonite is a clay of the smectite group, which has excellent intercalation and swelling properties, high adsorption potential and high affinity with various organic and inorganic substances. These characteristics constitute them as an adequate means of immobilizing organic/inorganic and biological molecules, such as enzymes and metal nanoparticles. Recently, montmorillonite modified electrodes have attracted considerable attention in the field of electroanalytical/electrochemistry, revealing as properties: high sensitivity, good selectivity, low cost, rapid response and possibility of miniaturization, among other advantages. In this sense, this work aimed to show the possibility of modifying the montmorillonite with three synthetic peptide sequences, proposed by molecular modeling, that mimic the active site of acetylcholinesterase, and the application of this modified clay in the construction of sensors, used in electrochemical detection, by spectroscopy electrochemical impedance, chlorpyrifos, pesticide of the organophosphorus class. The peptide sequences used were ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$); ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$); ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$). These biomimetic sequences, which had already been proposed and studied previously, had a high affinity constant for organophosphorus class pesticides. The modification of montmorillonite was demonstrated by the techniques of thermal analysis, X-ray diffraction, infrared and scanning electron microscopy. The interaction of the modified clays with the chlorpyrifos was demonstrated by DSC, and the three peptide sequences presented different behaviors against the pesticide, and two of them could be used satisfactorily in substitution of the original enzyme in the construction of immunometric sensors. The constructed sensors presented good linearity in the concentration range of 1×10^{-8} to 1×10^{-7} mol L⁻¹ (sensor 1: R = 0,9997; sensor 3: R = 0,9999) and also from 1×10^{-7} to 1×10^{-6} mol L⁻¹ (sensor 3: R = 0,9950), detection limits between $1,41 \times 10^{-10}$ and $2,40 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, and were satisfactorily applied in the detection of chlorpyrifos in a tomato sample.

Keywords: Montmorillonite. Acetylcholinesterase. Electrochemical impedance spectroscopy. Thermal analysis. Chlorpyrifos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representações das estruturas dos diferentes argilominerais: (a) representação simplificada dos tetraédros e octaédros; (b) representação espacial dos tetraédros e octaédros; (c) representação simplificada caulinita, illitas, esmectitas	19
Figura 2	Estrutura cristalina da montmorilonita	20
Figura 3	Classificação de pesticidas quanto à toxicidade	21
Figura 4	Estrutura química geral de um organofosforado	22
Figura 5	Hidrólise da acetilcolina pela ação da AChE	24
Figura 6	Sítio ativo da enzima AChE composto pela tríade (Ser 200-His 440-Glu 327)	26
Figura 7	Mecanismo clássico de inibição da AChE por pesticidas organofosforados	26
Figura 8	Célula eletroquímica típica com destaque para os processos ocorridos na interface do eletrodo de trabalho e eletrólito de suporte	31
Figura 9	Representação do Diagrama de Nyquist	32
Figura 10	(a) Sinal de excitação típico para voltametria cíclica: forma de onda triangular; (b) Representação esquemática de um voltamograma cíclico, com as indicações dos potenciais e correntes de picos	34
Figura 11	Fluxograma da preparação das suspensões argila e mixes	38
Figura 12	Representação esquemática da modificação do eletrodo de platina por imersão	39
Figura 13	Representação esquemática da preparação do material sólido a partir das suspensões da argila e mixes	40
Figura 14	Difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	47
Figura 15	Ampliação da região a baixos ângulos dos difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	48
Figura 16	Espectros no infravermelho obtidos para a montmorilonita pura (-), o peptídeo 1 (-) e o mix 1 (-)	49

Figura 17	Espectros no infravermelho obtidos para a montmorilonita pura e para os mixes	50
Figura 18	Curvas TG/DTG e DTA para a (a) argila pura e (b) mix 1	51
Figura 19	Remoção de água: a) DTG: argila pura, mix 1; b) DTA: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA. Remoção peptídeo: c) DTG: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA	52
Figura 20	Curvas DSC para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	53
Figura 21	Ampliação das curvas DSC de resfriamento em diferentes intervalos para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	54
Figura 22	Ampliação das curvas DSC de aquecimento no intervalo de -5 °C a 45 °C para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	55
Figura 23	Análise cíclica: curvas DSC para argila montmorilonita. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv\ 1} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_{inv\ 2} = 80^{\circ}\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_f = 300^{\circ}\text{C}$	55
Figura 24	Análise cíclica: curvas DSC para mix 1. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv\ 1} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_{inv\ 2} = 80^{\circ}\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_f = 300^{\circ}\text{C}$	57
Figura 25	Ampliação das curvas DSC do mix 1 na região de -60 a 2°C	58
Figura 26	Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o (a) substrato de platina e para os filmes de (b) montmorilonita, (c) mix 1, (d) mix 2 e (e) mix 3	59
Figura 27	(a) VCs obtidos para o eletrodo modificado com diferentes camadas de SWy-1 na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Pt (-), 1 camada (-), 2 camadas (-), 3 camadas (-), 4 camadas (-), 5 camadas (-). (b) VCs para o eletrodo sem modificação e modificado com 3 camadas do filme de SWy-1 apenas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: $\text{Ag} \text{AgCl} \text{KCl}_{(sat)}$	61
Figura 28	(a) Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com SWy-1, nos diferentes tempos de imersão, na presença de	63

$1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0.
(b) voltamogramas cíclicos obtidos nas mesmas condições, com eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl_(sat)

- Figura 29** Relação entre $|Z|/|Z|_{5\text{mV(rms)}}$ e diferentes amplitudes, aplicadas a uma frequência de 50 mHz **64**
- Figura 30** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com mix 1 nas diferentes razões argila:peptídeo, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0 **64**
- Figura 31** VCs e relação de i_{pa} em função de $v^{1/2}$ para os eletrodos modificados com (a) SWy-1, (b) Mix 1, (c) Mix 2, (d) Mix 3, nas diferentes velocidades de varredura, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0; eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$. Eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl_(sat) **65**
- Figura 32** VCs obtidos para o branco (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-) na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl_(sat) **67**
- Figura 33** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o bare (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-), na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0 **69**
- Figura 34** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente (símbolos) e pelo ajuste do circuito elétrico (-) para (a) bare Pt, e para os eletrodos modificados com (b) SWy-1, (c) Mix 1, (d) Mix 2 (e) Mix 3, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0 **69**
- Figura 35** Análise cíclica: curvas DSC para mix 1 na presença de clorpirifós. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}1} = -70^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}2} = 80^\circ\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$, $T_f = 300^\circ\text{C}$ **72**
- Figura 36** Ampliação das curvas DSC de resfriamento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -40 a -10°C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-) **73**
- Figura 37** Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -60 a 10°C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-) **74**

Figura 38	Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -50 a -5 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-)	74
Figura 39	Ampliação das curvas DSC da SWy-1 (-), mix 1 (-) e mix 1 + pesticida (-), na região de 172 a 294,5 °C	75
Figura 40	Curvas DSC para o mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-) na presença de clorpirifós	76
Figura 41	Curva DSC de resfriamento para: (a) SWy-1 (-) e mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1 (-) e mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-) e mix 3 na ausência (-) e na presença do pesticida (-)	77
Figura 42	Curva DSC de aquecimento para: (a) SWy-1 (-), mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1(-), mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-), mix 3 na ausência (-) e presença do pesticida (-)	78
Figura 43	Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o mix 1, mix 2 e mix 3, após a incubação na solução do pesticida	79
Figura 44	Gráficos da absorbância em função do tempo de incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para (a) mix 1, (b) mix 2 e (c) mix 3. $\lambda_{\text{máx}} = 200 \text{ nm}$. Nos detalhes histograma da porcentagem de interação em função do tempo de incubação	80
Figura 45	VCs obtidos para o branco e para o sensor construído com mix 1 antes e após incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por tempos variados. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; $A_{\text{geom}}: 0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: $\text{Ag} \text{AgCl} \text{KCl}_{(\text{sat})}$	82
Figura 46	Efeito do pH do eletrólito frente ao sensores incubados no pesticida clorpirifós por 5 min	82
Figura 47	Curva analítica da resistência a transferência de carga em função da concentração do pesticida clorpirifós para: (a) sensor 1 e (b) sensor 3 na faixa de trabalho de $1 \text{ a } 10 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (c) sensor 3 na faixa de trabalho de $1 \text{ a } 10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Medições realizadas na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0	84
Figura 48	Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o sensores (a) 1 e (b) 3a para a amostra de tomate na ausência (-) e presença do pesticida (-). Medidas realizadas em meio a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relatório de vendas de ingredientes ativos no Brasil	23
Tabela 2	Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do clorpirifós	24
Tabela 3	Dependência de i_p , C e E_p com a v para alguns tipos mais comuns de processos eletródicos	35
Tabela 4	Sequências peptídicas utilizadas	37
Tabela 5	Informações referentes às amostras submetidas à análise DSC	43
Tabela 6	Faixa de concentração de clorpirifós utilizada na construção da curva analítica para cada sensor	45
Tabela 7	Valores d_{001} calculados para SWy-1, mixes 1, 2 e 3	48
Tabela 8	Bandas atribuídas para o espectro obtido no infravermelho dos mixes	51
Tabela 9	Valores de E_{pa} , E_{pc} e ΔE_p obtidos para os diferentes sensores	67
Tabela 10	Parâmetros obtidos através dos dados de impedância experimental	71
Tabela 11	Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas de calibração do pesticida clorpirifós para os sensores 1 e 3	71
Tabela 12	Percentual de recuperação do pesticida clorpirifós em amostra de tomate para os sensores 1 e 3	85

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Área eletroativa do eletrodo
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	Arginina
b	Coeficiente angular da curva analítica
C	Concentração
C_d	Capacitância da dupla camada elétrica
C₀	Concentração da espécie eletroativa
CPE1	Constante de fase
CPE2	Constante de fase 2
CSNSs	Nanofolhas de sílica carboxiladas
CTC	Capacidade de troca catiônica
D	Coeficiente de difusão da espécie
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
E	Potencial
E_f	Potencial final
E_i	Potencial inicial
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_{oc}	Potencial de circuito aberto
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_T (Pt)	Eletrodo de trabalho
f_{max}	Frequência máxima
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina

i	Corrente
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
i_{pa}	Corrente de pico anódico
$i_{p,bare}$	Corrente de pico para o branco
i_{pc}	Corrente de pico catódico
IR	Espectroscopia na região do infravermelho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
j	Número imaginário
LD	Limite de detecção
LMR	Limite máximo de resíduo
LQ	Limite de quantificação
Lys	Lisina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mHz	Mili hertz
min	Minuto
Mt	Montmorilonita
n	Número de elétrons envolvidos no processo de transferência eletrônica
NRs	Nanofolhas
OP	Organofosforados
PAMAM	Poliamidoamina
PHA	Poliacrilamida funcionalizada
Pro	Prolina
Pt	Platina
Pt NP	Nanopartículas de platina
PVA	Polivinilalcool
R_{ct}	Resistência a transferência de carga
R_s	Resistência da solução
R_{Ω}	Resistência total do sistema
s	Segundo
S_D	Desvio padrão
SEM	Microscopia eletrônica de varredura

Ser	Serina
SNS	Nanofolhas de SiO ₂
SWy	Montmorilonita
t	Tempo
TG	Termogravimetria
T_{onset}	Temperatura <i>onset</i>
T_{pico}	Temperatura de pico
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
ω	Frequência angular
Z	Impedância total
Z_{img} ou Z''	Componente imaginário da impedância
Z_{real} ou Z'	Componente real da impedância
β	Razão de aquecimento
ΔE_p	Diferença entre os potenciais de pico
θ	Recobrimento máximo da superfície do eletrodo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Os pesticidas organofosforados</i>	20
1.2 <i>Sensores eletroquímicos na detecção de pesticidas</i>	26
1.3 <i>Técnicas Eletroquímicas</i>	30
1.3.1 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	30
1.3.2 <i>Voltametria Cíclica</i>	32
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 <i>Reagentes e equipamentos</i>	36
3.2 <i>Construção dos sensores</i>	37
3.3 <i>Estudo da interação argila-peptídeos</i>	39
3.4 <i>Caracterização eletroquímica dos sensores</i>	41
3.4.1 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)</i>	42
3.4.2 <i>Voltametria Cíclica (VC)</i>	42
3.5 <i>Avaliações dos sensores frente ao pesticida</i>	43
3.5.1 <i>Análise da interação mix-pesticida</i>	43
3.5.1.1 <i>DSC</i>	43
3.5.1.2 <i>SEM</i>	44
3.5.2 <i>Influência do tempo de incubação</i>	44
3.5.3 <i>Influência do pH</i>	45
3.5.4 <i>Construção da curva analítica</i>	45
3.5.5 <i>Aplicação em amostras de alimento</i>	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 <i>Caracterização estrutural argila-peptídeos</i>	47
4.1.1 <i>Difração de raios X</i>	47
4.1.2 <i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	49
4.1.3 <i>Análise térmica</i>	51
4.1.4 <i>Miscroscopia eletrônica de varredura</i>	59
4.2 <i>Caracterização Eletroquímica dos Sensores</i>	61
4.3 <i>Avaliações dos sensores frente ao pesticida</i>	71
4.3.1 <i>Análise da Interação mix-pesticida</i>	72

4.3.1.1 Análise térmica	72
4.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura	79
4.3.2 Influência do tempo de incubação e do pH	80
4.4 <i>Construção da curva analítica</i>	82
4.5 <i>Aplicação em amostras de alimentos</i>	84
CONCLUSÃO	86
PERSPECTIVAS FUTURAS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

INTRODUÇÃO

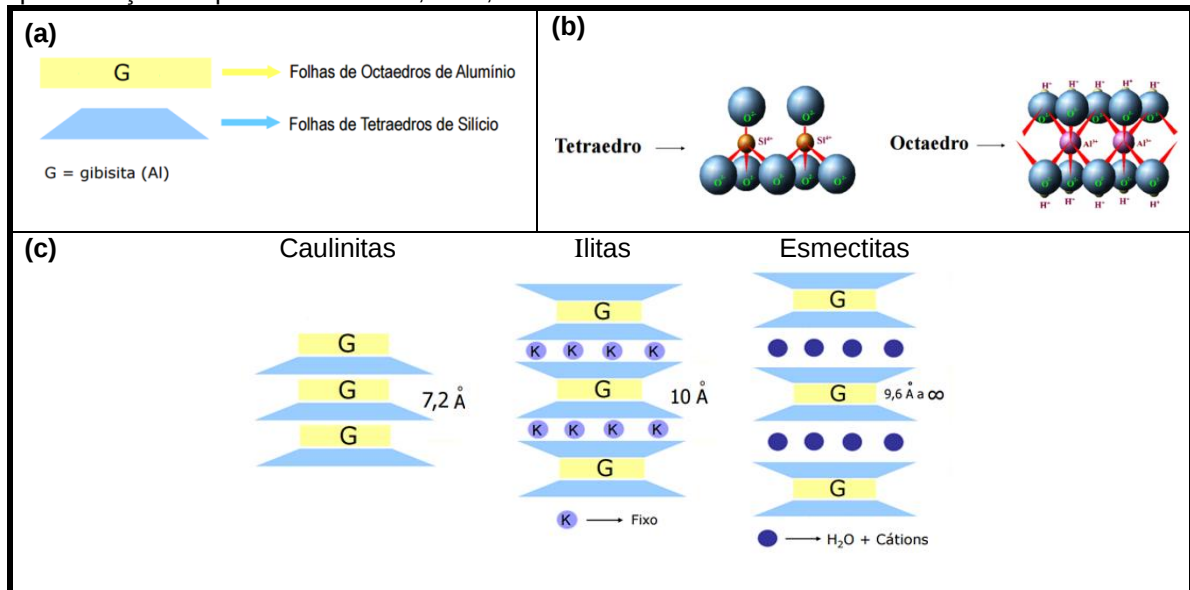
Há muito tempo que o ser humano vem utilizando recursos naturais para processar e fabricar materiais de interesse tecnológico. Dentre esses materiais encontram-se as argilas, que possuem muitas aplicações desde a antiguidade, onde eram utilizadas na fabricação de vasos, tijolos, e outros objetos. Com o passar dos anos suas aplicações cresceram muito e atualmente, são utilizadas nos mais diversos campos, como fabricação de louças sanitárias, pisos, revestimentos, tintas, catalisadores, adsorventes, fertilizantes, na indústria de petróleo, na área farmacológica, cosmética, entre outros ^[1-7]. As diversas aplicações de argilas em uma gama extensa de campos são devido às suas próprias características, tais como: alta plasticidade, resistência mecânica, estabilidade térmica, alta capacidade de adsorção, elevada área superficial e capacidade de troca catiônica (CTC) ^[8,9].

Pode-se definir o termo argila como sendo um material natural, de textura terrosa, granulação fina, constituída essencialmente de argilominerais e podendo conter outros minerais, como quartzo, mica, pirita, hematita, matéria orgânica e outras impurezas ^[10-12]. Os argilominerais são os minerais característicos das argilas ^[13], conferindo-lhes características físico-químicas interessantes; são constituídos principalmente por tetraedros de silício (SiO_4) e octaédros de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_6$), na presença de outros elementos como sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, como indicadores do tipo argilomineral a que se refere ^[12]. Cada argilomineral possui características próprias que definem sua utilização na indústria.

Entre os argilominerais mais comuns estão a caulinita, a esmectita e a illita. Basicamente, a diferença entre esse grupos são o tipo de estrutura e as possíveis substituições dentro dessas estruturas. O grupo das caulinitas apresenta estrutura do tipo 1:1, ou seja, uma folha octaédrica seguida por uma folha tetraédrica, com um reduzido espaço entre as camadas para a entrada de água ou outros íons. Dessa forma, esse grupo não apresenta estrutura expansível, não sendo possível modificar sua distância basal. Assim, dificilmente ocorre substituição isomórfica em sua estrutura. O grupo da illitas apresenta estrutura 2:1, uma camada tetraédrica seguida por uma octaédrica e novamente uma tetraédrica. Como esses argilominerais são encontrados em solos rico em potássio, entre as suas camadas existem cátions K^+ “fixos”, dificultando a penetração de água e outros íons, e, portanto, sendo pouco expansíveis. O grupo das esmectitas também apresenta estrutura do tipo 2:1, porém

são muito expansíveis, permitindo a entrada de moléculas de água e a substituição dos cátions que se encontram entre as camadas, na região interlamelar, podendo ter sua distância basal variável [12, 14]. A **Figura 1** apresenta as estruturas dos diferentes grupos argilominerais.

Figura 1 – Representações das estruturas dos diferentes argilominerais: (a) representação simplificada dos tetraédros e octaédros; (b) representação espacial dos tetraédros e octaédros; (c) representação simplificada caulinita, ilitas, esmectitas

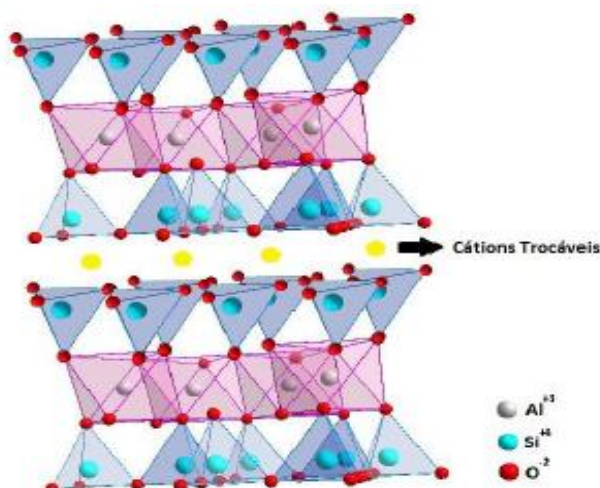


Fonte: CAMPOS, 2011

Por possuírem essa estrutura, as esmectitas são os argilominerais mais interessantes do ponto de vista tecnológico, com aplicações em diversas áreas [1, 15]. Dentre as esmectitas, a mais abundante na natureza é a montmorilonita, que tem recebido especial atenção em aplicações tecnológicas nos últimos anos devido a sua alta capacidade de adsorção [16-19]. Sua estrutura cristalina é lamelar, e está representada na **Figura 2**.

A estrutura da montmorilonita é constituída por duas folhas hexagonais sobrepostas, cada uma delas formada por grupos tetraédricos de silicato (SiO_4) e uma folha central formada por grupos octaédricos de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_6$), unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às duas camadas. Possui cátions localizados na região interlamelar, que podem ser trocados por outros cátions ou moléculas, modificando suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente alterando seu espaçamento basal [8].

Figura 2 – Estrutura cristalina da montmorilonita



Fonte: Figura do autor

Apresenta fórmula geral $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$, na qual M indica o cátion trocável presente no espaço interlamelar, e havendo substituição isomórfica nos sítios octaédricos, ou seja, átomos de alumínio sendo substituídos por átomos de magnésio. Essa substituição gera os mais importantes sítios ativos presente nas superfícies das argilas, sendo o excesso de carga negativa distribuído pelos oxigênios da superfície, resultando em uma superfície altamente ácida [20, 21].

Além de todas as propriedades peculiares da montmorilonita, apresentam também baixo custo, facilidade de obtenção e purificação e possibilidade de reutilização. Podem também ter sua estrutura modificada quimicamente pela inserção de moléculas orgânicas ou inorgânicas, possibilitando agregar funcionalidades a fim de intensificar suas propriedades físico-químicas [10]. Se apropriando dessas características, muitos estudos vem sendo realizados utilizando argilas modificadas nas mais diversas áreas, como na remoção de contaminantes do meio ambiente e na construção de sensores químicos [16,20, 22-28].

1.1 OS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

A preocupação com a qualidade das águas, solos, organismos vivos e meio ambiente vem aumentando nos últimos anos. Atenção especial tem sido dada a problemas ambientais associados à presença de contaminantes, tais como metais pesados e pesticidas, derivados de atividades industriais e agrícolas. Na indústria agrícola, o uso de agroquímicos para o controle de organismos é uma preocupação

atual, pois eles se dissolvem no solo, e agravam o risco de contaminação superficial e subterrânea ^[29-36].

A palavra pesticida pode ser definida, segundo a *União Internacional de Química Pura e Aplicada* (IUPAC), como substância bioativa utilizada como fim a destruição e o combate, bem como a prevenção de espécies indesejáveis que possam ser encontradas como interferentes durante as etapas de produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento de alimentos e produtos agrícolas ^[37]. Podem ser classificados de diferentes modos: de acordo com o seu modo de ação e organismo alvo, como herbicidas, fungicidas, inseticidas, etc.; de acordo com sua estrutura química, como organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc.; ou de acordo com sua toxicidade, como classe I, II, III e IV ^[38]. A **Figura 3** apresenta as diferentes classes de toxicidade desses compostos.

Figura 3 – Classificação de pesticidas quanto à toxicidade



Fonte: Figura do autor

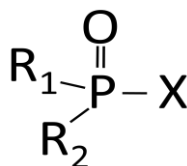
No Brasil, os órgãos responsáveis pela legislação vigente sobre pesticidas são o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cada órgão é responsável por determinado tipo de avaliação do produto, de modo independente do outro. O IBAMA é responsável pela avaliação ambiental, ou seja, avalia quais os riscos e danos ao meio ambiente a utilização de determinado pesticida pode ocasionar. Ao MAPA cabe a responsabilidade da avaliação agrônômica, ou seja, avalia a eficiência e o potencial de uso na agricultura. Cabe a ANVISA a avaliação toxicológica, indicando o quão tóxico o produto é para a população e em quais condições o seu uso é seguro ^[39].

Sem dúvida, o uso de pesticidas provoca inquestionáveis benefícios no aumento da produção agrícola, uma vez que são eficazes no combate às pragas. Entretanto, sua utilização em demasia pode gerar graves problemas ambientais, devido a sua toxicidade, baixa biodegradabilidade e alto potencial carcinogênico, tornando-os sérias ameaças aos organismos vivos e ao meio ambiente ^[40].

A exposição humana prolongada frente a pesticidas pode acarretar diversos danos à saúde, como problemas na visão, em funções sensoriais e cognitivas, no sistema nervoso, mortalidade infantil, doença de *Alzheimer*, carcinogenicidade, neurotoxicidade, entre outros ^[41-48]. Essa contaminação pode ocorrer pela exposição a baixos níveis da substância por um longo período de tempo, devido a circulação e acumulação em águas, ar, solo e cadeia alimentar. Pode ocorrer também contaminação por exposição ocupacional, devido à produção, transporte e aplicação de pesticidas e devido à moradia próxima a locais com altas concentrações de pesticidas ^[41,42].

Dentre os pesticidas mais utilizados na agricultura, merece destaque a classe dos organofosforados (OP), encontrados principalmente em inseticidas. Essa classe de compostos é formada por, principalmente, ésteres de ácido fosfórico e seus derivados ^[49]. A estrutura química geral desses compostos é apresentada na **Figura 4**, na qual R₁ e R₂ representam grupos alcóxilas e X um halogênio, grupos alcóxidos, grupos alquil aminas, entre outros ^[49].

Figura 4 – Estrutura química geral de um organofosforado



Fonte: Figura do autor

Inicialmente os organofosforados foram utilizados na agricultura em substituição aos organoclorados, por apresentarem tempo de meia vida inferior, sendo menos persistentes ao meio ambiente. Porém, apresentam propriedades altamente tóxicas para os vertebrados em geral, como mamíferos e peixes, e seu consumo e exposição estão diretamente ligados a casos de intoxicações e mortes em todo o mundo ^[50-52].

Segundo relatório do IBAMA, o organofosforado clorpirifós tem sido muito aplicado no Brasil nos últimos anos, visto que em 2017 foi o 13º ingrediente ativo mais vendido, como mostra a **Tabela 1** ^[53].

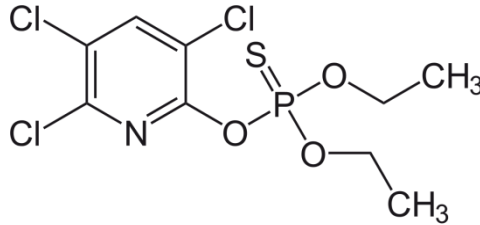
Tabela 1 – Relatório de vendas de ingredientes ativos no Brasil

Os 10 ingredientes ativos mais vendidos 2017		
Unidade de medida: toneladas de IA		
Ingrediente Ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	173.150,75	1º
2,4-D	57.389,35	2º
Mancozebe	30.815,09	3º
Acefato	27.057,66	4º
Óleo mineral	26.777,62	5º
Atrazina	24.730,90	6º
Óleo vegetal	13.479,17	7º
Dicloreto de paraquate	11.756,39	8º
Imidacloprido	9.364,57	9º
Oxicloreto de cobre	7.443,62	10º
Enxofre	7392,44	11º
Diurom	6999,47	12º
Clorpirifós	6471,19	13º

Fonte: IBAMA/ Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto 4.074/2002 (Dados atualizados em 25/06/2018)

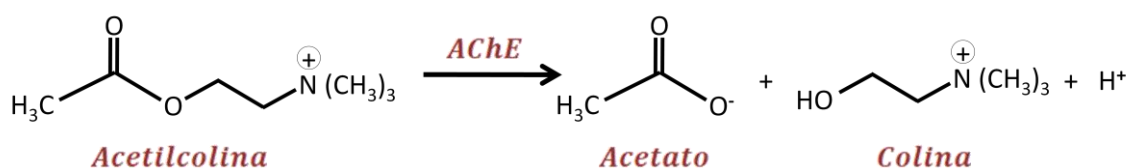
O clorpirifós, também conhecido como *tiofosfato o,o-dietil-o(3,5,6-tricloro-2-piridila)* e com fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, apresenta baixa solubilidade em água e é pertencente a classe II da classificação quanto a toxicidade, ou seja, é altamente tóxico. Sua fórmula estrutural é apresentada na **Tabela 2**, juntamente com suas propriedades. Pode ser absorvido pelo organismo humano através da pele, mucosas e vias respiratórias ^[52]. Estudos mostram que a exposição via intrauterina de camundongos ao pesticida provoca alterações hormonais na tireóide ^[54-55], bem como a exposição por via oral interfere diretamente no sistema reprodutivo masculino, provocando alterações nos testículos, diminuição da contagem de espermatozóides e da fertilidade animal ^[56].

Tabela 2 – Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do clorpirifós

<i>Propriedades do Clorpirifós</i>	<i>Fórmula Estrutural</i>
Classificação Toxicológica: classe II Massa Molar: 350,59 g mol ⁻¹ Fórmula molecular: C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS Pressão de Vapor: 1,82 x 10 ⁻⁵ mmHg (25 °C) Ponto de Fusão: 42- 43,5 °C Solubilidade em água: 1,4 mg L ⁻¹ (25°C)	

Fonte: Eaton, D. L. *et al*, 2008 ^[57].

O mecanismo de ação desse composto, igualmente ao de qualquer organofosforado, é através da inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), enzima da classe serina hidrolase, responsável por catalisar a hidrólise de ésteres, especialmente de ésteres de colina. O corpo humano produz AChE, que atua na neurotransmissão colinérgica central e periférica, degradando a acetilcolina (ACh). É a ACh quem transmite a mensagem de um neurônio a outro, e estruturalmente possui em sua molécula um grupo éster e uma amina quaternária, sendo de primordial importância para a manutenção de diversas funções fisiológicas ^[58,59]. A ACh é hidrolisada a colina e ácido acético pela ação da AChE. A reação de hidrólise é mostrada na **Figura 5**.

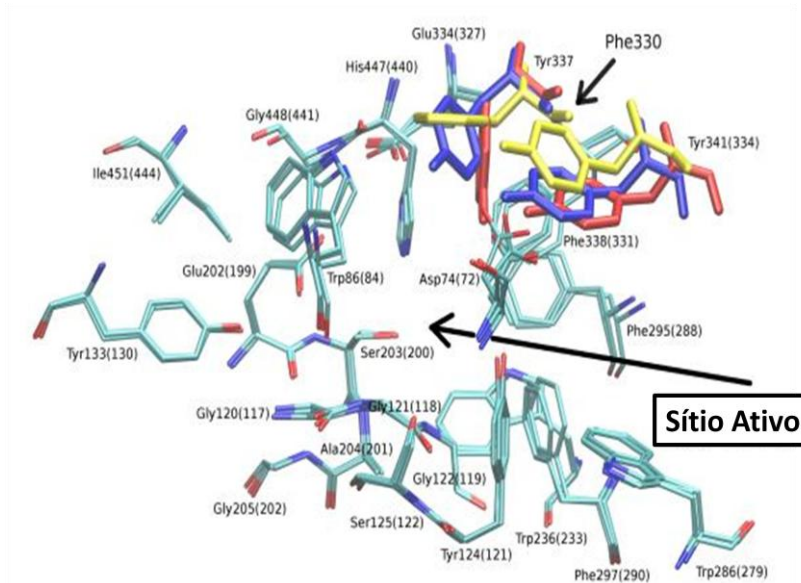
Figura 5 – Hidrólise da acetilcolina pela ação da AChE

Fonte: Figura do autor

Depois de hidrolisada a colina é transportada novamente para a terminação nervosa, onde será reutilizada na síntese de novas ACh. Dessa forma, se a enzima AChE perde sua função, há um acúmulo de ACh nas fendas sinápticas, causando a interrupção na transmissão dos impulsos nervosos, levando a uma série de danos à saúde, como perda do controle muscular, convulsões, parada cardíaca e até a morte ^[60].

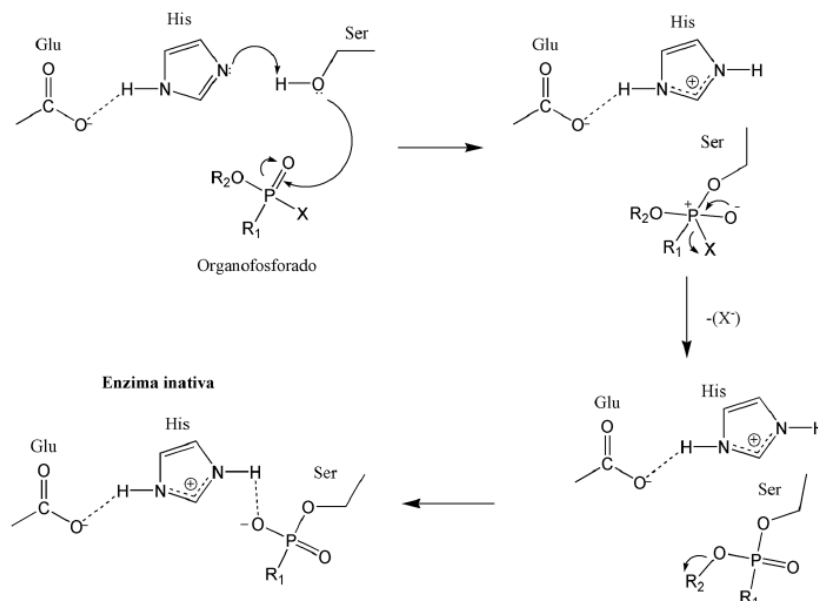
Os compostos organofosforados inibem a AChE, uma vez que promovem uma ligação covalente no sítio ativo da enzima. A enzima tem seu sítio ativo caracterizado por três aminoácidos essenciais: serina, histidina e ácido glutâmico (Ser 200-His 440-Glu 327), como mostrado na **Figura 6**. A inibição ocorre pela fosforilação da serina, resultando em uma ligação química forte da histidina protonada e o átomo de oxigênio do inibidor ^[61]. O mecanismo clássico de inibição da AChE por compostos organofosforados é apresentado na **Figura 7**.

Figura 6 – Sítio ativo da enzima AChE composto pela tríade (Ser 200-His 440-Glu 327)



Fonte: <http://www.ncbr.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html>

Figura 7 – Mecanismo clássico de inibição da AChE por pesticidas organofosforados



Fonte: Sgobbi, 2016 ^[61].

A metodologia utilizada rotineiramente para ensaios com pesticidas, que promove alta precisão e confiabilidade, e também recomendada pela ANVISA, é cromatografia líquida ou gasosa acoplada a um espectrômetro de massas. Porém, essas análises requerem complicados pré-tratamentos das amostras, instrumentação sofisticada, mão de obra operacional altamente treinada e qualificada e longos tempos de análises, o que acaba limitando suas aplicações ^[62, 63]. Nesse sentido, torna-se de extrema urgência o desenvolvimento de métodos analíticos simples e eficientes, capazes de monitorar os resíduos de pesticidas em gêneros alimentícios e amostras ambientais. Dessa forma, biossensores tem atraído muito o interesse devido a sua alta sensibilidade, simplicidade de construção, miniaturização e portabilidade. Com base nisso, vários biossensores eletroquímicos têm sido aplicados satisfatoriamente a detecção de organofosforados ^[64-69], partindo da inibição da enzima acetilcolinesterase ^[62,70].

1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS NA DETECÇÃO DE PESTICIDAS

Biossensores eletroquímicos baseados na inibição da AChE possuem numerosas vantagens, incluindo resposta rápida, alta sensibilidade, fácil operação, pequeno tamanho e baixo custo, tem atraído interesse como um promissor candidato para detecção de organofosforados, nos quais a AChE é imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho ^[66].

Song e colaboradores partiram de MoS₂ dopado com nitrogênio e flúor, funcionalizados com nanopartículas de Ag, na fabricação de um biossensor para detecção de clorpirifós. O sensor proposto apresentou desempenho notável, com resposta rápida e baixos limites de detecção ^[62]. Sgobbi e colaborador desenvolveram um sensor bioinspirado empregando poliacrilamida funcionalizada, PHA, imobilizada na superfície de um eletrodo impresso para detecção dos organofosforados paraoxo-etil, fenitrothion e clorpirifós. O sensor foi empregado utilizando técnicas amperométricas e apresentou limite de detecção (LD) 0,36, 0,61 e 0,83 µM L⁻¹, respectivamente ^[64].

Lu e colaboradores desenvolveram um sensor altamente sensível a AChE, com nanobastões bimetálicos Pd@Au (NRs), o qual apresentou, nas condições ótimas, intervalo de concentração linear entre $3,6 \times 10^{-12}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o paraoxon, com limite de detecção de $3,6 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ ^[66]. Lang e colaboradores

desenvolveram um sensível biossensor amperométrico a base de acetilcolinesterase, utilizando nanobastões de ouro, para detecção de pesticidas organofosforados. O biossensor foi aplicado na determinação de paraoxon e dimetoato, apresentando intervalo de concentração linear entre $1,0 \times 10^{-9}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o primeiro e $5,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o segundo. Os limites de detecção foram de $7,0 \times 10^{-10}$ e $3,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para paraoxon e dimetoato, respectivamente. O sensor construído apresentou boa estabilidade e sensibilidade, podendo ser aplicado a medidas em amostras de água [71].

Yu e colaboradores imobilizaram a AChE em nanotubos de carbono aminofuncionalizados, e empregaram na fabricação de um biossensor para detecção de organofosforados. Utilizaram paraoxon como modelo de pesticida, obtendo estabilidade e reprodutibilidade satisfatórias em intervalos de concentração lineares entre 0,2 e 1 nmol L⁻¹ e 1 e 30 nmol L⁻¹, com LD de 0,08 nmol L⁻¹. O biossensor foi satisfatoriamente aplicado na determinação de pesticidas em amostras vegetais [72].

Adicionalmente, com o rápido desenvolvimento da nanotecnologia, cada vez mais novos materiais vêm sendo utilizados na fabricação de biossensores eletroquímicos mais eficazes [65, 73-78]. Em particular, as argilas, especificamente a montmorilonita, tem se tornado um material atrativo para a utilização como matriz na imobilização de biomoléculas, justamente devido às propriedades citadas anteriormente [26, 28, 79-81]. Estudos recentes mostram a utilização de montmorilonita intercalada com diferentes moléculas orgânicas, como metilamina ou dimetilamina [82], trimetilamina [83], aminoácidos [84], ácido fólico [85], enzimas, entre outros [86, 87], na construção de sensores.

Lucena e colaboradores utilizaram filmes de montmorilonita sódica na construção de um sensor eletroquímico para a detecção de dopamina. O sensor foi obtido pela técnica de deposição layer-by-layer em vidro ITO, apresentou LD 1 μ mol L⁻¹ e intervalo linear de concentração entre 5 e 150 μ mol L⁻¹. O sensor foi aplicado satisfatoriamente em amostras de urina humana, confirmando a possibilidade de utilização em amostras reais [19].

Unal e colaboradores fabricaram um sensor utilizando a técnica de *eletrospinnig*; a montmorilonita modificada com dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), e utilizando como polímero adicional polivinilalcool (PVA), foi utilizada na formação de nanofibras de PVA/PAMAM-Mt sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. A enzima piranose oxidase foi, então, imobilizada na superfície do

eletrodo, o qual posteriormente foi submetido a medidas amperométricas. A resposta linear para a glicose foi no intervalo de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com LD de $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ [88].

Abbaci *et al.* desenvolveram um sensível e seletivo sensor voltamétrico para monitoramento do fungicida propinebe, a partir da construção de um eletrodo de pasta de carbono modificado com Cu-montmorilonita, o qual apresentou baixo limite de detecção, por volta de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e intervalo linear entre 5 e 30 µM [40].

Songurtekin e colaboradores [84] fabricaram um biossensor eletroquímico pela modificação da argila montmorilonita com histidina e posterior imobilização da enzima laccase, o qual foi, então, aplicado para a detecção de catecol, por análise em fluxo, apresentando LD de $4,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e intervalo linear entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de catecol.

Os estudos realizados por Zapp e colaboradores [70] mostraram o desenvolvimento de um sensor para detecção do pesticida metomil a partir da imobilização da enzima laccase na argila montmorilonita. O intervalo de concentração linear obtido foi de $9,8 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e LD $2,35 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O sensor construído foi aplicado satisfatoriamente na detecção de metomil em amostras de tomate e cenoura.

Embora seja grande o número de trabalhos que utilizam montmorilonita modificada na construção de sensores e biossensores, poucos relatam a imobilização da AChE na argila. Na busca de trabalhos baseados na montmorilonita e na inibição enzimática da AChE encontra-se apenas dois trabalhos, utilizando nanofolhas de sílica, retiradas da montmorilonita. Em 2014, Li e colaboradores utilizaram a montmorilonita como precursora na preparação de nanofolhas de sílica carboxiladas (CSNSs), e juntamente com nanopartículas de Pt (Pt NP) e nafion, modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Nas condições ótimas, o sensor detectou metil paration e carbaril no intervalo de concentração 1×10^{-12} e 1×10^{-8} mol L⁻¹ apresentando LDs de $5,52 \times 10^{-13}$ mol L⁻¹ para metil paration e $5,65 \times 10^{-13}$ mol L⁻¹ para o carbaril [89].

Yang e colaboradores também utilizaram a montmorilonita para preparar nanofolhas de SiO₂ (SNS), e estas na preparação de nanocompósitos. Para imobilizar a AChE utilizou-se a quitosana, e Nafion foi utilizado como uma membrana protetora a fim de promover a estabilidade do biossensor de AChE. O biossensor foi utilizado para detectar metil paration, clorpirifós e carbofurano em intervalos de

concentrações de 1×10^{-12} a 1×10^{-10} mol L⁻¹ e 1×10^{-10} a 1×10^{-8} mol L⁻¹. O limite de detecção obtido para os três pesticidas foi de 5×10^{-13} mol L⁻¹. O biossensor desenvolvido apresentou boa sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade e baixo custo fornecendo assim uma nova ferramenta na análise de pesticidas no ambiente [44].

É possível notar que biossensores baseados na inibição da enzima AChE têm sido amplamente desenvolvidos para detecção de pesticidas organofosforados. Apesar das vantagens mostradas por esses dispositivos, são raramente aplicados em amostras reais devido ao alto custo da enzima, aliado a necessidade de condições perfeitamente controladas para garantir a estabilidade enzimática, e a possibilidade de inibição da AChE na presença de cátions metálicos ou moléculas orgânicas podendo levar a resultados não confiáveis [64].

Como alternativa a essas questões, pesquisas mostram o desenvolvimento de materiais biomiméticos, os quais exibem propriedades catalíticas semelhantes a das enzimas naturais, podendo, assim, superar esses inconvenientes e aumentar o desempenho do biossensor em relação à estabilidade e a sensibilidade [86, 90]. No caso da enzima AChE, devido apresentar alta massa molecular e estrutura complexa, a utilização de uma molécula que mimetize o sítio ativo da enzima se torna uma alternativa interessante [91].

Nesse sentido, Mascini e colaboradores utilizaram modelagem molecular para projetar diferentes sequências peptídicas baseadas na tríade catalítica presente no sítio ativo da AChE (*Ser-220; His-440; Glu-327*). Os resultados foram satisfatórios, uma vez que as moléculas projetadas interagiram com pesticidas organofosforados e carbamatos [92]. Santos e colaboradores utilizaram-se de um hexapeptídeo bioinspirado ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) na construção de um sensor para detecção de diclorvós em amostras de alimentos, obtendo um LD de $1,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, boa estabilidade e sensibilidade [91]. Em 2018, Rodrigues construiu um sensor bioinspirado em AChE, utilizando o hexapeptídeo ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) que mimetizava o sítio ativo da enzima e nanopartículas de ouro, para a detecção de clorpirifós e carbofurano em amostras de tomate e batata; o sensor apresentou baixos LD para o carbofurano e clorpirifós, com valores de $6,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ e $4,0 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, respectivamente [93].

Com base no exposto, o presente trabalho buscou a utilização de três diferentes sequências peptídicas ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$),

$(\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-)$, $(\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-)$, propostas por estudos de modelagem molecular, realizados em colaboração pelo Prof. Dr. Marcello Mascini, da Universidade de Teramo, Itália (UniTE), que mimetizam o sítio ativo da AChE para a modificação da argila montmorilonita, visando a construção de sensores eletroquímicos para detecção de pesticidas da classe dos organofosforados.

1.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas são bastante utilizadas para se detectar substâncias de interesse por serem relativamente simples e rápidas e por permitir uma análise mais detalhada das reações ocorridas no meio reacional.

1.3.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

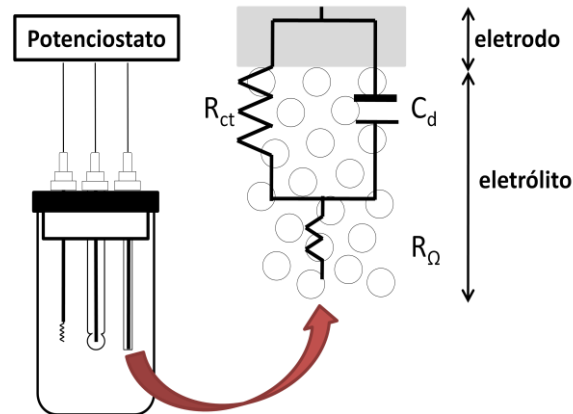
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução eletrolítica. Esta técnica eletroquímica envolve a aplicação de uma perturbação de sinal senoidal do potencial ou da corrente no sistema sob investigação, monitorando-se as relações potencial-corrente e obtendo-se a impedância e o ângulo de fase do sistema. Com essas medidas é possível avaliar processos como transporte de carga, capacitância redox e de dupla camada, condutividade de filmes, coeficientes de difusão, entre outros ^[94].

A EIS é uma técnica bastante utilizada por permitir a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio, diferentemente de outras técnicas eletroquímicas que são dinâmicas. As informações são obtidas utilizando circuitos equivalentes ou modelos matemáticos, e admitindo-se a interface eletrodo/solução eletrolítica como sendo resultante da combinação de elementos de circuito elétricos passivos, isto é, resistência, capacitância e indutância ^[94]. A **Figura 8** mostra um sistema eletroquímico típico utilizado em EIS: uma célula eletroquímica de três eletrodos, com eletrodo de trabalho, referência e auxiliar; juntamente com o circuito equivalente para o sistema, no qual R_{ct} indica a resistência à transferência de carga, C_d a capacitância da dupla camada elétrica, R_Ω resistência total do sistema.

Comumente, a impedância é expressa como função complexa, podendo ser desmembrada em uma parte real e uma parte imaginária, como mostra a equação (1), onde j é o número imaginário, por definição $j = \sqrt{-1}$.

$$Z = Z_{real} + jZ_{imaginário} \quad (1)$$

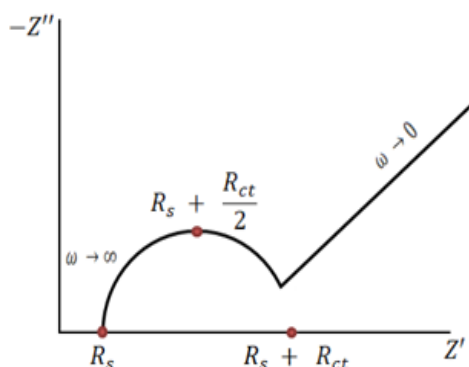
Figura 8 – Célula eletroquímica típica com destaque para os processos ocorridos na interface do eletrodo de trabalho e eletrólito de suporte



Fonte: Adaptado de Damos *et al*, 2004 ^[95]

A interpretação das medidas EIS é realizada por meio de três tipos de diagramas distintos: de Nyquist, de Bode e de frequência; os quais representam os processos físicos que ocorrem no sistema, sendo que a forma mais utilizada na análise dos resultados experimentais são as representações gráficas de Nyquist. Nesses diagramas, também conhecidos como diagrama no plano complexo, o componente real está localizado no eixo das abscissas e componente imaginário no eixo das ordenadas, e cada ponto representa a impedância em determinada frequência. A **Figura 9** mostra a representação geral de um diagrama de Nyquist, onde ω é frequência angular, Z' componente real da impedância, Z'' componente imaginário da impedância, com as principais informações que dele podem ser retiradas.

É possível observar duas regiões distintas no diagrama. A primeira região, à altas frequências, onde aparece um semicírculo, do qual podem ser retiradas informações quanto resistência da solução (R_s), frequência máxima (f_{max}), e resistência à transferência de carga (R_{ct}); seguido pela região linear a baixas frequências, indicando a presença ou não de processos de origem difusional ^[96, 97].

Figura 9 – Representação do Diagrama de Nyquist

O valor de R_s pode ser obtido pela primeira intersecção do semicírculo (frequência mais alta) com o eixo de impedância real, e a segunda intersecção (projeção do semicírculo) indica o valor da soma de R_s e R_{ct} . O valor de R_{ct} está associado à transferência de elétrons que ocorre nos processos de oxidorredução na interface eletrodo/eletrólito, indicando a facilidade ou dificuldade na transferência eletrônica; um maior valor R_{ct} indica que há uma dificuldade dos elétrons chegarem até a superfície eletródica. Como esses parâmetros podem ter seus valores modificados de acordo com diferentes materiais que possam estar imobilizados na superfície do eletrodo, e também relacionados com a concentração do analito presente no meio reacional, a EIS se torna uma eficiente técnica para aplicações analíticas.

1.3.2 Voltametria Cíclica

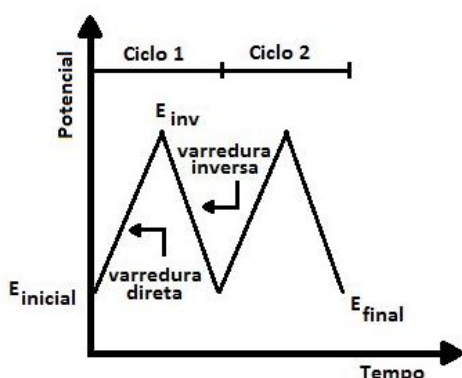
A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica muito versátil que permite o estudo de espécies eletroativas presentes no meio reacional. Aliada a essa versatilidade, sua fácil instrumentação e medição tornam a VC uma técnica de ampla utilização nas mais diversas áreas da química. Frequentemente é o primeiro experimento a ser realizado, uma vez que fornece informações rápidas acerca de processos eletroquímicos, sejam estes em compostos, materiais biológicos ou na superfície de eletrodos, permitindo o estudo da cinética e dos mecanismos de reações ^[98].

A técnica consiste na oxidação e redução de espécies eletroativas presentes no meio reacional, devido à aplicação de uma corrente, a qual é medida em função da aplicação controlada de um potencial. O intervalo de varredura de potencial é realizado a uma velocidade constante v , tendo o potencial inicial a mesma

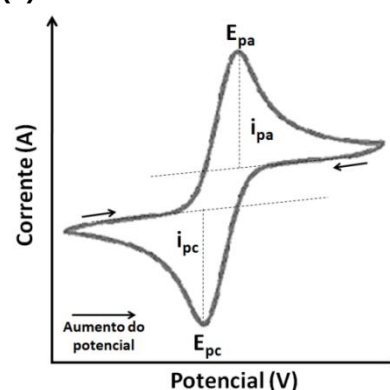
magnitude do potencial final ($E_f = E_i$). Obtém-se, dessa forma, uma curva de intensidade de corrente (i) em função do potencial aplicado (E), denominada voltamograma cíclico. A **Figura 10** apresenta o sinal de excitação típico e um voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível.

Figura 10 – (a) Sinal de excitação típico para voltametria cíclica: forma de onda triangular; (b) Representação esquemática de um voltamograma cíclico, com as indicações dos potenciais e correntes de picos

(a)



(b)



Fonte: Figuras adaptadas de WANG, 2001^[99] e GREEF *et al*, 1985^[100].

Vários parâmetros podem ser retirados de um voltamograma cíclico, tais como potenciais de pico anódico e catódico (E_{pa} e E_{pc}), correntes de picos anódico e catódico (i_{pa} e i_{pc}), diferença entre potenciais de pico (ΔE_p). A análise desses parâmetros, juntamente com variação da velocidade de varredura e variação de concentração, permite inferir sobre o mecanismo de um processo. A **Tabela 3** mostra esses critérios.

Tabela 3 – Dependência de i_p , C e E_p com a v para alguns tipos mais comuns de processos eletródicos

Mecanismo	Dependência de i_p com v	Dependência de i_p com C	Dependência de E_p com v	i_{pa}/i_{pc}
Reversível	$i_p \propto v^{1/2}$	Linear	E_p é independente de v	$i_{pa} / i_{pc} = 1$ para todas velocidades
Irreversível	$i_p \propto v^{1/2}$	Linear	E_p torna-se mais negativo com o aumento de v	$i_{pa} / i_{pc} = 0$ para todas velocidades
Eletroquímico-Químico	Aproxima-se de casos reversíveis com o aumento de v	Geralmente linear	E_p é mais positivo que casos reversíveis; E_p torna-se mais negativo com o aumento de v	$i_{pa} / i_{pc} \rightarrow 1$ com o aumento da velocidade
Químico-Eletroquímico	$i_p/v^{1/2}$ versus v diminui com o aumento de v	Frequentemente não linear $i_p/C <$ casos reversíveis	E_p torna-se mais positivo com o aumento de v	i_{pa} / i_{pc} aumenta com o aumento da velocidade
Regenerativo	Aproxima-se de casos reversíveis com o aumento de v	Frequentemente não linear; $i_p/C >$ casos reversíveis	E_p torna-se mais positivo com o aumento de v	$i_{pa} / i_{pc} \approx 1$ para todas as velocidades
Adsorção de Reagentes	i_p aumenta com o aumento de v	Não Linear	E_p torna-se mais negativo com o aumento de v	$i_{pa} / i_{pc} \leq 1$; próximo a 1 para baixas velocidades
Adsorção de Produtos	i_p diminui com o aumento de v	Não Linear	E_p torna-se mais positivo com o aumento de v	$i_{pa} / i_{pc} \geq 1$; próximo a 1 para baixas velocidades

Tabela Adaptada de WANG, 2001 ^[99].

2. OBJETIVOS

Construção e caracterização de sensores eletroquímicos, a partir da modificação da superfície eletródica de platina com diferentes sequências peptídicas, que mimetizam o sítio ativo da AChE, imobilizadas em sistema microestruturado argila montmorilonita (SWy-1), para detecção de clorpirifós.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Imobilizar três diferentes sequências peptídicas, ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) e ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), separadamente, na argila montmorilonita;
- ✓ Modificar a superfície do eletrodo de platina com filmes de montmorilonita e montmorilonita modificada;
- ✓ Realizar a caracterização estrutural por difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho (IR), análise térmica (TG/DTG, DTA), microscopia eletrônica de varredura (SEM) da argila e argila modificada;
- ✓ Realizar a caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC);
- ✓ Estudar, por DSC, a interação do pesticida clorpirifós com argila modificada;
- ✓ Estudar o efeito da interação do pesticida clorpirifós sobre o perfil eletroquímico dos sensores construídos;
- ✓ Aplicar os sensores construídos na determinação do pesticida clorpirifós em amostra de alimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

As soluções utilizadas foram preparadas empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A argila montmorilonita foi adquirida da Source Clays, Clay Mineral Society, Universidade do Missouri, Columbia, M.O., USA, previamente purificada e liofilizada no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Unesp, Câmpus de São José do Rio Preto. As sequências peptídicas ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) e ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) foram sintetizadas no Laboratório de Purificação e Caracterização de Peptídeos, no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, sob responsabilidade do Prof. Saulo Santesso Garrido, do Instituto de Química, da Unesp, Câmpus de Araraquara. As soluções de cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ferrocianeto de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ferricianeto de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, clorpirifós $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparados a partir dos reagentes adquiridos da Sigma Aldrich.

Para as medidas eletroquímicas utilizaram-se os seguintes eletrodos: um eletrodo de disco de platina de diâmetro 1 mm, modificado com as suspensões de argila e de argila modificada com as diferentes sequências peptídicas, como eletrodo de trabalho (E_T): platina; um eletrodo prata/cloreto de prata em $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrodo de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$); e como eletrodo auxiliar, um eletrodo espiral de platina de área geométrica estimada em 20 mm^2 (espiral Pt). O eletrodo de trabalho, após as modificações, foi investigado aplicando-se as técnicas eletroquímicas espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC), para a obtenção das medidas eletroquímicas. Um capacitor de $0,1 \mu\text{F}$ foi conectado entre os eletrodos de referência e auxiliar para evitar ruído a baixas frequências. As medições foram conduzidas em uma célula eletroquímica contendo os três eletrodos, com 5 mL de eletrólito de suporte (solução $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Para as medidas de EIS foi empregado E_{OC} , amplitude de 15 mV (*rms*), 10 pontos/década e intervalo de frequência de 100 kHz a 10 mHz, equipamento EG&G PAR - modelo 283. Para a

obtenção das medidas de VC foi utilizado um potenciostato da marca Eco Chemie, Autolab, modelo PGSTAT 30.

Para a análise termogravimétrica (TG/DTG) e diferencial (DTA), o intervalo de temperatura utilizado foi de 0 a 600 °C, com uma razão de aquecimento (β) de 10 °C min⁻¹, em atmosfera de N₂, empregando o equipamento da marca TA Instruments, modelo SDT 2960. Para as análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi empregado equipamento da marca Mettler Toledo modelo DSC 1, em atmosfera de ar, com variados intervalos de temperatura, com razão de aquecimento (β) de 10 °C min⁻¹. Para a análise de infravermelho (IR) utilizou-se o equipamento da marca Bruker, modelo Vertex 70, intervalo de medida de 400 a 4000 cm⁻¹. A distância interplanar basal dos nanocompósitos foi investigada a partir da técnica de difração de raios X (DRX), utilizando-se de um equipamento da marca Siemens, modelo D-5000, Diffrac Plus XRD Commander, fonte da radiação incidente CuK α com detector de cintilação e monocromador de grafite, sendo os dados coletados em uma faixa angular (2θ) entre 5° e 80°, e passo de 1° min⁻¹. A caracterização morfológica dos filmes que constituíam o sensor construído foi realizada empregando-se um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, da marca JEOL, modelo 7500 F, operando sob tensão de 20 kV e ampliações no intervalo de 40 – 100.000 $\times$.

3.2 CONSTRUÇÃO DOS SENSORES

Neste trabalho foram utilizadas três sequências peptídicas diferentes que mimetizam o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase. Tais sequências foram propostas de acordo com estudos de modelagem molecular, realizados em colaboração pelo Prof. Dr. Marcello Mascini, da Universidade de Teramo, Itália (UniTE). Água purificada de qualidade Milli-Q foi utilizada para o preparo das soluções estoques dessas sequências, bem como nas posteriores diluições. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. Os aminoácidos presentes em cada sequência peptídica, a massa molecular e a concentração das soluções estoque são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Sequências peptídicas utilizadas

Sequência Peptídica	Sequência de aa	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Concentração (mol L ⁻¹)
1	NH ₃ ⁺ – <i>Glu</i> – <i>His</i> – Gly – Gly – Pro – <i>Ser</i> – COO ⁻	582,56	1,2 x 10 ⁻⁴
2	NH ₃ ⁺ – <i>His</i> – <i>Glu</i> – Trp – Arg – Pro – <i>Ser</i> – COO ⁻	810,86	2,5 x 10 ⁻³
3	NH ₃ ⁺ – <i>His</i> – <i>Glu</i> – Tyr – Lys – Pro – <i>Ser</i> – COO ⁻	759,81	3,0 x 10 ⁻³

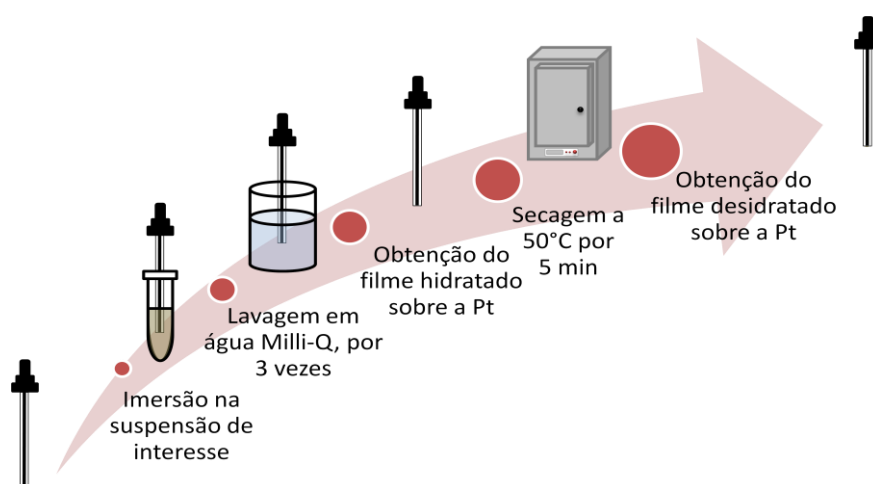
O material precursor utilizado na modificação da superfície eletródica foi obtido pela agitação de uma suspensão aquosa de montmorilonita 0,11 g L⁻¹ (SWy-1) durante 24 h. Para a modificação da argila com os peptídeos, levou-se em consideração a CTC da montmorilonita [12], adotando-se, então, a proporção de 10% (m/m) argila/peptídeo. Partindo das soluções estoque dos peptídeos, cada um deles foi adicionado, separadamente, à suspensão de argila, na proporção definida, e agitado por 24 h, obtendo-se assim a montmorilonita organofílica modificada com as sequências peptídicas 1, 2 e 3, as quais foram doravante denominadas mix 1, mix 2 e mix 3, respectivamente. A **Figura 11** apresenta o fluxograma da preparação das suspensões de argila e mixes.

Figura 11 – Fluxograma da preparação das suspensões de argila e mixes

O método de modificação utilizado neste trabalho foi o método de adsorção, utilizando a técnica de imersão. Essa técnica é tipicamente realizada pela imersão manual de um substrato planar na solução do material de interesse, seguida por três fases de lavagem para remover o material fracamente aderido [101-106]. A modificação foi realizada pela sequência de 3 imersões na suspensão de interesse (SWy-1, mix

1, mix 2 ou mix 3) com duração de 15 minutos cada, tomando-se o cuidado de efetuar a lavagem do eletrodo em água Milli-Q por imersão, sob agitação branda em 3 etapas de 5 s cada, após cada modificação. Para a formação do filme, o solvente foi evaporado em estufa a 50 °C, por 5 min. Tal procedimento está embasado em resultados anteriores ^[27], de análise térmica, os quais garantem a remoção suficiente da água de superfície e da água ligada mais fracamente no interior da região interlamelar, sem o comprometimento da mesma, permitindo a adesão da argila sobre o substrato de Pt. A **Figura 12** esquematiza o procedimento de construção do sensor.

Figura 12 – Representação esquemática da modificação do eletrodo de platina por imersão

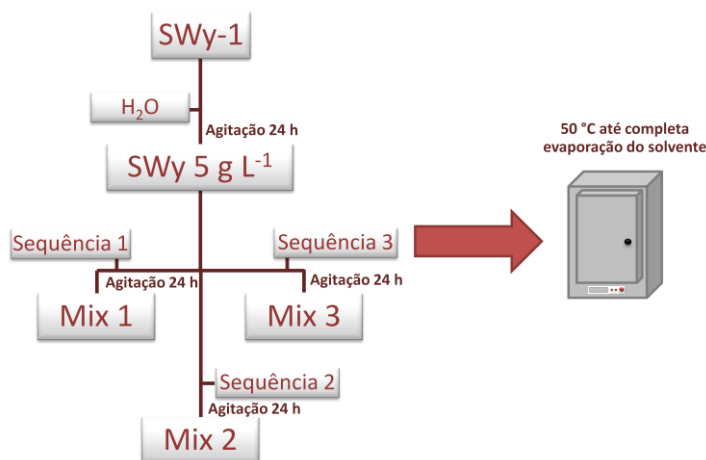


Fonte: Figura do autor

3.3 ESTUDO DA INTERAÇÃO ARGILA-PEPTÍDEOS

A fim de entender a influência dos materiais modificantes na superfície eletródica, primeiramente investigou-se a interação entre a argila montmorilonita e as sequências peptídicas. Para isso, foram utilizadas as técnicas de DRX, FTIR, TG/DTG, DTA e DSC e SEM. Para as técnicas de DRX e FTIR, foi preparado material sólido a partir de uma suspensão aquosa de SWy-1 5 g L⁻¹ agitada durante 24 h, e dos mix 1, 2 e 3, pela adição 10% em massa dos respectivos peptídeos à suspensão de argila, e agitados por mais 24 h. As suspensões resultantes foram secas em estufa à 50 °C para completa evaporação do solvente, resultando nos materiais sólidos. A **Figura 13** mostra o esquema com as etapas realizadas no preparo dos materiais sólidos.

Figura 13 – Representação esquemática da preparação do material sólido a partir das suspensões da argila e mixes



A difração de raios X é utilizada na análise de compostos cristalinos, fornecendo informações tanto qualitativa como quantitativa. A técnica é baseada na incidência da radiação sobre a amostra e na detecção do feixe difratado [107,108]. Essa técnica foi utilizada para a caracterização da argila, permitindo avaliar as variações no espaçamento basal das argilas modificadas em relação a sua precursora. As amostras sólidas de argila, mix 1, mix 2 e mix 3 foram enviadas ao GFQM-IQ para as medições de difração de raios X, que foram realizadas em triplicata.

Outra técnica importante para caracterização das amostras foi a espectroscopia na região do infravermelho. Essa técnica é muito utilizada em diferentes áreas da Química, podendo ser definida como um método instrumental utilizado na caracterização de diversas amostras, a partir da análise dos grupos funcionais presentes. A radiação eletromagnética interage com as moléculas ou átomos da amostra, resultando em um espectro [109,110]. É uma técnica bastante rápida, podendo ser aplicada na identificação de amostras nos estados sólidos, líquidos ou gasosos. Como a intensidade das bandas é proporcional à concentração dos componentes presentes, pode-se utilizar a técnica na realização de análises quantitativas. Dessa forma, a técnica é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura de uma argila e as possíveis interações com materiais intercalados [103]. Para a obtenção dos espectros de FTIR, as amostras sólidas da argila e dos mixes foram enviadas ao Laboratório Multiusuários de Análises Química – IQ para a realização das medições de infravermelho, as quais foram realizadas em triplicata.

Na técnica de termogravimetria (TG), a perda ou ganho de massa de uma amostra é monitorada em função do aumento de temperatura, enquanto ela é submetida a uma programação controlada de temperatura. Essa técnica permite a obtenção de informações referentes à estabilidade térmica da amostra, sua composição, bem como as alterações provocadas pelo aquecimento na massa das substâncias, entre outras informações. A termogravimetria derivada (DTG) é um arranjo matemático, no qual se registra a variação de massa em função do tempo (dm/dt)^[111]. A partir da técnica de DSC, com a qual mede-se a variação de ΔH como função do aquecimento e/ou resfriamento da amostra, é possível avaliar a estabilidade térmica das argilas e dos compostos intercalados durante o aquecimento ou resfriamento^[108]. Para a obtenção das curvas térmicas, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Análise Térmica – IQ, sob responsabilidade do Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro. Para as análises de TG/DTG e DTA utilizaram-se amostras sólidas da argila e dos mixes e para as análises de DSC foram utilizadas as respectivas suspensões.

A microscopia eletrônica de varredura é outra importante técnica de caracterização, que permite a obtenção de informações a cerca da morfologia, bem como sua correlação com a composição química da amostra desejada^[112]. Com essa técnica é possível avaliar diferenças na morfologia das partículas da argila e argilas modificadas quimicamente. Para as análises de microscopia os filmes de argila, mix 1, mix 2 e mix 3 foram formados pela deposição de 3 camadas das suspensões sobre substratos de platina, pelo método de imersão, e a cada camada depositada o substrato era lavado em água Milli-Q, levado a estufa a 50 °C por 5 min. As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução, localizado no prédio do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos em Nanotecnologia do Instituto de Química, Unesp – Araraquara.

3.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES

O comportamento eletroquímico dos sensores construídos foi avaliado por meio de EIS e VC. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a temperatura ambiente e empregando uma gaiola de Faraday. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Os diagramas de impedância para a Pt e eletrodos modificados foram obtidos na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do par redox $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$, e, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). As medidas EIS foram realizadas aplicando uma onda senoidal com amplitude de 15 mV(rms) em potencial de circuito aberto (E_{oc}), e registrando 10 pontos/década, no intervalo de frequência de 100 kHz a 10 mHz. Antes do registro dos dados do diagrama de impedância, todos os eletrodos foram submetidos ao mesmo programa de estabilização: 15 min no potencial de circuito aberto, seguido por 15 min aplicando o valor do E_{oc} com medição da corrente até que a estabilização fosse alcançada. Os valores de impedância foram analisados utilizando o software ZView2 (Scribner Associates Inc.).

As medidas foram realizadas inicialmente com o sensor contendo apenas argila, definido os parâmetros, para posteriormente realizar as medidas dos sensores construídos com mix 1, mix 2 e mix 3. Os parâmetros avaliados foram: o efeito da quantidade de camadas depositadas na superfície do eletrodo, o tempo de imersão nas suspensões, a razão argila peptídeo e a amplitude da onda senoidal.

3.4.2 Voltametria Cíclica (VC)

Os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de trabalho (Pt) e eletrodos modificados foram obtidos em meio a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe(CN)}_6$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), a 25°C , no intervalo de potencial de -0,7 a 0,5 V $\times \text{Ag|AgCl|KCl}_{(sat)}$, na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O efeito da variação da velocidade de varredura também foi avaliado, utilizando um intervalo de velocidade entre 50 e 200 mV s^{-1} , permitindo o cálculo da área eletroativa dos eletrodos modificados a partir da equação de Randless-Sevick ^[99,100] (2), na qual I_{pa} é a corrente de pico anódico, A é a área eletroativa do eletrodo, D é o coeficiente de difusão da espécie, n é o número de elétrons envolvidos no processo, v a velocidade de varredura e C_0 a concentração de espécie eletroativa.

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C_0 \quad (2)$$

3.5 AVALIAÇÕES DOS SENSORES FRENTE AO PESTICIDA

Os sensores construídos foram avaliados frente ao pesticida clorpirifós. Para isso, foi preparada uma solução estoque do pesticida com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tendo como solvente acetonitrila. As diluições posteriores foram realizadas utilizando água Milli-Q.

3.5.1 Análise da interação mix - pesticida

Antes da aplicação eletroquímica, foi realizado um estudo preliminar sobre a interação do pesticida selecionado com a argila e com os mixes, utilizando a técnica de DSC. Tal estudo permitiu avaliar as possíveis interações nos sistemas propostos e sugerir aquele que possui maior afinidade mix-pesticida.

3.5.1.1 DSC

Para as medidas de DSC foram utilizadas amostras em suspensão. A **Tabela 5** mostra as informações referentes à composição das amostras analisadas, bem como a faixa de temperatura, o volume de suspensão utilizado e a respectiva massa. As suspensões utilizadas foram: montmorilonita $0,11 \text{ g L}^{-1}$; mix 1 - 10% (m/m); mix 2 - 10% (m/m); mix 3 - 10% (m/m); clorpirifós $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata, em atmosfera de ar estático, em cadinhos de Al de 50 μL , sem tampa.

Tabela 5 – Informações referentes às amostras submetidas à análise DSC

Sistema	Componentes	Intervalo de Temperatura (°C)	Volume (μL)			Massa Total (mg)
			SWy-1, ou Mix	H ₂ O	Pesticida	
1	Argila	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	10	--	21,7
2	Mix 1	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	10	--	22,3
3	Mix 1 + Pesticida	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	--	10	24,3
4	Mix 2	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	10	--	20,4
5	Mix 2 + Pesticida	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	--	10	23,9
6	Mix 3	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	10	--	26,1
7	Mix 3 + Pesticida	25 $\rightarrow$ -40 $\rightarrow$ 200	10	--	10	26,0
8	Argila	Ciclo 1: 25 $\rightarrow$ -70 $\rightarrow$ 25 Ciclo 2: 25 $\rightarrow$ -70 $\rightarrow$ 25 Ciclo 3: 25 $\rightarrow$ -70 $\rightarrow$ 25 Ciclo 4: 25 $\rightarrow$ -70 $\rightarrow$ 80 $\rightarrow$ 25 Ciclo 5: 25 $\rightarrow$ -70 $\rightarrow$ 300	10	10	--	21,7

Sistema	Componentes	Intervalo de Temperatura (°C)	Volume (μL)			Massa Total (mg)
			SWy-1, ou Mix	H ₂ O	Pesticida	
9	Mix 1	Ciclo 1: 25 → -70 → 25	10	10	--	22,3
		Ciclo 2: 25 → -70 → 25				
		Ciclo 3: 25 → -70 → 25				
		Ciclo 4: 25 → -70 → 80 → 25				
		Ciclo 5: 25 → -70 → 300				
10	Mix 1 + Pesticida	Ciclo 1: 25 → -70 → 25	10	--	10	24,3
		Ciclo 2: 25 → -70 → 25				
		Ciclo 3: 25 → -70 → 25				
		Ciclo 4: 25 → -70 → 80 → 25				
		Ciclo 5: 25 → -70 → 300				

3.5.1.2 SEM

Avaliou-se também as alterações na morfologia dos filmes dos mixes após a incubação na solução de pesticida. Na construção dos filmes foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3, obtendo-se os substratos modificados com os mixes. Após esse procedimento, cada substrato foi incubado na solução do pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por 5 min, lavado em água Milli-Q e seco em estufa a 50 °C por 5 min, estando pronto para análise.

3.5.2 Influência do tempo de incubação

O parâmetro tempo de incubação do eletrodo no pesticida foi avaliado utilizando as técnicas de UV-Vis e VC. Na análise por UV-Vis foram utilizadas as suspensões dos mixes, adicionado 1 mL da solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, agitado manualmente por 5 s. Foram realizadas medidas consecutivas, em comprimento de onda de 200 nm, imediatamente após e nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 min após a adição do pesticida ao meio reacional. Após essa análise geral da influência do tempo, foi utilizada a técnica de VC para garantir que não haveria alteração no perfil eletroquímico com diferentes tempos de incubação. Nesse caso, foram utilizados os tempos de 5, 15 e 30 min de incubação, apenas para o mix 1, admitindo comportamento semelhante para os outros mixes.

3.5.3 Influência do pH

Visando verificar a influência do pH do eletrólito frente ao pesticida, foram realizadas medidas EIS para os três mixes. O ajuste de pH foi realizado utilizando soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. Os pHs verificados foram de 4, 5, 6, 7 e 8, uma vez que valores fora dessa faixa interferem diretamente na estrutura da argila e dos peptídeos.

3.5.4 Construção da curva analítica

Após estabelecidas as condições experimentais para a preparação dos diferentes mixes, foram construídas as curvas analíticas para os sensores. As faixas de concentrações utilizadas para cada sensor é apresentada na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Faixa de concentração de clorpirifós utilizada na construção da curva analítica para cada sensor

<i>Sensor</i>	<i>Menor Concentração (mol L⁻¹)</i>	<i>Maior Concentração (mol L⁻¹)</i>
1	1,0 x 10 ⁻⁸	1,0 x 10 ⁻⁷
3a	1,0 x 10 ⁻⁸	1,0 x 10 ⁻⁷
3b	1,0 x 10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁻⁶

A partir das curvas analíticas foram calculados os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada sensor, utilizando as equações (3) e (4).

$$LD = \frac{3S_D}{b} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10S_D}{b} \quad (4)$$

Onde S_D é o desvio padrão e b é o coeficiente angular da curva analítica.

3.5.5 Aplicação em amostras de alimentos

A eficiência do sensor construído foi testada pela medição da concentração de clorpirifós em amostra de tomate. As amostras foram adquiridas no comércio local, lavadas, cortadas e trituradas, com sementes e casca. Foi, então, pesado 2,0 g da amostra, adicionado 10 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH = 7,0 e levado a ultrassom por 15 min. Essa solução foi submetida a centrifugação a 10.000 rpm por 15 min. Do sobrenadante obtido foi pipetado 2,0 mL, fortificado com concentração conhecida do pesticida e diluído a 3,0 mL com KCl 0,1 mol L⁻¹. Essa metodologia está de acordo

com a literatura ^[113]. Os sensores construídos foram, então, incubados na amostra por 5 min, lavados e secos em estufa à 50 °C. A concentração de clorpirifós na amostra foi obtida pela interpolação na curva analítica, os desvios padrões foram calculados e as porcentagens de recuperação foram obtidas aplicando a equação (5). Todas as medições foram realizadas em triplicata.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{analito}]_{\text{encontrado}}}{[\text{analito}]_{\text{adicionado}}} \times 100 \quad (5)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL ARGILA-PEPTÍDEOS

4.1.1 Difração de raios X

A **Figura 14** apresenta os difratogramas de raios X obtidos para a argila sem modificação e para a argila modificada (mix 1, 2 e 3). No difratograma referente à argila pura há a presença de um pico de maior intensidade em 2θ igual a $28,7^\circ$ e um pico de menor intensidade em 2θ igual a 7° . A análise dos difratogramas dos mixes permite observar que para os mixes 2 e 3 ocorreu o deslocamento do pico de menor intensidade para menores valores de 2θ ($6,7^\circ$ e $6,9^\circ$, respectivamente). Esse deslocamento do pico de difração para menores valores de 2θ pode ser melhor visualizado na ampliação da região de baixos ângulos apresentada na **Figura 15**, e indica o aumento do espaçamento entre as lamelas da argila, resultante da intercalação das moléculas peptídicas. Este comportamento é natural, uma vez que a modificação da argila pela inserção de substâncias orgânicas ou inorgânicas, pode levar ao aumento ou diminuição da região interlamelar. Por outro lado, a análise do difratograma referente ao mix 1 mostra o aumento no valor de 2θ , de 7° para $7,4^\circ$, sugerindo que a distância interlamelar no mix 1, ao contrário dos outros mixes, diminuiu.

Figura 14 – Difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)

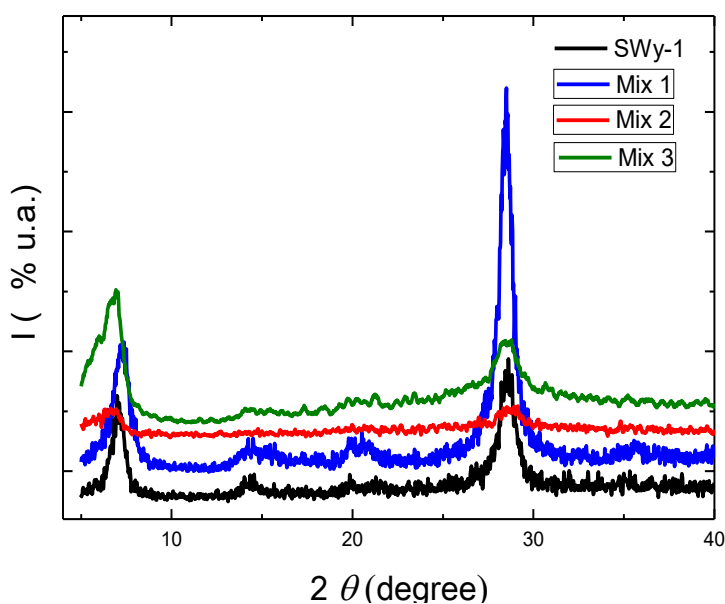


Figura 15 – Ampliação da região a baixos ângulos dos difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (—), mix 1 (—), mix 2 (—) e mix 3 (—)

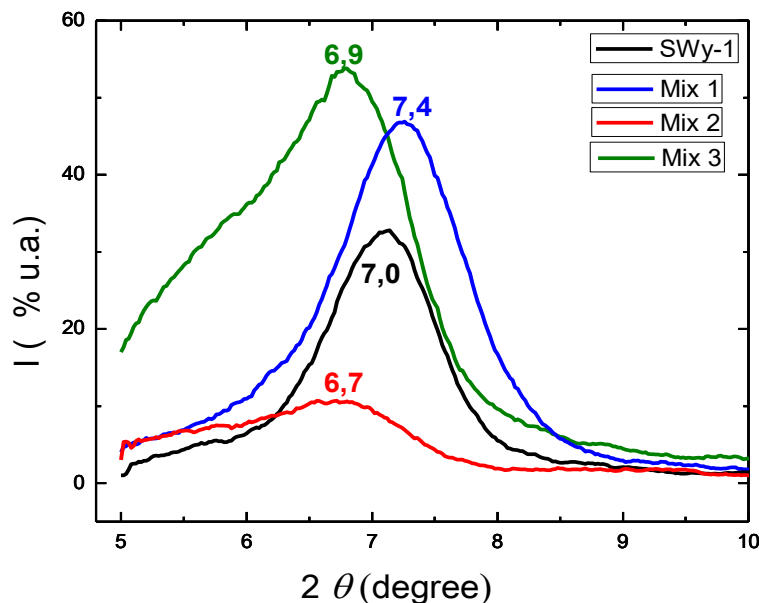


Tabela 7 – Valores d_{001} calculados para SWy-1, mixes 1, 2 e 3

Composto	d_{001} (Å)	Δd
SWy-1	12,56	--
Mix 1	11,99	-0,57
Mix 2	13,24	0,68
Mix 3	12,76	0,20

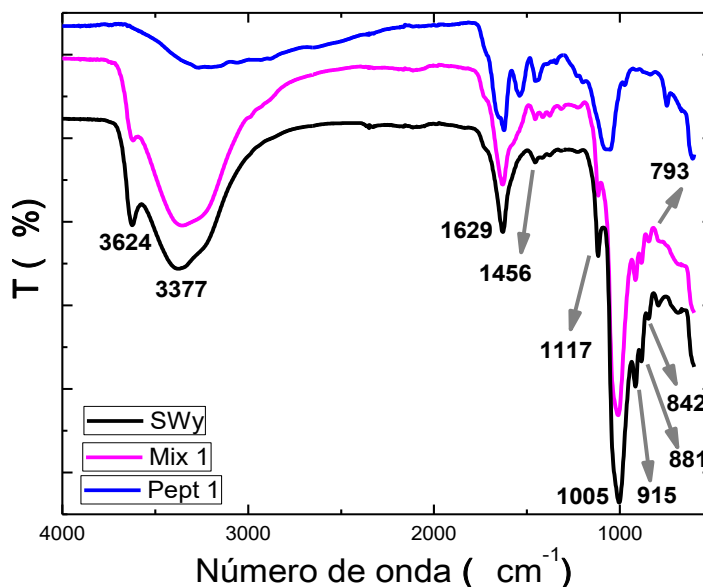
É observável também, que para os mixes 2 e 3, houve uma diminuição nos picos de maior intensidade, quando comparados ao da argila pura. Essa informação, aliada ao cálculo da distância d_{001} , mostrado na **Tabela 7**, permite inferir o aumento na região interlamelar, levando a confirmação de que as sequências peptídicas 2 e 3 estão inseridas nas lamelas da argila, justificando esses aumentos. Já para o mix 1, o aumento do pico de maior intensidade, juntamente com o cálculo da distância interlamelar mostrou uma diminuição no espaçamento basal da argila modificada. Provável motivo para essa diminuição pode ser atribuída a eliminação das moléculas de água presente no espaço interlamelar pela espécie inserida ou também ao tipo de intercalação da molécula peptídica entre as camadas da argila.

Levando em consideração todos esses aspectos, a análise dos resultados de DRX sugere a efetiva intercalação das sequências peptídicas na estrutura da argila, obtendo-se três compostos diferentes, quanto à estrutura e nas propriedades.

4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

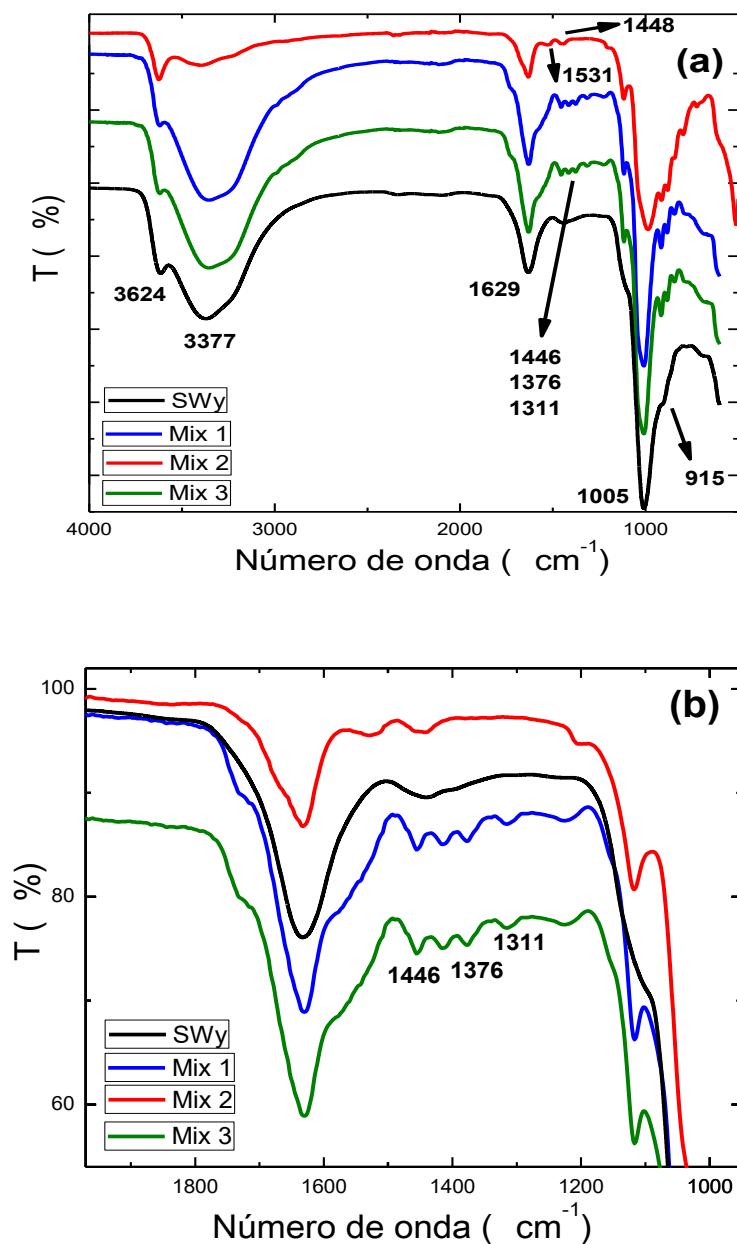
A primeira sequência de análises realizada foi argila, peptídeo 1 e mix 1, visando retirar informações acerca da contribuição de cada componente na formação do mix. Os espectros de infravermelho da argila, do peptídeo 1 e do mix 1 são apresentados na **Figura 16**.

Figura 16 – Espectros no infravermelho obtidos para a montmorilonita pura (-), o peptídeo 1 (-) e o mix 1 (-)



A **Figura 16** apresenta os espectros de IR obtidos para as diferentes amostras, sendo que a argila montmorilonita e o mix apresentaram bandas de absorção bem próximas. Porém ao se diminuir o número de onda houve o aparecimento de diferenças importantes entre esses espectros. As desconvoluções das curvas (Software: Origin 8.0, função Lorentziana) indicaram que o espectro do mix é o possível resultante da contribuição dos espectros da argila e do peptídeo, indicando que, de fato, houve a interação do peptídeo-argila, resultando em um compósito. A **Figura 17 a** mostra os espectros obtidos para a montmorilonita, bem como para os mixes 1, 2 e 3, e a **Figura 17 b** mostra a ampliação da região de número de onda de 2000 a 950 cm^{-1} .

Figura 17 – (a) Espectros no infravermelho obtidos para a SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-); (b) Ampliação da região de número de onda de 2000 a 950 cm^{-1}



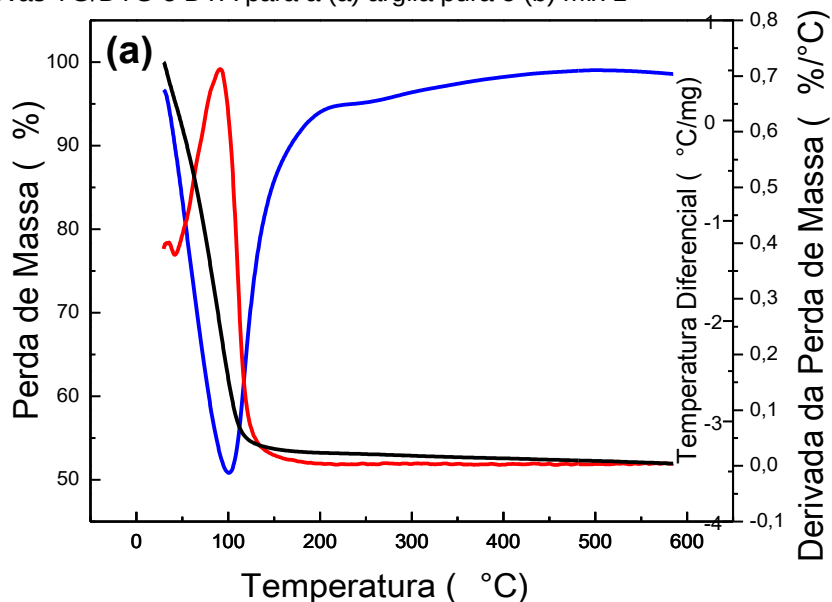
As possíveis vibrações atribuídas às bandas dos mixes estão apresentadas na **Tabela 8**. É possível notar a presença de bandas na região entre 1440 e 1456 cm^{-1} no espectro dos mixes, melhores visualizadas na **Figura 17 b**, as quais não estão presentes no espectro da argila, indicando a efetiva modificação da argila, nos três casos. Esses resultados estão de acordo com os resultados de DRX obtidos, os quais indicaram a formação dos três compostos dos mixes.

Tabela 8 – Bandas atribuídas para o espectro obtido no infravermelho dos mixes

Número de Onda (cm ⁻¹)	Modos Vibracionais
3624	vibração de estiramento do grupo hidroxila referente à água adsorvida entre as lamelas
3377	vibração de estiramento do grupo OH referente à água adsorvida
1629	deformação angular da água de hidratação deformação vibracional do grupamento H-O-H
1440 - 1456	deformação angular no plano de grupos CH ₂ normalmente verificada em argilas modificadas quimicamente, pela inserção de grupos orgânicos em sua estrutura
1376, 1311	bandas características das ligações C-N em compostos aromáticos , possivelmente oriundos dos peptídeos
1117	bandas características das ligações Si-O
1005	bandas características das ligações Si-O-Si
915, 881, 842, 793	bandas características das camadas octaédricas do aluminossilicato Si-O-Al

4.1.3 Análise térmica

Primeiramente, foi analisada a interação da sequência peptídica 1 com a argila, por meio de análise térmica TG/DTG. As curvas obtidas para a argila pura e o mix 1 são apresentadas nas **Figuras 18 e 19**, respectivamente.

Figura 18 – Curvas TG/DTG e DTA para a (a) argila pura e (b) mix 1

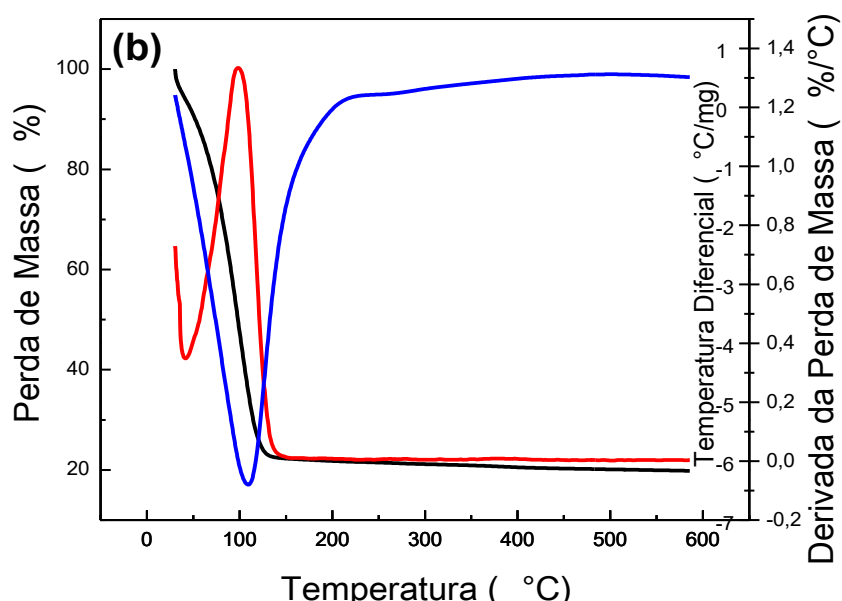
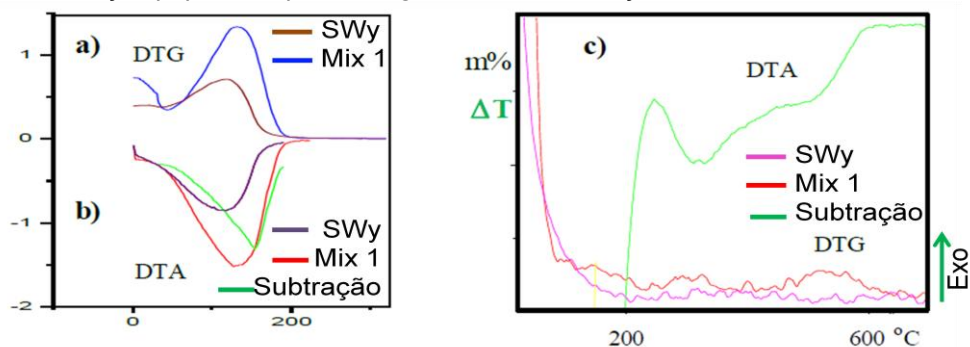


Figura 19 – Remoção de água: a) DTG: argila pura, mix 1; b) DTA: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA. Remoção peptídeo: c) DTG: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA



A comparação das figuras revela um aumento de intensidade no pico de DTG, ao se comparar a SWy-1 e o mix 1, refletindo na variação da massa do solvente presente na superfície da argila e no interior da região interlamelar da argila. Esta diferença na quantidade de solvente presente na região interlamelar do mix 1 está refletido no incremento de 10 °C na temperatura de pico do mix 1 e sua colaboração fica explícita a partir da diferença das curvas DTA (**Figura 19** - curva verde). Tal comportamento permite sugerir a incorporação da molécula orgânica utilizada na preparação do mix 1.

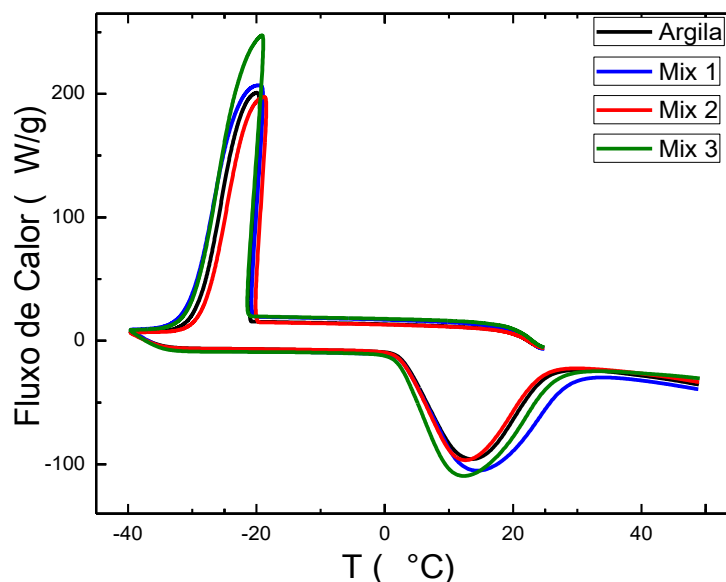
O resultado da operação matemática para as curvas DTA mostra claramente que a inserção do peptídeo altera o perfil das curvas. A curva resultante da subtração das curvas DTA, **Figura 19 c** - curva verde, e **Figura 19 b** - curva verde, evidencia a contribuição de massa de água carregada com a inserção da molécula do peptídeo na região interlamelar. Na **Figura 19 c**, curva DTA (verde), em concordância com as curvas DTG magenta (argila) e vermelha (mix 1), evidenciam

sinais endotérmicos com T_{pico} em: 190 - 210 °C possivelmente referente à degradação inicial do peptídeo, 390 °C remoção de partes do peptídeo retido na região interlamelar devido ao fechamento da região com o aumento da temperatura, e a 552 °C, remoção de água de constituição da argila colapsando a estrutura [102].

Após a análise TG/DTA para o mix 1, comprovando que existe interação entre argila e peptídeos, a técnica térmica escolhida para análise das próximas sequências peptídicas foi DSC, por ser uma técnica mais sensível, permitindo um maior número de informações sobre essas interações.

A **Figura 20** apresenta as curvas térmicas de DSC para a montmorilonita e para os mixes, sistemas 1, 2, 4 e 6 apresentados na **Tabela 5**. Pode-se observar que todas as suspensões apresentam o mesmo perfil térmico, com poucas variações entre eles. A análise dessas curvas deve ser realizada por partes, para que nenhum processo acabe passando despercebido. Interpretando inicialmente o intervalo de temperatura de 20 a -20 °C é possível verificar que não há ocorrência de processos relevantes obtendo apenas uma pequena variação na linha de base, a qual deve estar associada a quantidade de água presente em cada suspensão (**Figura 21 a**).

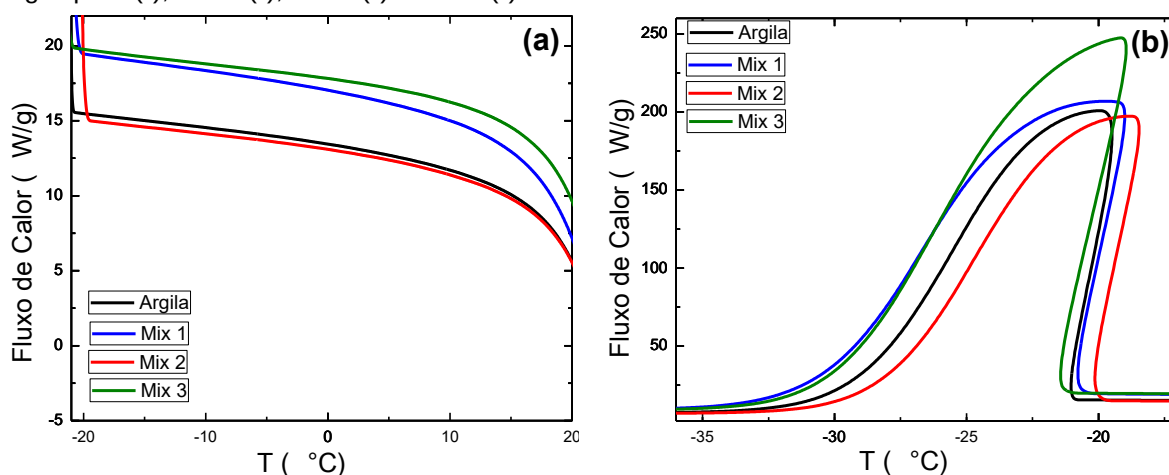
Figura 20 – Curvas DSC para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)



Seguindo a curva de resfriamento observa-se que as diferentes suspensões apresentam diferenças no pico de congelamento da água, com os valores de T_{onset} variando entre -20 e -21°C (**Figura 21 b**). Esse valor pode estar relacionado com o

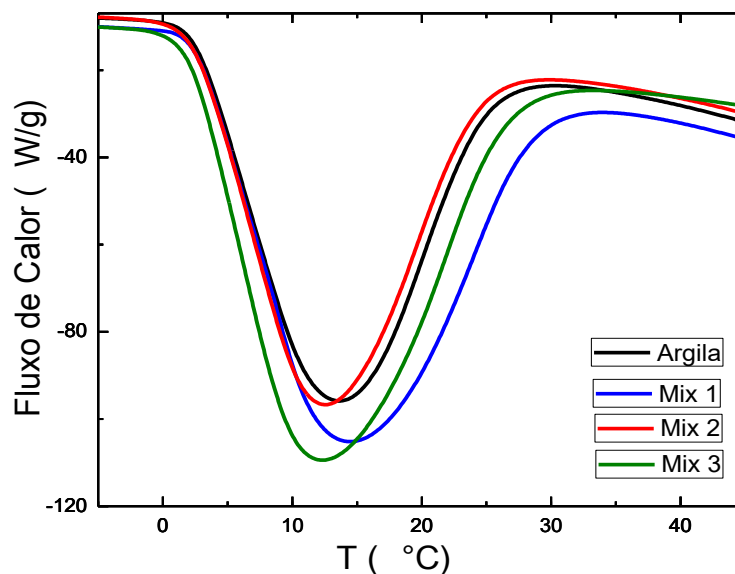
congelamento da água, que ocorre por volta de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As temperaturas de pico para todos os compostos são, por volta de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, menos negativas que as T_{onset} , indicando que a cinética de congelamento dessas moléculas de água é rápida, o que acaba liberando calor e aquecendo o sensor. O pico de fusão referente ao mix 2 foi o que apresentou maior deslocamento para temperaturas mais baixas, indicando maior facilidade na cristalização dessas moléculas de água. Isso pode ser justificado pela estrutura tridimensional que se observa a partir da imagem SEM (**Figura 26 - d**). Os mixes 1 e 3 apresentaram comportamentos semelhantes.

Figura 21 – Ampliação das curvas DSC de resfriamento em diferentes intervalos para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)



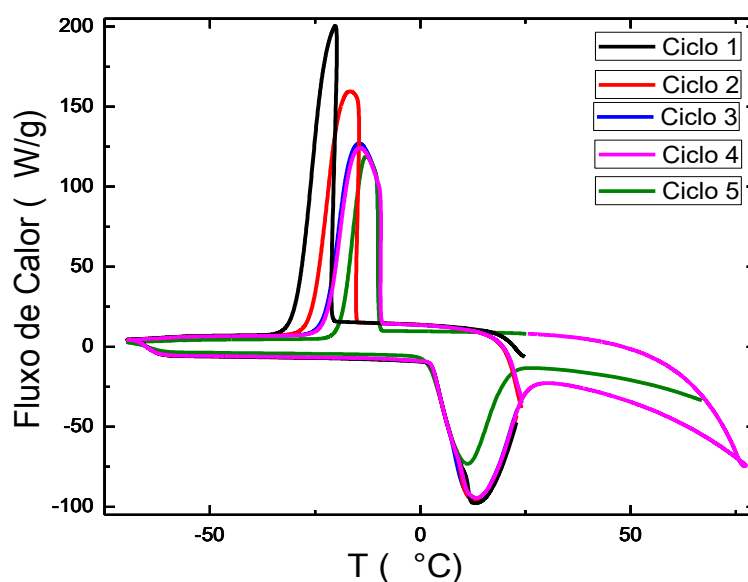
Analisando a curva de aquecimento, na primeira região, antes do pico de fusão da água, em temperaturas entre -40 e $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, não há evidências de informações relevantes. O pico endotérmico referente à fusão da água apresenta valores diferentes de T_{onset} e T_{pico} para todas as suspensões (**Figura 22**). Os valores de T_{onset} para argila, mix 1, mix 2 e mix 3 são, respectivamente, $2,5$, $2,4$, $2,0$ e $1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$; enquanto os valores de T_{pico} para a mesma sequência de materiais são $13,7$, $14,7$, $12,5$ e $12,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essas diferenças, tanto nas temperaturas de cristalização quanto nas temperaturas de fusão, indicam que cada um dos mixes estruturam a água ao seu redor de maneiras diferentes, devido às diferentes interações de cada sequência peptídica com a montmorilonita.

Figura 22 – Ampliação das curvas DSC de aquecimento no intervalo de -5°C a 45°C para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)



Na sequência foi realizada uma análise cíclica utilizando, inicialmente, a suspensão de argila (sistema 8), conforme mostra a **Tabela 5**. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 23**.

Figura 23 – Análise cíclica: curvas DSC para argila montmorilonita. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv1} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_{inv2} = 80^{\circ}\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70^{\circ}\text{C}$, $T_f = 300^{\circ}\text{C}$



Pela análise da **Figura 23** pode-se observar que na curva de resfriamento o valor da T_{onset} do primeiro ciclo é de -22°C , podendo ser relacionada com o supercongelamento da água ($T \sim -20^{\circ}\text{C}$), sistema no qual qualquer perturbação leva a solidificação imediata. Na medida em que os ciclos vão correndo, o sistema vai

sendo resfriado e aquecido, fazendo com que a T_{onset} no último ciclo chegue a um valor de -9°C , e observando, também, um alargamento no sinal de congelamento da água. Essas modificações podem ser atribuídas, possivelmente, a dois fatores: a deposição do material no fundo do cadinho na medida em que ocorre o resfriamento e o aquecimento, uma vez que a suspensão não foi agitada entre um ciclo e outro; ou a perda de água de cristalização da argila, de dentro dos tactóides. Assim, há o indicativo de estar havendo a perda de estabilidade do sistema em questão, refletido na variação dos picos de cristalização da água.

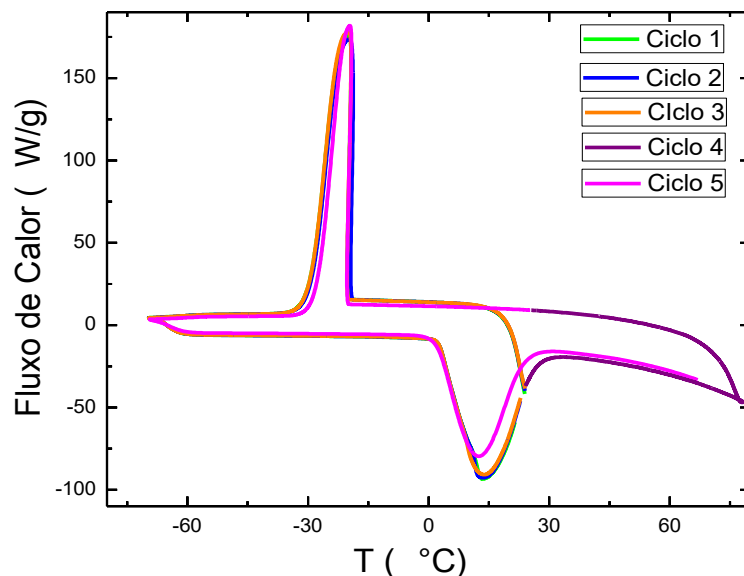
Analisando a curva de aquecimento, no intervalo de -70°C a 0°C , não é possível verificar informações relevantes, mas é importante aqui destacar tal fato, uma vez que essa região permite a diferenciação entre a argila pura e argilas modificadas. Destaca-se também o fato da argila estar em perfeitas condições de uso, não causando nenhum tipo de interferência, o que pode ser verificado justamente pela ausência de sinal nesse intervalo.

Também na curva de aquecimento é possível observar a região de fusão da água. Nesse sentido, cabe lembrar que a argila se apresenta na forma de suspensão coloidal estável, e pode ter sua estrutura modificada devido aos diversos ciclos de resfriamento e aquecimento. Essa modificação na estrutura pode se dar devido a redistribuição das moléculas de água. A menor intensidade observada no último ciclo (curva verde) é resultado da evaporação prévia das moléculas de água, uma vez que no ciclo anterior houve o aquecimento do sistema a uma temperatura de 80°C . Na última região a ser analisada, a partir de 125°C , também não se observa nenhum fenômeno a não ser variação na linha de base, informação essa também de relevante importância para análises futuras.

Após a análise de argila, analisou-se então, o mix 1, sistema 9 apresentado na **Tabela 5**. A **Figura 24** mostra as curvas térmicas obtidas.

A primeira vista, já é possível observar diferença no perfil das curvas térmicas para o mix 1 em relação a argila. Nesse composto não houve o deslocamento dos picos de congelamento com o aumento do número de ciclos, sendo essa a primeira evidência da interação argila-peptídeo, corroborando com os resultados de TG/DTA apresentados e imagens SEM apresentadas adiante (**Figura 26**).

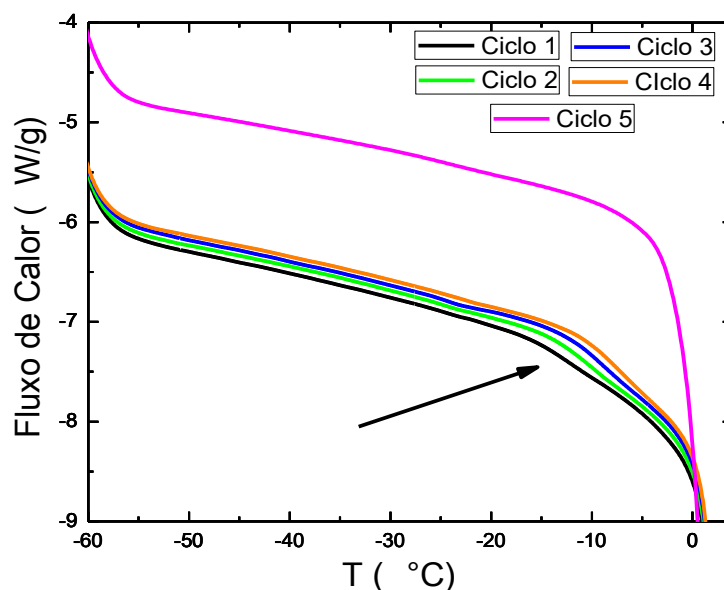
Figura 24 – Análise cíclica: curvas DSC para mix 1. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv1} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv2} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$



Entre o primeiro e o último ciclo há um estreitamento de picos, porém todos possuem inclinações bem próximas, apresentando, apenas, um sutil aumento a medida que tende-se para o último ciclo. Isso significa que ao congelar há uma grande liberação de energia, muito maior do que quando a água se encontra apenas sobre a argila pura (**Figura 23**). Isso fica evidenciado pelos valores T_{onset} e T_{pico} para a argila e para o mix. No primeiro caso há uma considerável separação de picos (**Figura 23**), já no caso do mix não há essa separação, obtendo-se um efeito muito semelhante entre os ciclos, indicando não haver perda de água no processo de congelamento e descongelamento, como visto para a argila pura. Dessa forma, a interação do peptídeo 1 com a montmorilonita aumenta a estabilidade do sistema, refletida na não separação dos picos de congelamento da água a medida em que os ciclos acontecem.

A análise da curva de aquecimento, na região de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, permite a observação de fenômenos interessantes. Da mesma forma que acontece no material precursor, a medida que os ciclos vão correndo, observa-se uma mínima diferença na linha base, que está relacionada, conforme dito anteriormente, com a diminuição na quantidade de água total do sistema. A **Figura 25** mostra a ampliação da região entre -60 e $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir da qual é possível verificar a presença de um pequeno sinal, nos primeiros ciclos.

Figura 25 – Ampliação das curvas DSC do mix 1 na região de -60 a 2°C



Observa-se a presença de um sinal exotérmico em regiões negativas de temperatura. Comportamentos desse tipo sugerem a presença de outro tipo de água na estrutura do material, denominada “água ligada congelável”, moléculas essas que estão ligadas ao material por ligações de curta distância, de forma que se congelam na varredura contrária. Esse tipo de água é importante, por exemplo, no caso de polímeros, pois permite sua biocompatibilidade. Dessa forma, a presença do peptídeo na superfície da argila confere a esta um caráter organofílico, tornando-se um sistema biocompatível. No último ciclo o sinal desaparece, reforçando a idéia de que esse sinal é associado a água presente no sistema, ou seja, a água que por algum motivo está descongelando antes da sua temperatura ideal.

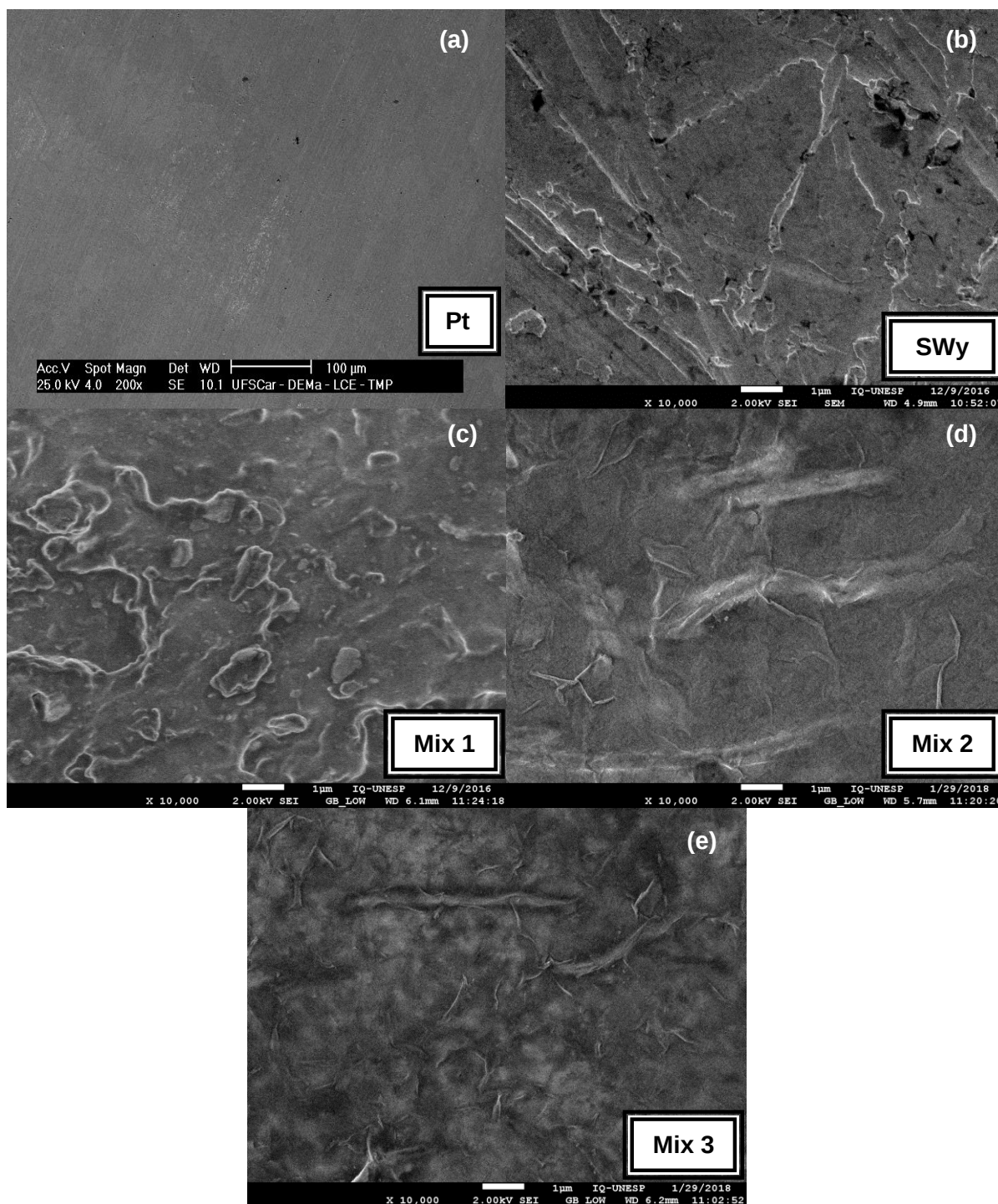
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia foram realizadas para avaliar a morfologia dos filmes de nanocompósitos depositados sobre a superfície do eletrodo.

A deposição da argila na superfície do substrato de platina se dá na forma de placas depositadas sobrepostas, observadas a partir das regiões de contorno, esbranquiçadas, presente no filme de SWy-1. Comportamento desta natureza é comum para este tipo de argila. É visível que toda a superfície do substrato está recoberta pelo filme de argila, porém essa cobertura não acontece de forma homogênea, em termos de espessura, muito possivelmente, uma vez que a deposição ocorre ao acaso. Como o filme de argila formado é muito fino, consegue-

se observar, mesmo estando recoberto, ranhuras presentes no substrato de platina ao fundo.

Figura 26 – Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o (a) substrato de platina e para os filmes de (b) montmorilonita, (c) mix 1, (d) mix 2 e (e) mix 3



Por outro lado, para o depósito do mix 1, observa-se uma conformação totalmente diferente da argila pura, não se observando mais o substrato de platina.

Considerando tal situação é possível sugerir que o filme depositado apresenta-se mais espesso que o filme obtido para a argila pura. Deve-se, ainda, salientar que com a inserção da molécula do peptídeo a argila se transforma em um compósito, denominado argila orgânica/organofílica, como dito anteriormente. A formação deste compósito modifica totalmente a formação das placas, no processo de deposição mecânica, gerando “placas” que são menores que as placas da argila pura. Com a incorporação do peptídeo, os tactóides podem se unir pelas extremidades no plano XY, crescimento preferencialmente bidimensional e, ou apresentar um crescimento tridimensional, como verificado no caso das argilas modificadas com a molécula de 8-hidroxiquinolina-Fe(III) ^[26].

O mix 2 e o mix 3 apresentam comportamentos semelhantes, nos quais também é possível sugerir a presença do filme, uma vez que a imagem não apresenta as ranhuras esperadas na superfície da platina devido ao polimento, permitindo inferir que o substrato está recoberto por filmes mais espessos. Para o mix 2 observou-se uma estrutura filamentosa, tridimensional, sem a presença de placas, quando comparado ao mix 1. Já o mix 3, também apresentou estruturas filamentosas, com ocorrência de placas que parecem crescer bidimensionalmente, porém essas placas são significativamente maiores que as do mix 1.

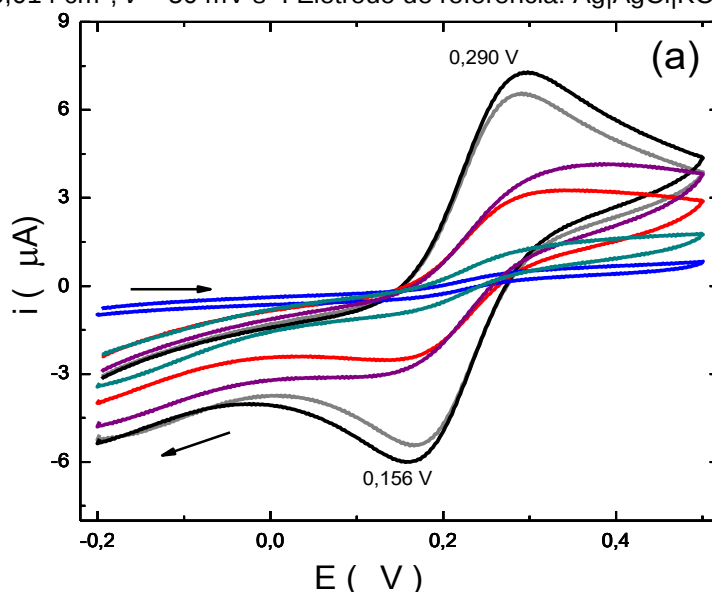
Os arranjos superficiais dos mixes apresentaram-se totalmente diferentes do arranjo da argila, indicando a formação de argilas organofílicas. As partículas formadas pela incorporação do segundo e do terceiro peptídeo, apresentam-se diferentes das observadas para o mix 1, fato esperado devido às suas diferentes estruturas. Tais diferenciações ficam evidentes ao se comparar os picos observados na Figura 21: ao se retirar água do sistema, a orientação de formação dos tactóides ocorre de forma distinta, indicando que a retenção das moléculas de água em cada sistema é diferente. Assim, as interações ocorridas nos três compósitos são distintas, resultados de ações diferentes de cada um no momento em que ocorre a junção dos tactóides da argila que estão separados, levando a coberturas superficiais distintas, e para coberturas distintas, portanto, é de se esperar comportamentos distintos.

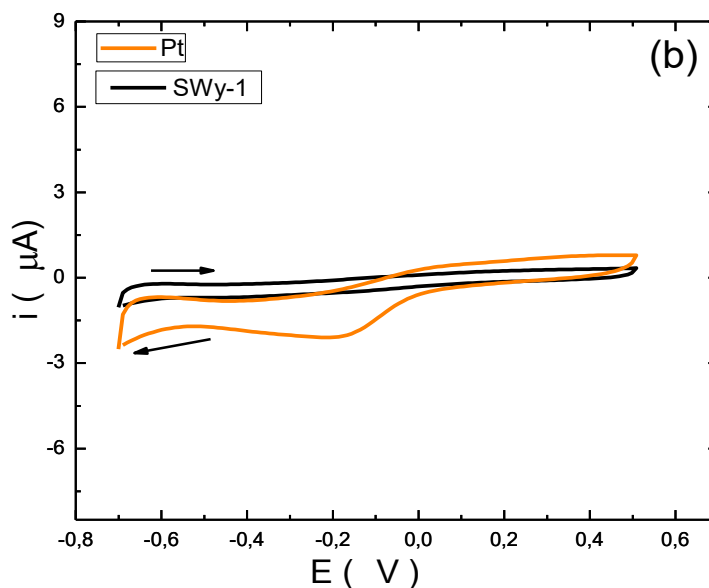
4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS SENSORES

Iniciou-se o estudo eletroquímico com a modificação do eletrodo de platina pela suspensão de montmorilonita, avaliação esta que serviu como base para a análise do comportamento eletroquímico dos sensores construídos com os mixes. O primeiro parâmetro analisado foi a quantidade de camadas depositadas na superfície do eletrodo. Esses ensaios são bem caracterizados na literatura [24, 26, 28]. Sabe-se que com o aumento das camadas de modificação com argila na superfície da platina, o sinal eletroquímico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ diminui, indicando a eficiência do recobrimento, uma vez que o filme de argila é um mau condutor, impedindo que as espécies em solução cheguem a superfície da platina para serem oxidadas/reduzidas, como pode ser verificado na **Figura 27**.

O VC da Pt mostra picos bem definidos nas varreduras direta e reversa, os quais estão associados às espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ presentes em solução, uma vez que na ausência do par redox não há o aparecimento de tais picos, como verificado na Figura 27 b.

Figura 27 – (a) VCs obtidos para o eletrodo modificado com diferentes camadas de SWy-1 na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Pt (-), 1 camada (-), 2 camadas (-), 3 camadas (-), 4 camadas (-), 5 camadas (-). (b) VCs para o eletrodo sem modificação e modificado com 3 camadas do filme de SWy-1 apenas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$



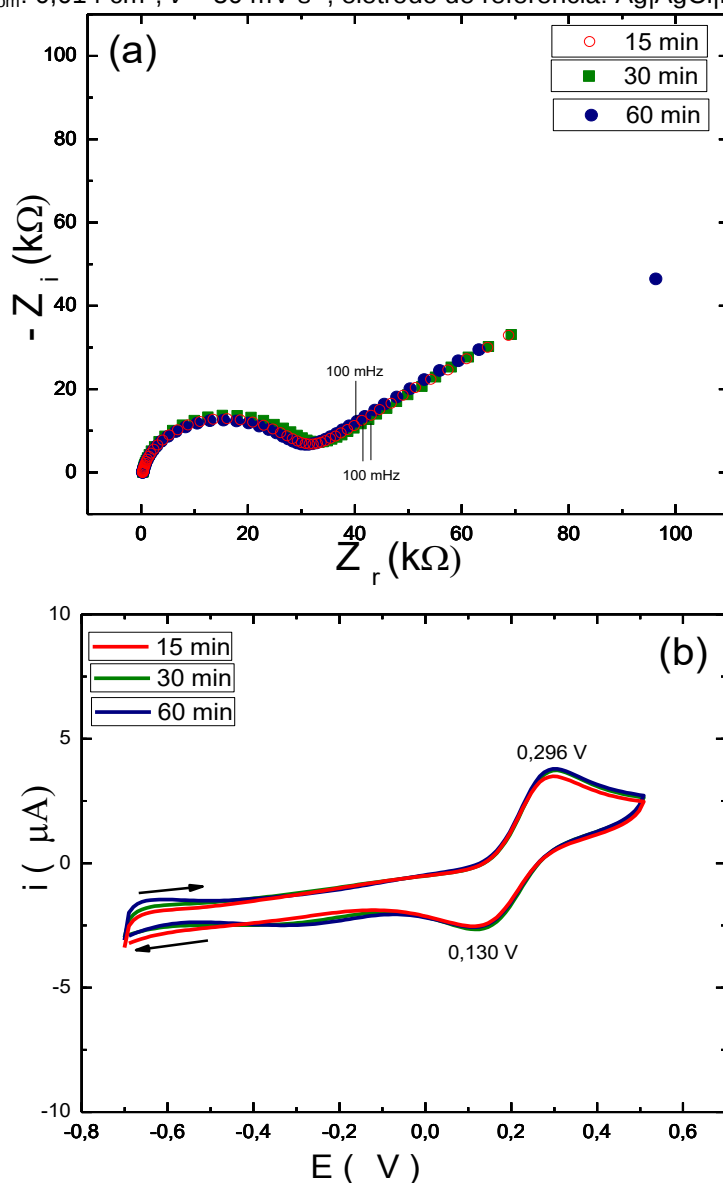


A análise dos voltamogramas sugere um bom recobrimento da superfície do eletrodo a partir de duas camadas do filme de argila, avaliada pela diminuição da intensidade das correntes de pico. A fim de garantir a efetiva modificação da superfície eletródica e minimizar as possíveis variações nas medidas eletroquímicas, determinou-se como suficiente e apropriada a escolha de 3 camadas de filme para construção dos sensores.

Definido o primeiro parâmetro, passou-se então para avaliação da influência do tempo de imersão do eletrodo na suspensão. Para isso, foram utilizados os tempos de 15, 30 e 60 min e os resultados são mostrados na **Figura 28**. Para todas as medidas de EIS a estabilização da corrente e do potencial foi obtida após 30 minutos, tendo o E_{OC} valor aproximado de 0,230 V ao início de cada medida.

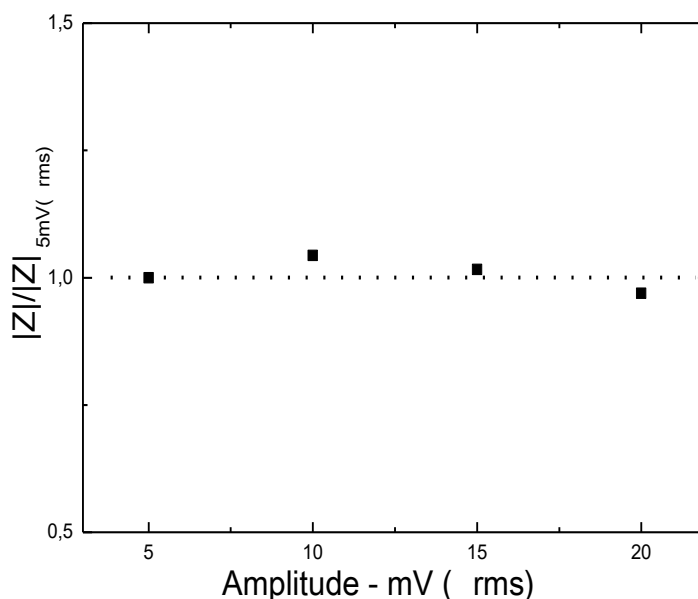
Para os diagramas de Nyquist obtidos nos diferentes tempos de imersão os valores de resistência a transferência de carga não apresentaram grandes diferenças, sendo obtidos 31,6, 29,8 e 30,2 k Ω para os tempos de 15, 30 e 60 min respectivamente. Da mesma forma, pequena diferença foi observada para as intensidades de correntes de pico nos voltamogramas, indicando a eficiência do recobrimento da superfície já com 15 min de imersão. Portanto, esse tempo foi determinado para os ensaios posteriores.

Figura 28 – (a) Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com SWy-1, nos diferentes tempos de imersão, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0. (b) voltamogramas cíclicos obtidos nas mesmas condições, com eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; eletrodo de referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$



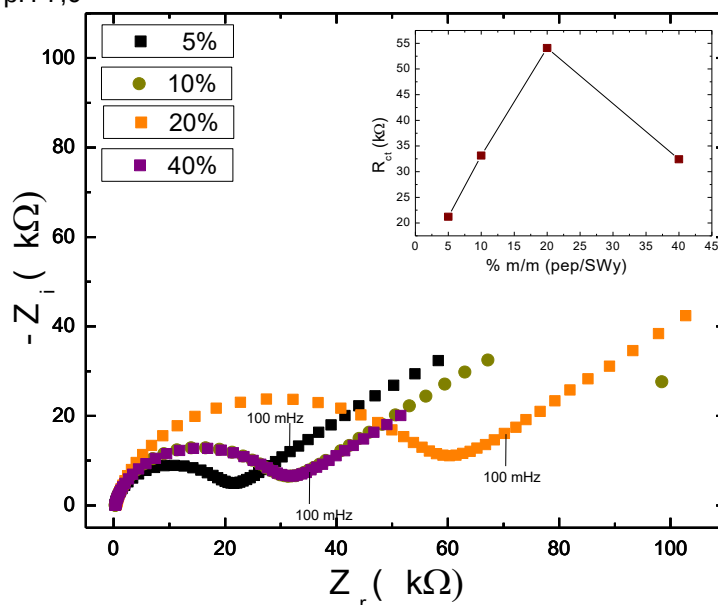
Subsequentemente analisou-se o parâmetro de amplitude da onda senoidal. Para tanto, aplicou-se amplitudes nos valores de 5, 10 15 e 20 mV (*rms*), a uma frequência de 50 mHz. A **Figura 29** mostra que todas as amplitude são adequadas para os ensaios, sendo a que mais se aproxima da linearidade é a de 15 mV (*rms*), e, portanto, a definida para os ensaios posteriores.

Figura 29 – Relação entre $|Z|/|Z|_{5\text{mV(rms)}}$ e diferentes amplitudes, aplicadas a uma frequência de 50 mHz



Após definido a quantidade de camadas do filme, o tempo de imersão e a melhor amplitude para o sistema avaliou-se a razão massa/massa de argila: peptídeo para a formação do mix. Para essa avaliação utilizou-se a sequência peptídica 1, nas razões de 5, 10, 20 e 40% em massa do peptídeo em relação a massa de argila. A **Figura 30** traz os diagramas de Nyquist para esses ensaios.

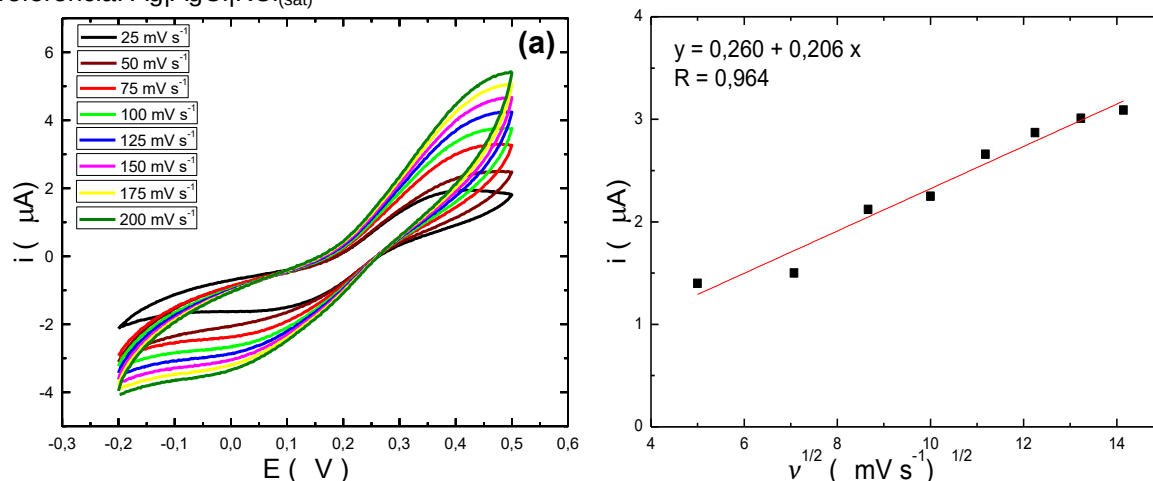
Figura 30 – Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com mix 1 nas diferentes razões argila:peptídeo, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0

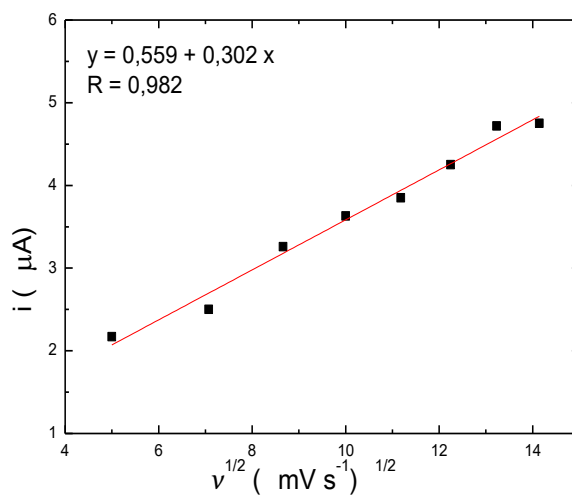
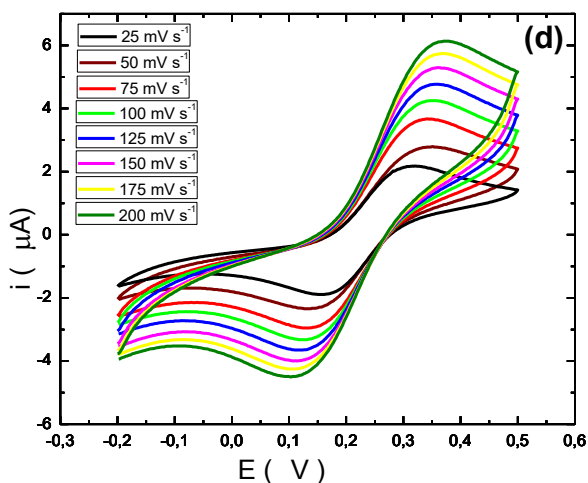
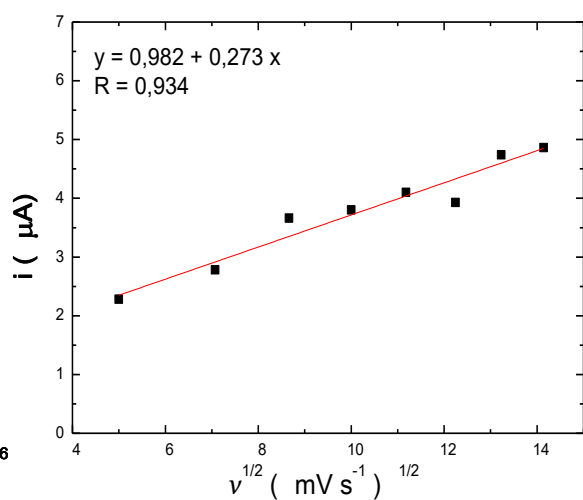
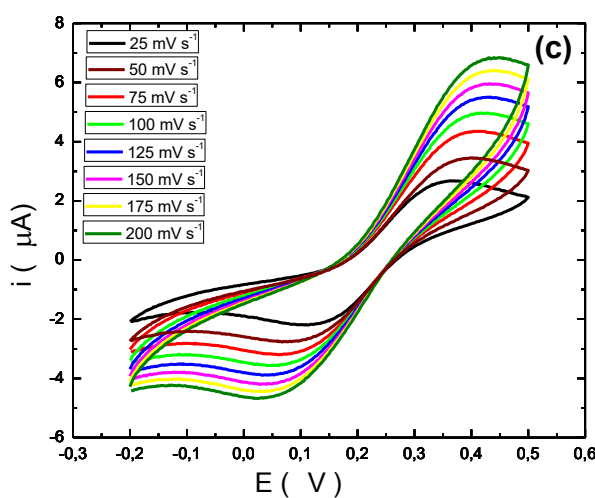
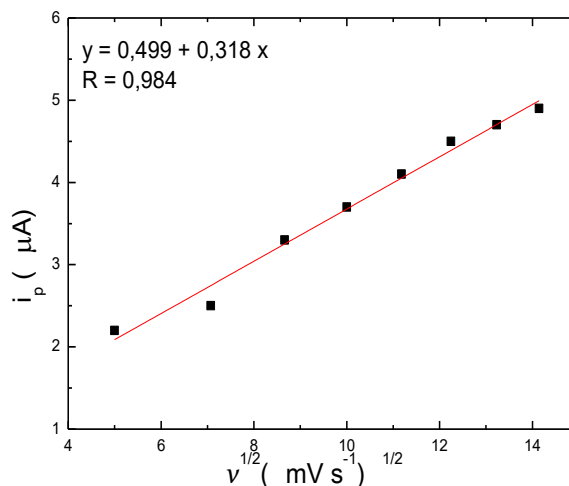
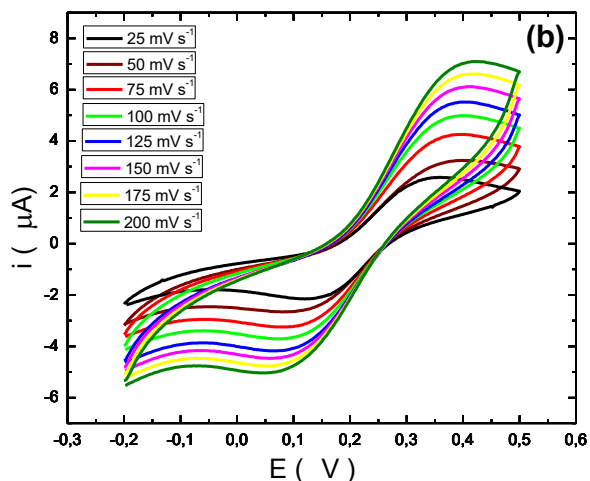


A resistência à transferência de carga aumenta com o aumento da razão de peptídeo na suspensão, até 20%. Quando se tem 40% em massa de peptídeo, possivelmente, há um excesso do material biológico em suspensão, fazendo com que a interação com a argila seja dificultada, o que leva a uma diminuição no arco capacitivo, indicando a presença de menor quantidade de material na superfície do eletrodo. Para garantir que todo o peptídeo adicionado realmente interagisse com a argila, a razão utilizada foi de 10% em massa de peptídeo em relação à massa da argila. Após o ajuste dos parâmetros, iniciou-se a investigação eletroquímica dos sistemas.

A fim de investigar a caracterização da superfície e os mecanismos de transferência eletrônica das diferentes espécies presente na superfície do eletrodo, as técnicas de VC e EIS foram utilizadas. Os sensores foram construídos conforme descrito no item 3.2, e o primeiro passo foi calcular a área eletroativa dos eletrodos modificados. Para isso, utilizou-se VC variando-se as velocidades de varredura de 50 a 200 mV s^{-1} , na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0, os resultados são apresentados na **Figura 31**.

Figura 31 – VCs e relação de i_{pa} em função de $v^{1/2}$ para os eletrodos modificados com (a) SWy-1, (b) Mix 1, (c) Mix 2, (d) Mix 3, nas diferentes velocidades de varredura, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0; eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$. Eletrodo de referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$





Para todas as modificações houve linearidade na curva da i_p vs. $v^{1/2}$. Como os coeficientes angulares dessas curvas representam o valor da relação i_p vs. $v^{1/2}$, esses valores puderam ser diretamente aplicados na equação (2) obtendo-se a área eletroativa dos eletrodos. As modificações diminuíram a área eletroativa do eletrodo de platina, obtendo-se valores de 0,22, 0,27, 0,23 e 0,26 cm², para os eletrodos

modificados com SWy-1, mix 1, mix 2 e mix 3, respectivamente. Fato esperado, uma vez que a modificação com a argila aumenta a resistência a passagem de corrente, uma vez que é um mau condutor em comparação com a platina. Verificou-se que a incorporação das sequências peptídicas 1 e 3 na estrutura da argila promoveu interações que resultaram no aumento da área eletroativa quando comparados à montmorilonita pura. Já a incorporação do peptídeo 2, não levou a uma alteração significativa da área, indicando que a interação argila-peptídeo ocorre de uma maneira diferentes das outras duas.

A **Figura 32** apresenta a comparação entre os VCs obtidos para os diferentes sensores, nas mesmas condições e a **Tabela 9** traz uma comparação dos valores potenciais de picos obtidos para cada caso.

Figura 32 – VCs obtidos para o bare (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-) na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl_(sat)

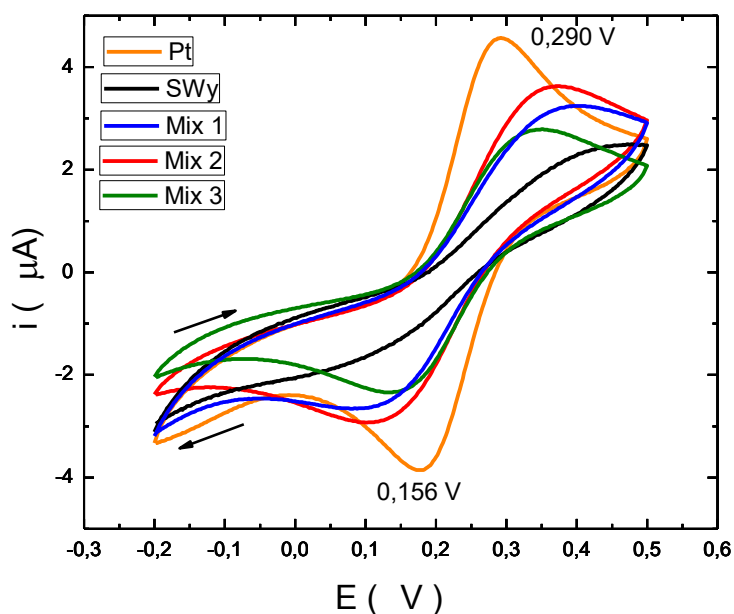


Tabela 9 – Valores de E_{pa} , E_{pc} e ΔE_p obtidos para os diferentes sensores

Sensor	$E_{pa} \text{ (V)}$	$E_{pc} \text{ (V)}$	ΔE_p
Pt	0,291	0,177	0,114
SWy-1	0,425	0,101	0,324
Mix 1	0,394	0,119	0,275
Mix 2	0,400	0,090	0,310
Mix 3	0,347	0,142	0,205

Para o eletrodo sem modificação, um voltamograma típico do ferricianeto foi obtido, com correntes de pico em +0,291 V (pico anódico) e +0,177 V (pico catódico). As modificações da superfície eletródica com SWy-1 e mixes alteraram os potenciais de pico, como visto na **Tabela 9**. Sequaris ^[114] relata semelhante modificação dos E_p do eletrodo de platina quando modificado com montmorilonita sódica. Na medida em que ocorre a modificação da superfície eletródica há um aumento na separação dos picos catódicos e anódicos (ΔE_p), aumento esse que, juntamente com a não definição clara das correntes de picos, indicam um impedimento significativo na reação de transferência de carga envolvendo o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Observa-se que a transferência eletrônica é dificultada para os eletrodos modificados, uma vez que as intensidades dos picos diminuíram em comparação ao bare Pt. A modificação com SWy-1 bloqueia a superfície eletródica dificultando a chegada da espécie eletroativa. A incorporação das diferentes sequências peptídicas na estrutura da argila, faz com que os compósitos resultantes (mix 1, mix 2 e mix 3) se depositem na superfície do eletrodo de tal forma que ocorra menor recobrimento, facilitando a transferência de cargas até a superfície do eletrodo. O recobrimento máximo da superfície pode ser obtido pela equação (5):

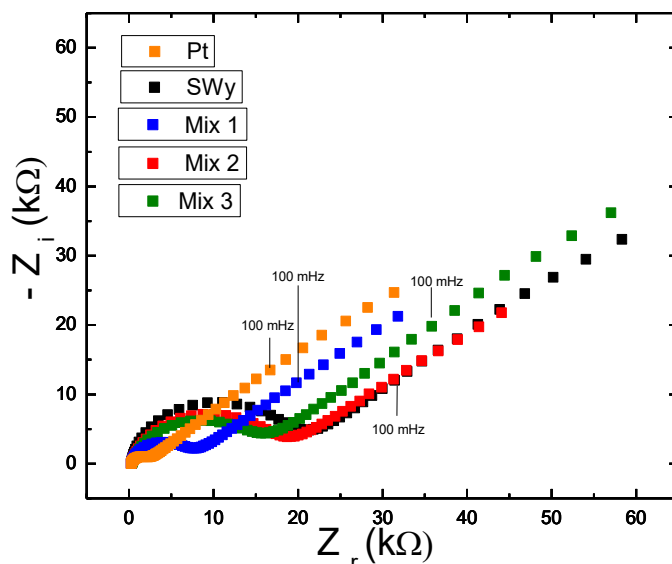
$$\theta_{CV} = 1 - \left(\frac{I_p}{I_{p,bare}} \right) \quad (5)$$

onde I_p e $I_{p,bare}$ representam as correntes de pico de oxidação para os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ nos eletrodos modificados e para o branco, respectivamente. O recobrimento superficial pode ser influenciado pela rugosidade da superfície, e também pelo modo como as sequências peptídicas interagem com a estrutura da montmorilonita, uma vez que podem estar localizadas na superfície e/ou no interior das lamelas da argila. Os valores estimados de recobrimento da superfície eletródica foram $\theta = 0,65$ para a montmorilonita, $\theta = 0,42$ para o mix 1, $\theta = 0,35$ para o mix 2 e $\theta = 0,42$ para o mix 3. Esses resultados estão em concordância com as análises de infravermelho, raios X, análise térmica e microscopia, as quais indicaram a efetiva modificação da estrutura da argila com as sequências peptídicas utilizadas.

Como se sabe, a EIS é um efetivo método para monitoramento da superfície de eletrodos, bem como das modificações ocorridas nela. A **Figura 33** apresenta os

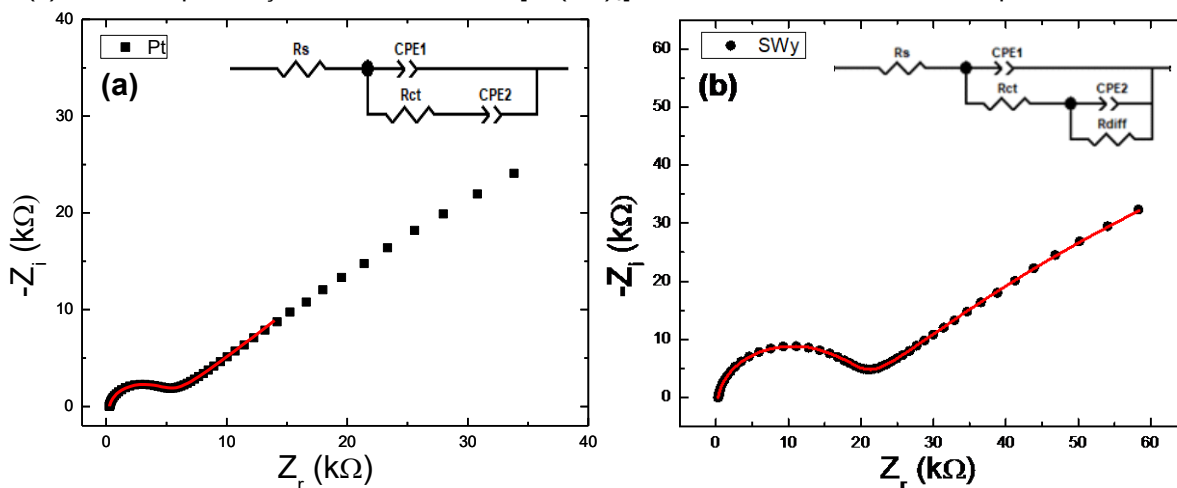
diagramas de Nyquist para o branco e sensores construídos, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

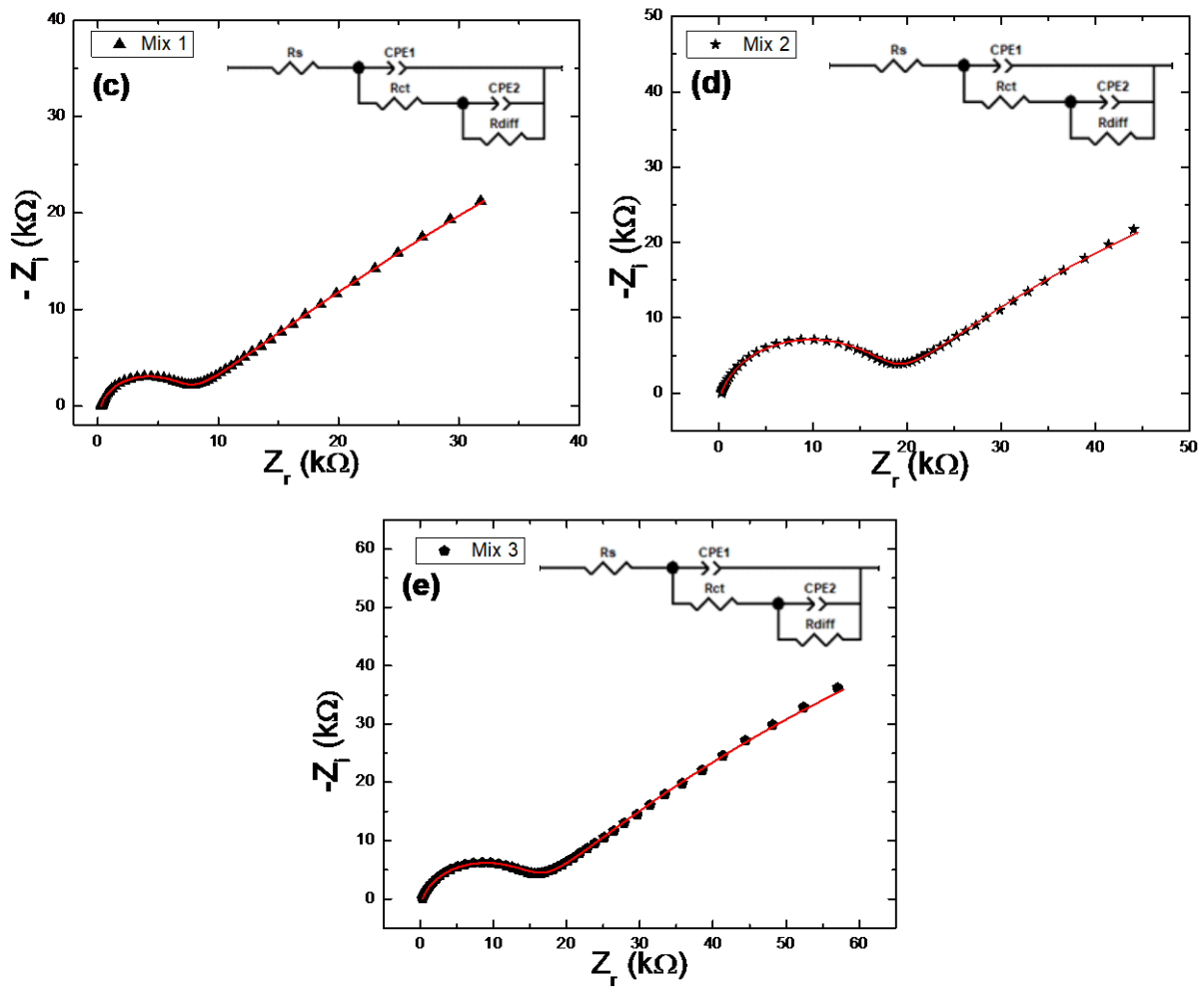
Figura 33 – Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o branco (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-), na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0



Como visto há diferença notável nos diagramas no plano complexo para o branco e os eletrodos modificados com os filmes de argila e mixes. Os semicírculos localizados a altas frequências correspondem à reação de transferência de carga, seguido pela região linear a baixas frequências. Nessa região a resposta de impedância é caracterizada pela transferência de massa da espécie redox para a superfície do eletrodo. Os dados foram tratados e a **Figura 34** mostra o ajuste de cada diagrama aos circuitos equivalentes utilizados na simulação experimental.

Figura 34 – Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente (símbolos) e pelo ajuste do circuito elétrico (—) para (a) bare Pt, e para os eletrodos modificados com (b) SWy-1, (c) Mix 1, (d) Mix 2 (e) Mix 3, na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0





Os dados de impedância experimental para o branco foram bem descritos pelo circuito de Randles, mostrado na **Figura 33**. Nesse circuito, R_s é a resistência da solução ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pH 7,0), R_{ct} é a resistência a transferência de carga correspondente a oxidação e redução da espécie redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, CPE1 é a constante de fase e corresponde a capacitância da dupla camada elétrica e Z_D é a impedância difusional, melhor representada por CPE2. Nesse circuito o capacitor foi substituído pela constante de fase (CPE1) devido à distribuição heterogênea de corrente na superfície do eletrodo, como consequência da rugosidade da superfície, defeitos de superfície e não homogeneidade. A **Tabela 10** mostra os parâmetros que melhor se ajustaram aos dados experimentais.

O valor S^2 próximo a 10^{-4} , e o baixo erro relativo acerca de cada parâmetro indicam que um bom ajuste foi obtido. R_{ct} é um importante parâmetro para descrever a capacitância da dupla camada elétrica conectada com a capacitância do filme depositado na superfície eletródica.

Tabela 10 – Parâmetros obtidos através dos dados de impedância experimental

	R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$)	α_1	R_{ct} ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$)	α_2	R_{diff} ($\Omega \text{ cm}^2$)	S^2
Pt	3,9	80,71	0,90	27,72	7114	0,498	--	$2,86 \times 10^{-4}$
SWy-1	4,29	36,68	0,92	267,1	5140	0,52	4162	$3,92 \times 10^{-4}$
Mix 1	3,92	61,34	0,88	96,19	7008	0,49	4610	$2,40 \times 10^{-4}$
Mix 2	3,71	50,86	0,84	249,13	6696	0,52	2521	$2,36 \times 10^{-4}$
Mix 3	3,67	86,63	0,82	171,31	6312	0,54	3079	$3,67 \times 10^{-4}$

^a $R_{CT,app} = R_{CT}/(1 - \theta)$; capacitância = $CPE (\omega_{max})^{\alpha-1}$. ^b Variância do erro residual; s é a frequência complexa ou operação de diferenciação no domínio da frequência $s \equiv j\omega$, e α é o expoente.

De acordo com os resultados, uma baixa resistência a transferência de carga foi observada para o branco Pt. A modificação da superfície do eletrodo gerada pelo filme de argila introduz uma barreira para a transferência eletrônica interfacial, a qual é claramente indicada pelo aumento significativo no valor R_{ct} , devido à baixa condutividade do filme de argila ^[115]. Quando comparado com a argila, os diagramas de Nyquist obtidos para os mixes 1 e 3 mostram significante decréscimo na resistência a transferência de carga. Esses resultados indicam um notável aumento na condutividade do material devido à presença das sequências peptídicas. Esses resultados corroboram com os obtidos para VC, indicando maior facilidade na transferência de cargas pelo filme de mix 1 e mix 3. Já o sensor construído com o mix 2 apresenta parâmetros bem próximos aos da argila, o que também está de acordo com resultados anteriores, indicando que entre os três sensores construídos, este seria aquele que apresentaria menor condutividade elétrica.

4.3 AVALIAÇÕES DOS SENSORES FRENTE AO PESTICIDA

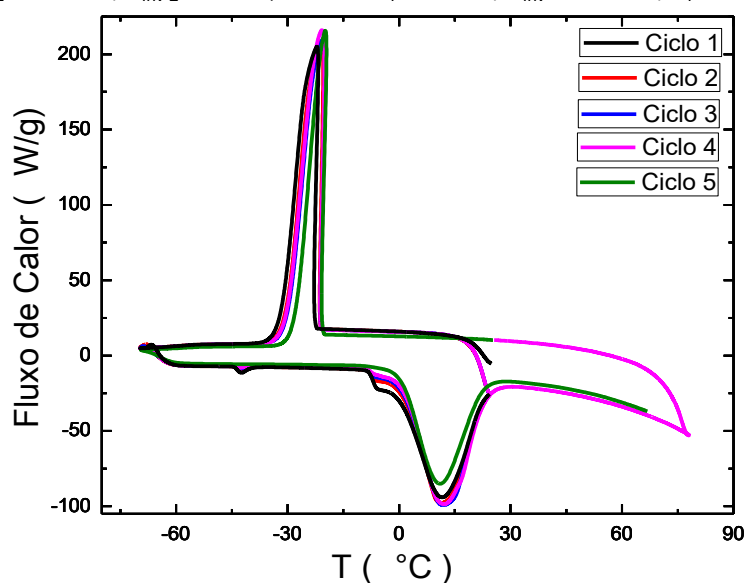
Após determinado o comportamento eletroquímico de cada sensor, analisou-se as interações entre cada compósito e o pesticida clorpirifós. Essa análise permitiu sugerir qual sensor seria o mais eficiente na detecção analítica do pesticida. Tais interações foram submetidas às técnicas de DSC e MEV, conforme descrito no item 3.5.1.

4.3.1 Análise da interação mix-pesticida

4.3.1.1 Análise Térmica

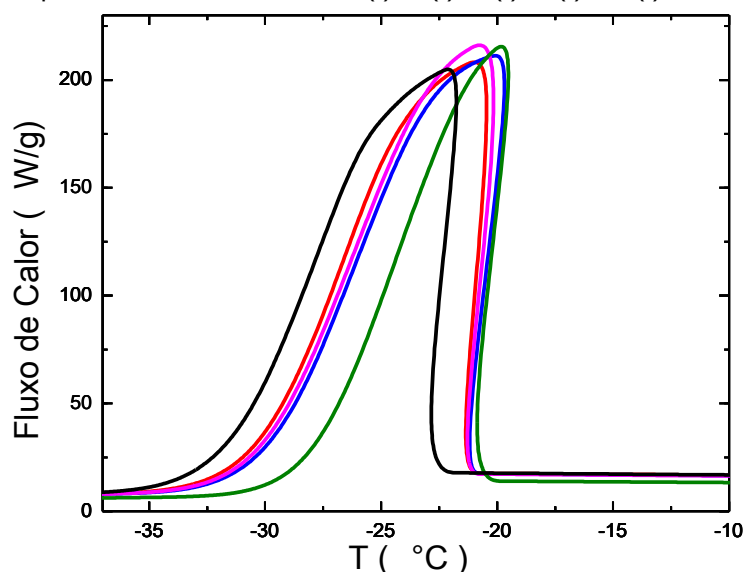
A **Figura 35** apresenta as curvas térmicas de DSC para o mix 1 na presença do pesticida clorpirifós, sistema 10 apresentado na **Tabela 5**.

Figura 35 – Análise cíclica: curvas DSC para mix 1 na presença de clorpirifós. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 2: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 3: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 4: $T_i = T_f = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv1} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv2} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$; ciclo 5: $T_i = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{inv} = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$



Pela análise da curva de resfriamento, verifica-se que os picos de congelamento da água continuam inclinados para a direita, semelhantemente ao que se observou para o mix 1 (**Figura 24**), porém intensificados pela presença do pesticida. Essa inclinação pode ser atribuída como característica dos mixes, uma vez que a montmorilonita não apresenta tal inclinação e a presença dos peptídeos na superfície da argila leva a uma alteração significativa do perfil dos picos de congelamento, liberando muita energia. A primeira e última curva apresentaram diferentes valores de T_{onset} , -23 e $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Já nas curvas intermediárias praticamente não houve alteração desse valor, ficando próximo a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, como pode ser verificado na **Figura 36**, a qual traz a ampliação da região mencionada.

Figura 36 – Ampliação das curvas DSC de resfriamento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -40 a -10 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-)

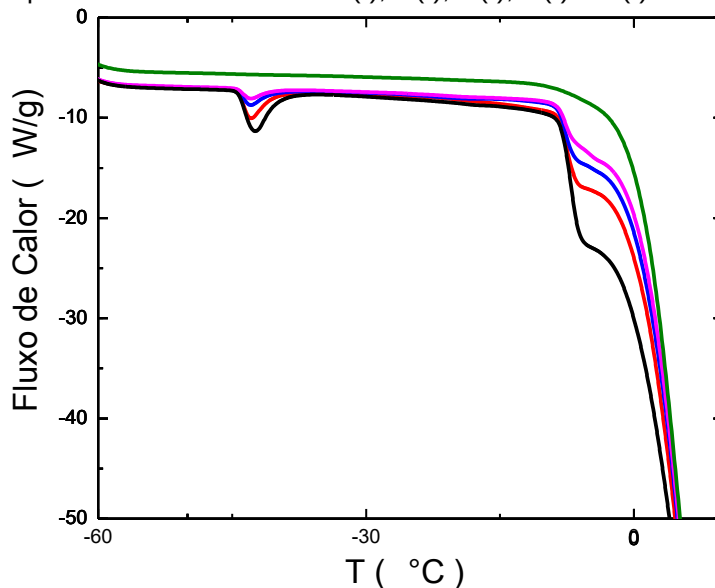


O deslocamento do pico de congelamento do último ciclo para regiões de maiores temperaturas pode estar associado com a evaporação de uma parte das moléculas de água ocorrida no ciclo anterior (aquecido até 80 °C), pois quando há retirada de água do sistema, o material que resta em solução/suspensão tem um efeito mais intenso sobre a água restante, fazendo, assim, com que ocorra esse deslocamento do pico.

Analisando a curva de aquecimento, os sinais por volta de - 42 °C e - 6 °C não foram observados nas curvas da argila e dos mixes, portanto só podem estar associados a entrada do pesticida no sistema, ou seja, a inserção do pesticida leva ao aparecimento desses sinais endotérmicos. A **Figura 37** mostra a ampliação dessa região.

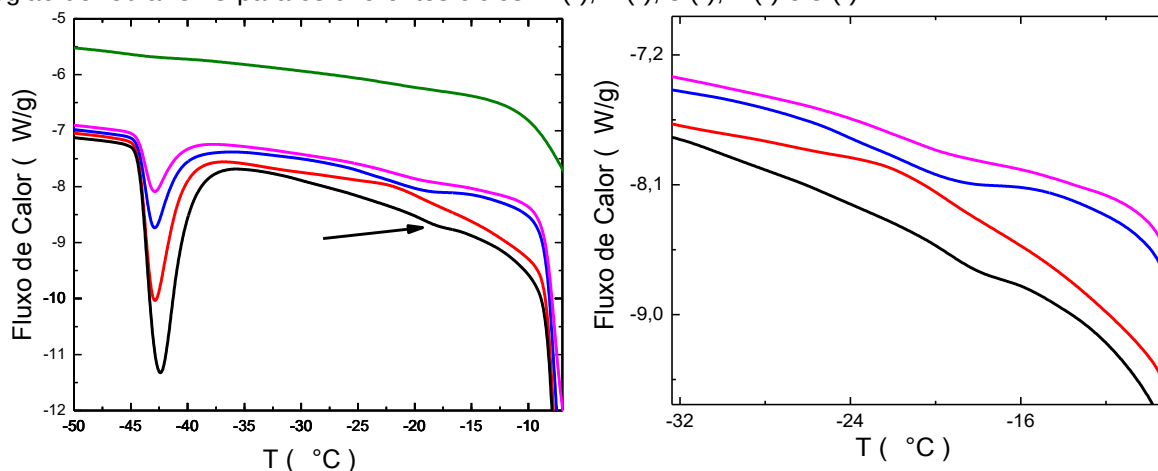
Ambos os picos vão diminuindo de intensidade conforme há um aumento no número de ciclos. Isso pode estar acontecendo devido aos diversos ciclos de congelamento e aquecimento promoverem a separação do material sólido do material líquido, ou estar sendo removida água associada ao sistema, fazendo com que ocorra uma perda de estabilidade.

Figura 37 – Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -60 a 10 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-)



Além dos sinais mencionados, há a presença de um terceiro sinal que pode ser verificado na **Figura 38**. Sinal esse aparenta ter caráter exotérmico e pôde ser observado mais claramente no segundo ciclo (linha vermelha). Esse sinal exotérmico, que já estava presente no mix 1 (**Figura 25**) mas que foi intensificado, pode estar associado a uma segunda camada de água ligada devido a “chegada” do pesticida nessa estrutura. Essa água está sendo cristalizada a medida que está ocorrendo o aquecimento, e é a presença desse tipo de água que confere aos materiais o caráter biocompatível, como dito anteriormente.

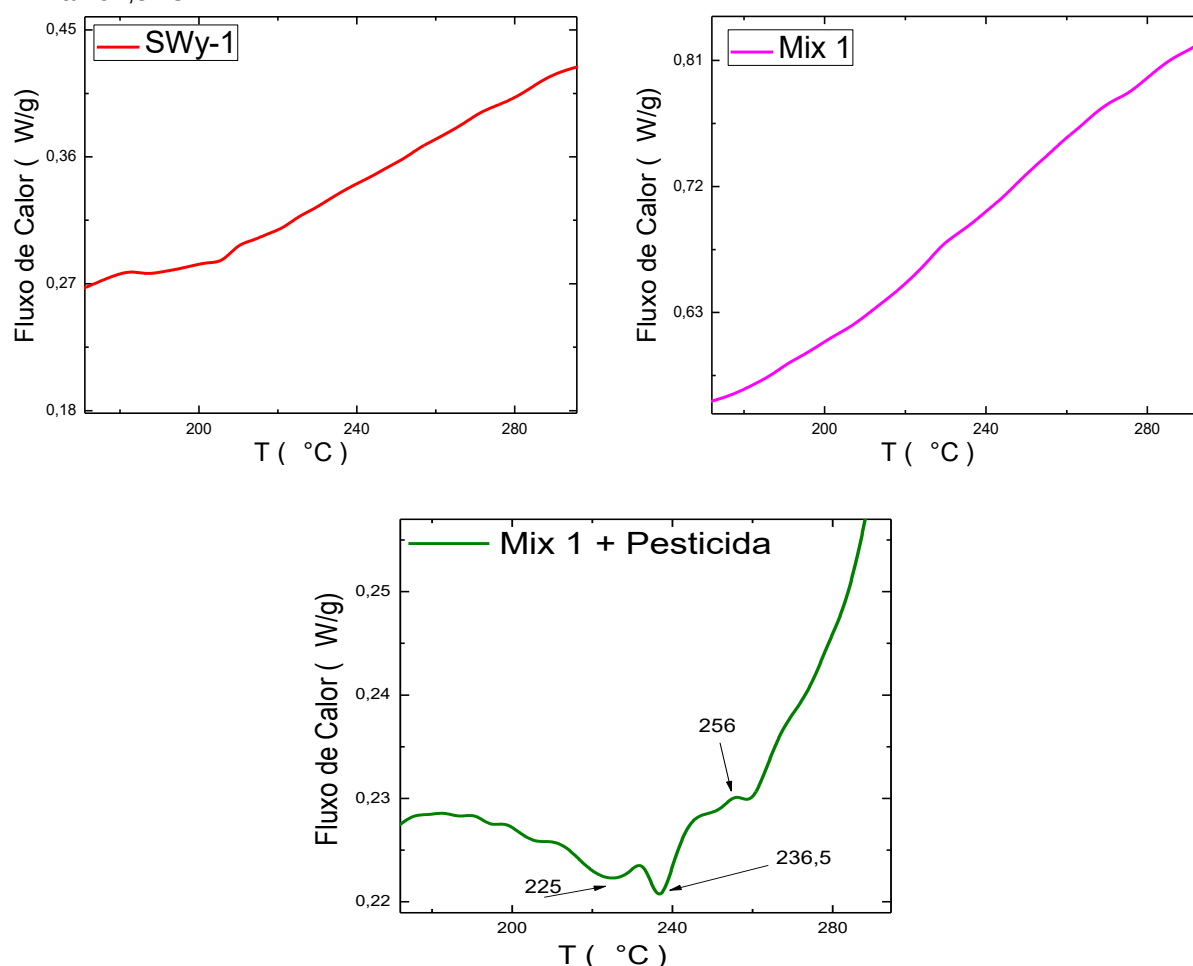
Figura 38 – Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -50 a -5 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-)



Assim, esses três sinais encontrados foram atribuídos à presença e a interação do pesticida com o mix, uma vez que ele altera toda a distribuição de moléculas de água na estrutura do compósito, reorganizando essa superfície e permitindo a entrada de moléculas de água que são passíveis de serem congeladas.

A última região que pode fornecer informações interessantes é a partir de 130 °C. Nessa região não foram encontrados picos nas curvas da argila e do mix, como pode ser verificado na **Figura 39**. Assim, qualquer sinal encontrado nessa região pode ser atribuído ao pesticida.

Figura 39 – Ampliação das curvas DSC da SWy-1 (-), mix 1 (-) e mix 1 + pesticida (-), na região de 172 a 294,5 °C

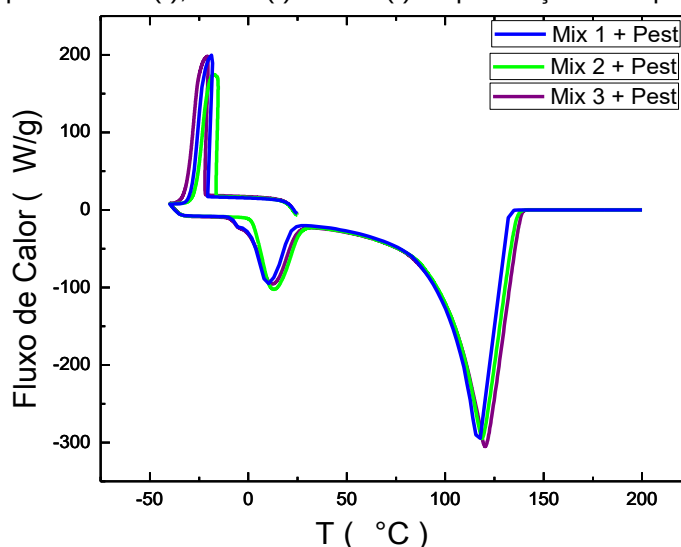


A curva térmica do mix 1 na presença do pesticida na região ampliada apresenta dois sinais endotérmicos, em 225 e 233,5 °C, possivelmente referente à quebra de ligações devido ao início da degradação do material, o qual é estável termicamente até temperaturas próximas a 180 °C. Em temperaturas acima de 280°C ocorre o início da queima, verificada por sinais exotérmicos. Dessa maneira, a

inserção da molécula de clorpirifós na estrutura do mix 1 provocou significantes alterações nas curvas térmicas, indicando a efetiva interação do pesticida com o compósito analisado.

Na sequência analisou-se as interações dos outros compósitos frente ao pesticida clorpirifós. A **Figura 40** mostra as curvas térmicas obtidas. Os mixes 1 e 3 apresentam comportamentos semelhantes, enquanto o mix 2 se apresenta diferentemente dos outros.

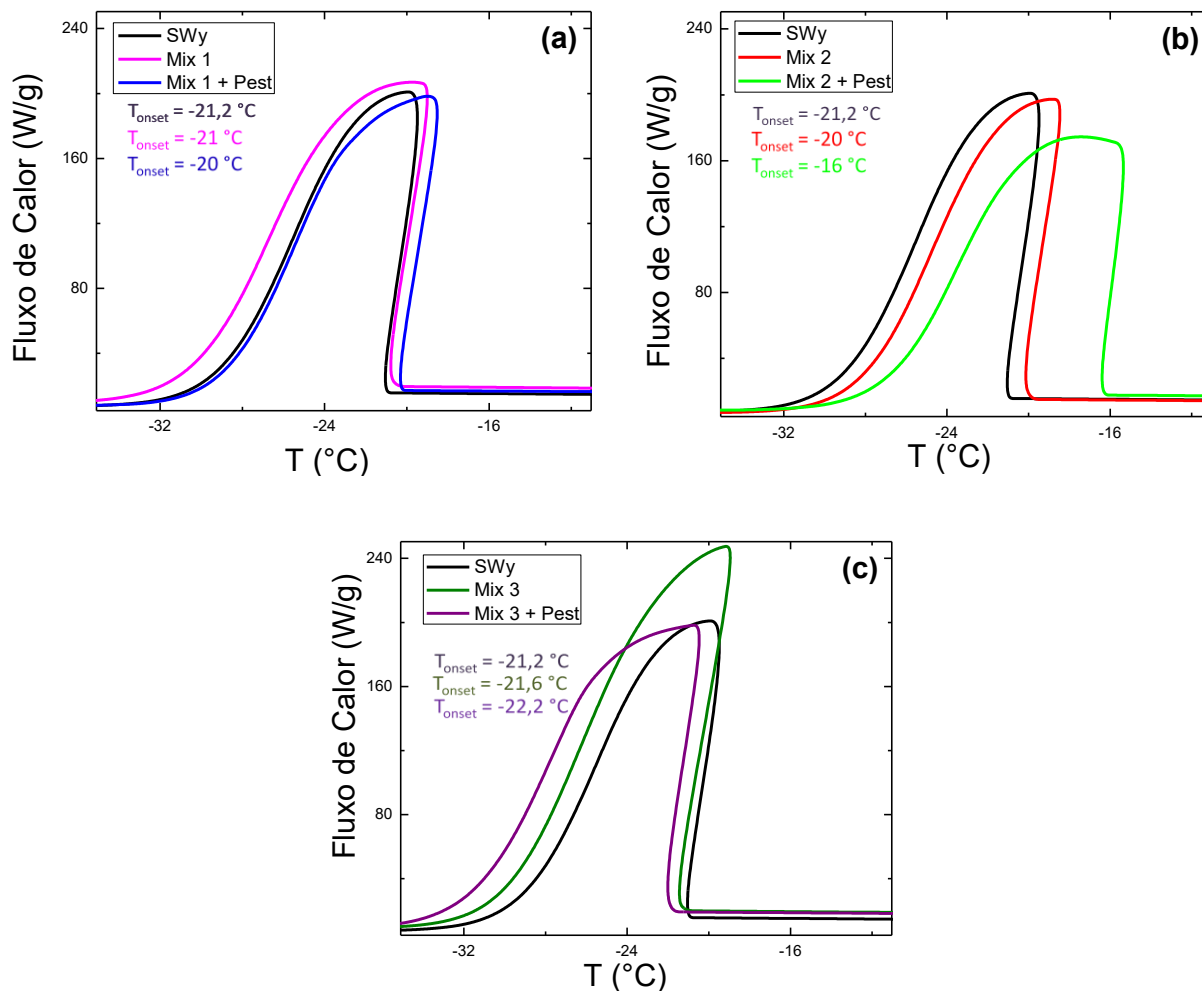
Figura 40 – Curvas DSC para o mix 1(-), mix 2 (-) e mix 3(-) na presença de clorpirifós



Analisando a curva de resfriamento, há o deslocamento dos picos de congelamento de água nos mixes quando comparados ao pico da argila, porém com a adição do pesticida observa-se uma atenuação desses picos e conseqüente alargamento dos mesmos. Assim, a quantidade de água presente em cada sistema é semelhante, uma vez que a área embaixo da curva praticamente não se altera. A **Figura 41** mostra comparação de cada sistema com o precursor.

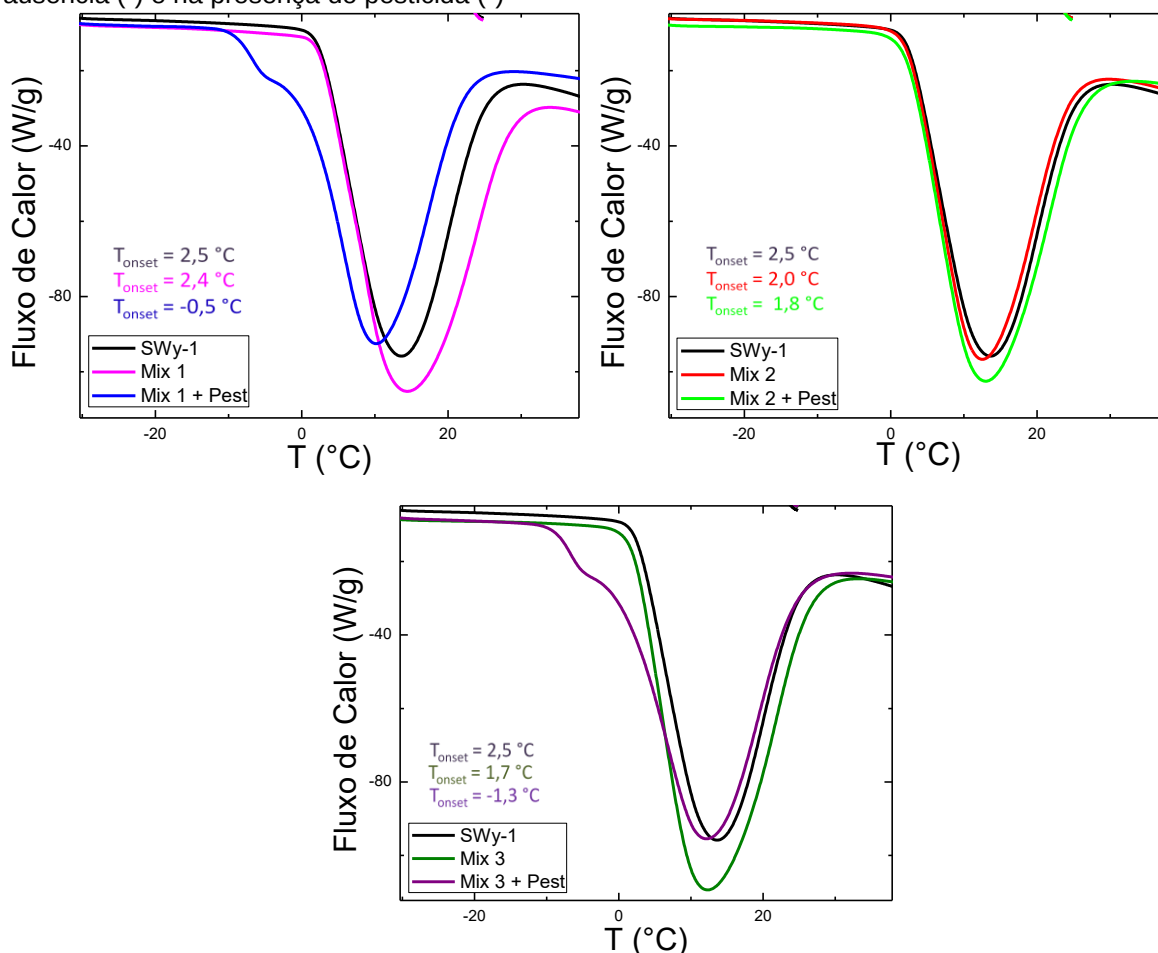
A comparação das curvas dos mixes, na ausência e na presença do pesticida, fornece informações importantes com relação aos efeitos que ocorrem na superfície do material. Os três mixes na ausência do pesticida parecem responder de forma semelhante: nos mixes 1 e 2 há o deslocamento dos picos para regiões mais a direita, enquanto no mix 3 há o deslocamento do pico para regiões mais a esquerda quando comparados a montmorilonita, mas em todos ocorre o deslocamento de pico, indicando que os tipos de água superficial estão mudando.

Figura 41 – Curva DSC de resfriamento para: (a) SWy-1 (-) e mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1 (-) e mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-) e mix 3 na ausência (-) e na presença do pesticida (-)



A inserção da molécula de pesticida provoca o atenuamento e alargamento dos picos, fato diretamente relacionado com os tipos de água presente na superfície do material, indicando que dependendo do sistema em questão essas água tem naturezas distintas. O sinal do mix 1 se apresenta intermediário ao do mix 2 e 3. Esse fato pode ser melhor visualizado com a análise da curva de aquecimento, apresentada na **Figura 42**.

Figura 42 – Curva DSC de aquecimento para: (a) SWy-1 (-), mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1(-), mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-), mix 3 na ausência (-) e na presença do pesticida (-)



Os mixes 1 e 3 na presença do pesticida apresentam maiores diferenças nas curvas de aquecimento, notadamente pela presença evidente dos picos em temperaturas próximas de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apresentam também um adiantamento do pico de fusão quando comparados aos mixes, com valores de T_{onset} de $-0,5$ e $-1,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o mix 1 e 3, respectivamente. O mix 2 na presença do pesticida apresenta comportamento semelhante ao do mix 2 na ausência do pesticida, com uma mínima antecipação do sinal de fusão em $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa antecipação de sinal está relacionada a perturbação das águas superficiais dos sistemas com a entrada da molécula de pesticida, indicando uma efetiva interação entre eles.

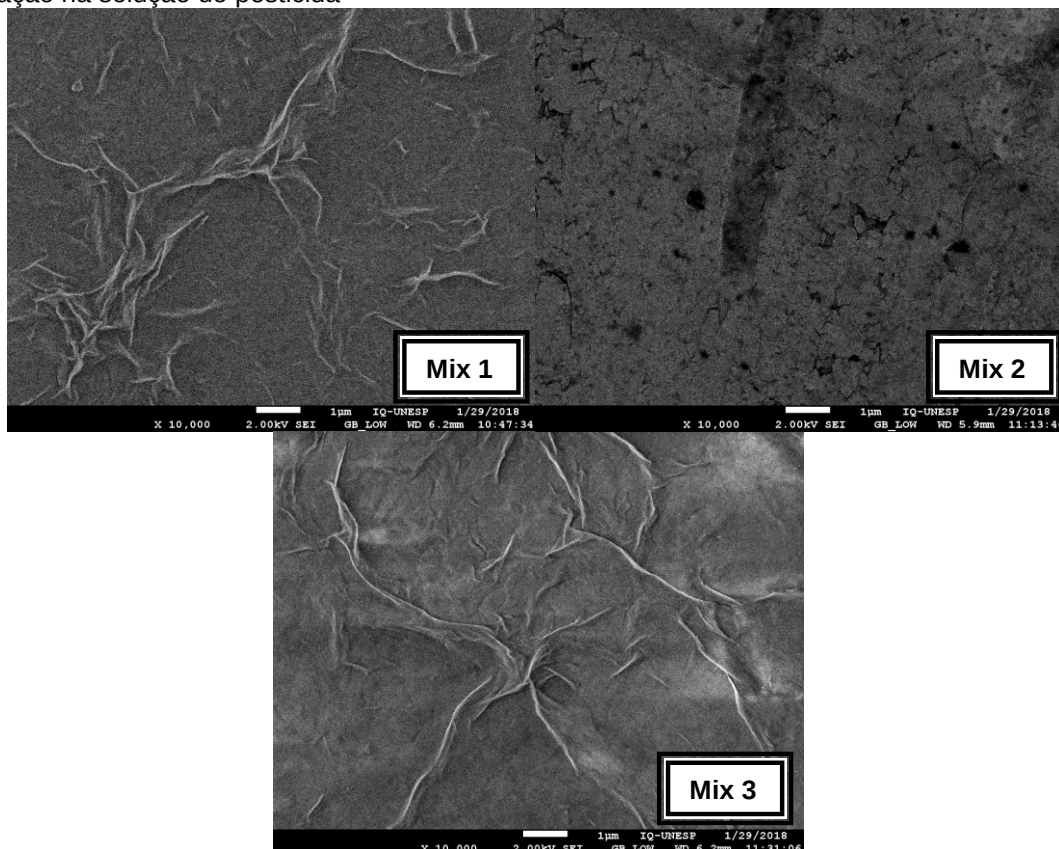
O comportamento distinto entre os diferentes mixes na presença do pesticida possivelmente está relacionado com a sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo. O sítio ativo da enzima acetilcolinesterase é composto pela tríade catalítica (Ser 200-His 440-Glu 327), e a interação do pesticida com a enzima se dá

através da sua ligação com a histidina, inibindo a ação da enzima. Dessa forma, se a interação do peptídeo com a argila acontecer justamente pela histidina, o pesticida terá uma influência menor no sistema, porém se a interação do peptídeo com a argila, de alguma forma, deixar essa histidina mais “exposta”, a influência do pesticida sobre o sistema será maior. Assim, dependendo da posição desse aminoácido na sequência peptídica proposta, bem como da sua interação com a montmorilonita, pode haver maior ou menor afinidade com o pesticida, provocando maior ou menor perturbação do sistema, observado nas curvas térmicas pela presença de diferentes tipos de água.

4.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

Após a análise da interação do pesticida clorpirifós com os mixes realizada por DSC, os filmes de mix, incubados na solução de pesticida foram submetidos a análise de microscopia, a fim de evidenciar as mudanças observadas na estrutura do material. A **Figura 43** mostra as imagens SEM para os filmes dos mixes após a incubação na solução de clorpirifós.

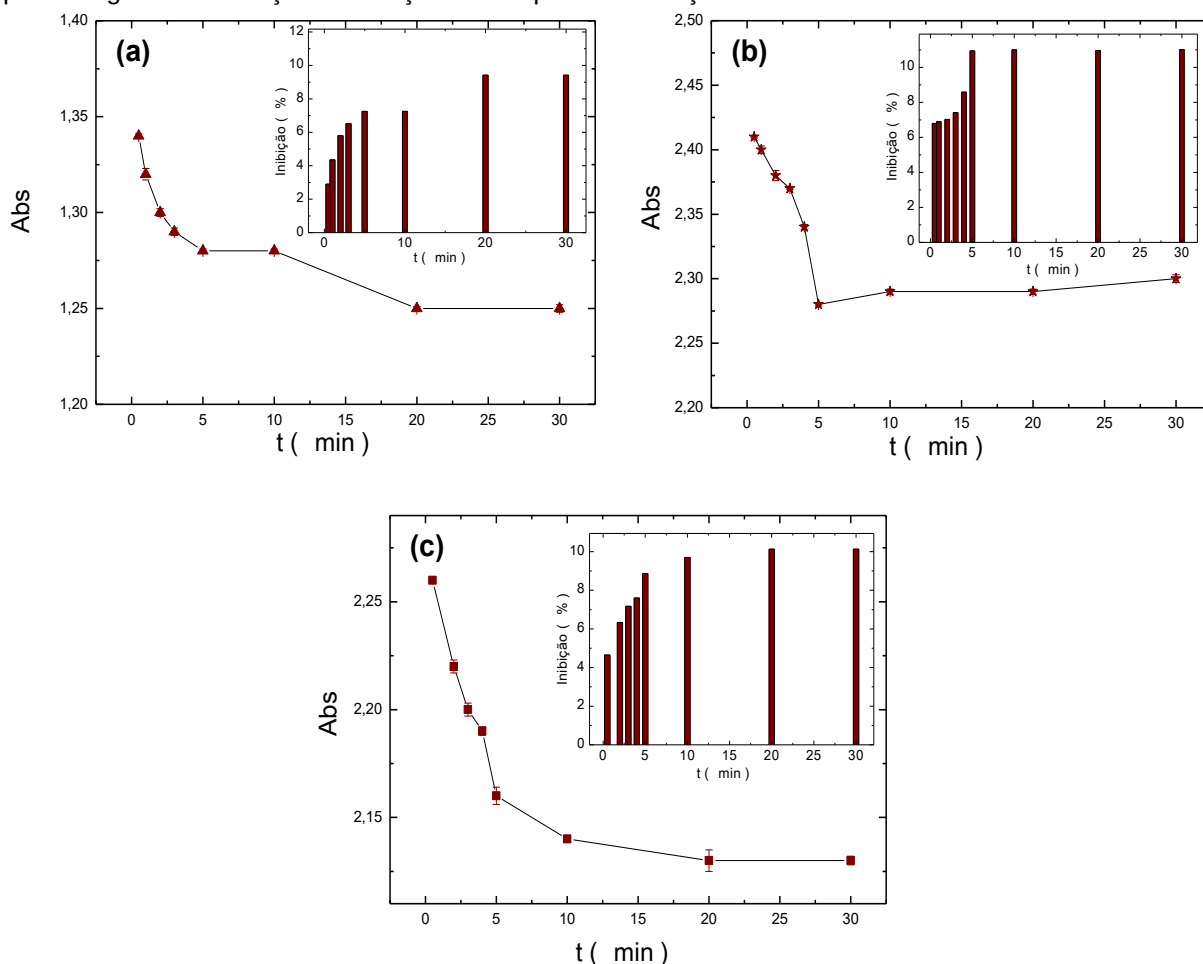
Figura 43 – Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o mix 1, mix 2 e mix 3, após a incubação na solução do pesticida



4.3.2 Influência do tempo de incubação e do pH

Após a análise estrutural da interação mix-pesticida, avaliou-se o tempo de incubação mínimo necessário para garantir a efetiva modificação do sensor pelo pesticida. Essa análise foi realizada por UV-Vis e a **Figura 44** apresenta os valores de absorbância obtidos com o passar do tempo e também a porcentagem de interação mix-pesticida. Para os três sensores, não houve variação significativa em relação a absorbância, bem como em relação a porcentagem de interação, a partir de 5 minuto.

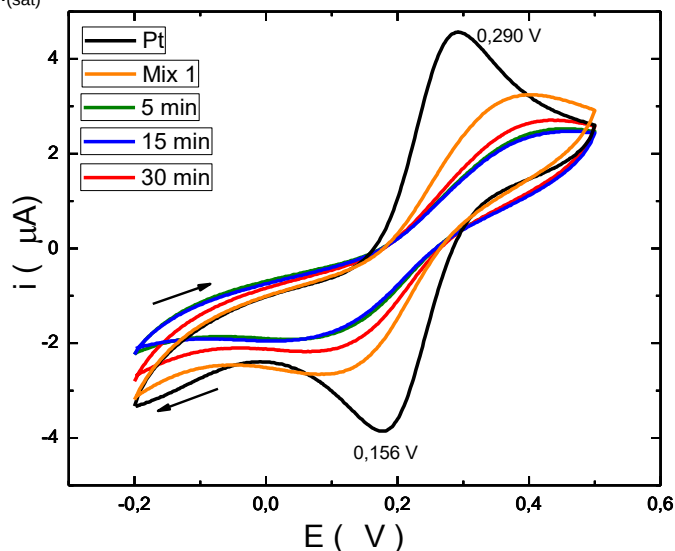
Figura 44 – Gráficos da absorbância em função do tempo de incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para (a) mix 1, (b) mix 2 e (c) mix 3. $\lambda_{\text{max}} = 200 \text{ nm}$. Nos detalhes histograma da porcentagem de interação em função do tempo de incubação



Após realizada a análise geral da influência do tempo de interação mix-pesticida, aplicou-se a técnica de VC para garantir que não haveria alteração no perfil eletroquímico com os diferentes tempos de incubação. Admitindo-se

comportamentos semelhantes para os três mixes, a análise eletroquímica foi realizada apenas para o mix 1, e o resultado está apresentado na **Figura 45**.

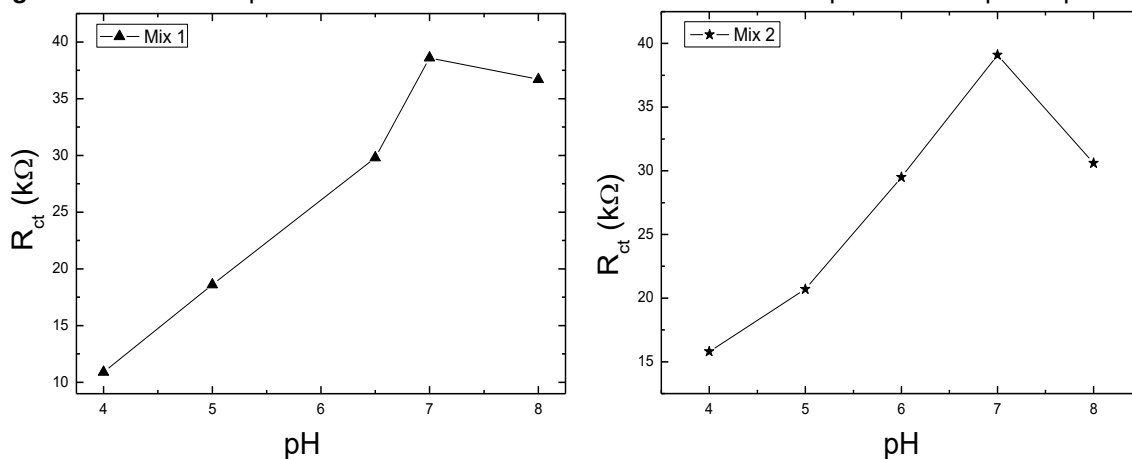
Figura 45 – VCs obtidos para o branco e para o sensor construído com mix 1 antes e após incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por tempos variados. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; A_{geom} : $0,014 \text{ cm}^2$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}||\text{KCl}_{(\text{sat})}$

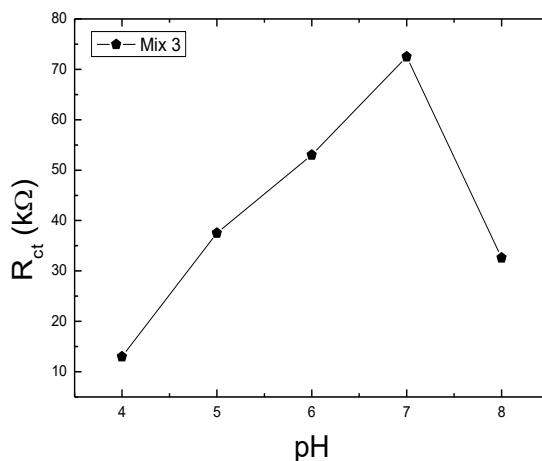


Assim como observado nos espectros UV-Vis, os diferentes tempos de imersão na solução do pesticida não provocam mudanças significativas no perfil voltamétrico obtido. Dessa forma, optou-se pela utilização do tempo de incubação de 5 min para os ensaios posteriores.

Após a otimização do parâmetro tempo de incubação do pesticida para cada sensor construído, foi avaliado o efeito do pH do meio eletrolítico na resposta dos sensores após a incubação na solução de pesticida. A **Figura 46** mostra o pH 7,0 como aquele que apresentou melhor resposta para todos os sensores, sendo, dessa forma, o pH utilizado para as medições realizadas posteriormente.

Figura 46 – Efeito do pH do eletrólito frente aos sensores incubados no pesticida clorpirifós por 5 min





4.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

De acordo com a análise da interação argila-peptídeos e mix-pesticida, observou-se comportamento diferente em relação ao sensor construído com o mix 2, possivelmente devido a sequência de aminoácidos não favorecer a interação com argila e com o pesticida clorpirifós. Dessa forma, a curva analítica foi construída apenas para os outros dois mixes, os quais apresentaram resultados mais satisfatórios nessas interações.

Os sensores apresentaram resposta linear na faixa de trabalho estudada. A faixa de concentração do analito na qual o método pôde ser aplicado satisfatoriamente foi de 1×10^{-8} a 1×10^{-7} mol L⁻¹ para o sensor 1, pois concentrações acima desses valores mostraram a tendência de se obter um patamar, indicando a saturação. O sensor 3 apresentou linearidade em duas faixas de concentração: de 1×10^{-8} a 1×10^{-7} mol L⁻¹ (denominado sensor 3a) e 1×10^{-7} a 1×10^{-6} mol L⁻¹ (denominado sensor 3b). As qualidades das curvas puderam ser avaliadas pelos altos valores de R obtidos, indicando um bom ajuste dos pontos ao modelo matemático para os três casos. A **Figura 47** mostra as curvas analíticas obtidas a partir dos valores de R_{ct} para os sensores 1, 3a e 3b e os valores do LD e LQ, calculados de acordo com as equações (3) e (4), são apresentados na **Tabela 11**. Todas as medições foram realizadas 5 vezes ($n = 5$).

Figura 47 – Curva analítica da resistência a transferência de carga em função da concentração do pesticida clorpirifós para: (a) sensor 1 e (b) sensor 3a, na faixa de trabalho de 1 a 10 ($\times 10^{-8}$) mol L⁻¹; (c) sensor 3b, na faixa de trabalho de 1 a 10 ($\times 10^{-7}$) mol L⁻¹. Medições realizadas na presença de 1×10^{-3} mol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em 0,1 mol L⁻¹ de KCl, em pH 7,0

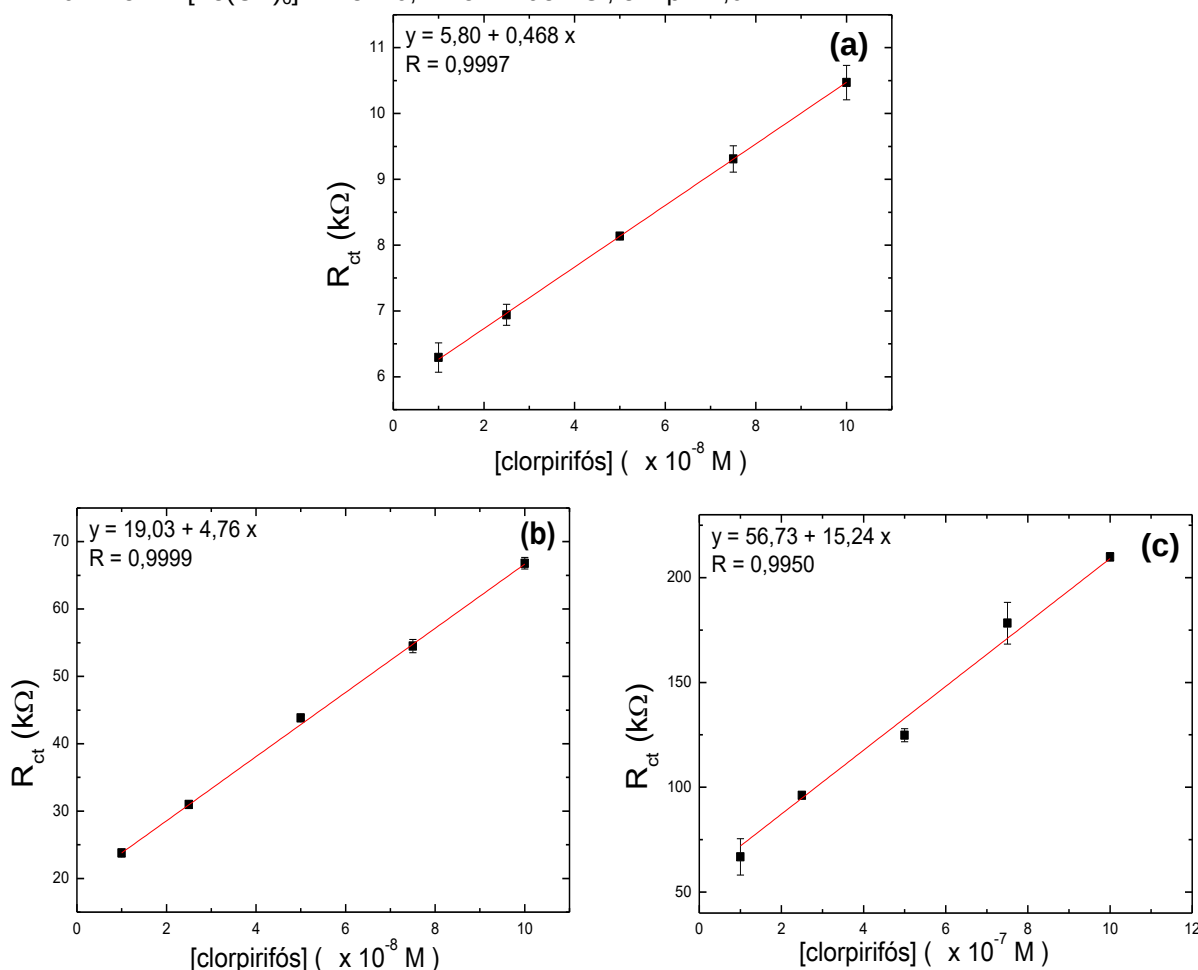


Tabela 11 – Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas de calibração do pesticida clorpirifós para os sensores 1, 3a e 3b

Sensor	Faixa de Trabalho (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S_D	R
1	$1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$	$2,40 \times 10^{-10}$	$7,80 \times 10^{-10}$	$3,67 \times 10^{-3}$	0,9997
3a	$1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$	$1,41 \times 10^{-10}$	$4,69 \times 10^{-10}$	$2,23 \times 10^{-2}$	0,9999
3b	$1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$	$1,06 \times 10^{-8}$	$3,53 \times 10^{-8}$	$5,38 \times 10^{-1}$	0,9950

A equação obtida pela regressão linear da curva analítica forneceu informações para análise da sensibilidade do método. Os três sensores construídos apresentaram alta sensibilidade frente ao analito clorpirifós, observável pelos valores do coeficiente angular de cada curva analítica. Porém, ao se comparar os três sensores pôde-se verificar que o segundo apresentou-se cerca de 10 vezes mais sensível que o primeiro, e o terceiro apresentou sensibilidade cerca de 30 vezes maior que o primeiro caso. Dessa forma, as interações ocorridas na modificação da

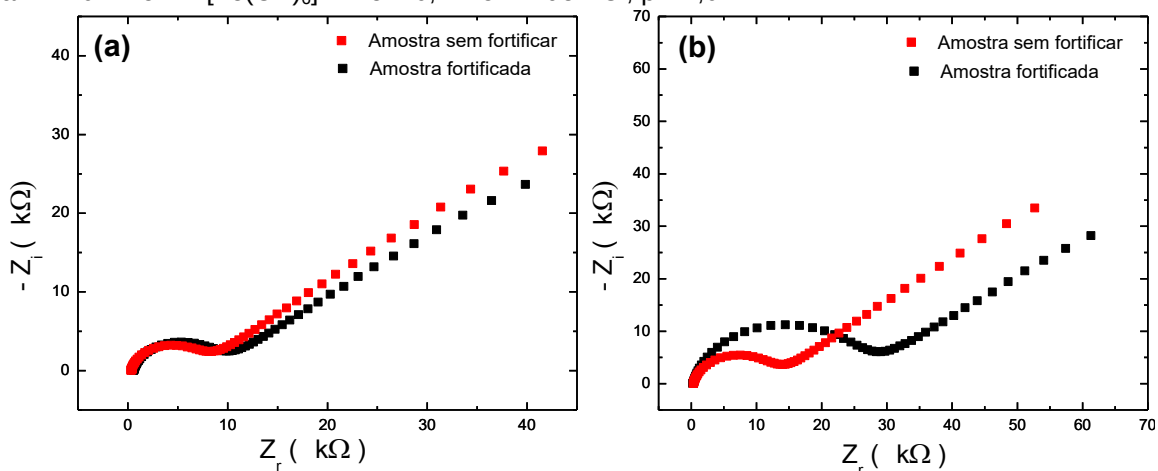
montmorilonita com o mix 3 permitem uma maior sensibilidade frente ao pesticida clorpirifós, quando comparadas às interações da argila com o mix 1.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para esses sensores estão bem próximos aos valores encontrados na literatura para sensores utilizados na detecção de clorpirifós [44, 64, 93], apresentando a vantagem da simplicidade na metodologia de preparo dos sensores, resumida em poucas etapas, com tempo relativamente curto. A ANVISA determina o limite de detecção (LD) a partir dos valores de limite máximo de resíduos (LMR) toleráveis. Para amostras de alimentos, de acordo com o publicado no relatório PARA no período de 2013 a 2015, o valor de LD para clorpirifós é de $2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de LD obtidos para os sensores deste trabalho estão abaixo dos recomendados pela ANVISA. Dessa forma, os sensores construídos podem ser aplicados satisfatoriamente na detecção de clorpirifós em amostras de alimentos.

4.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A eficiência do sensor construído foi testada pela medição da concentração de clorpirifós em amostra de tomate. A ANVISA não autoriza a aplicação desse pesticida em amostras de tomate, porém estudos revelaram a presença do contaminante em alimentos desse tipo. A amostra foi fortificada com concentração conhecida de pesticida e analisada por EIS. A **Figura 48** apresenta os diagramas de Nyquist para os ensaios, na presença e na ausência do pesticida, e o valor da concentração foi obtido pela interpolação na curva analítica. As medições foram realizadas em triplicata.

Figura 48 – Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o sensores (a) 1 e (b) 3 para a amostra de tomate na ausência (-) e na presença do pesticida (-). Medidas realizadas em meio a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0



A exatidão do método foi avaliada pelos valores de porcentagem de recuperação, apresentados na **Tabela 12**, e mostram que a metodologia desenvolvida é sensível para o pesticida clorpirifós dentro do limite de 80 a 120% recomendado pela ANVISA.

Tabela 12 – Percentual de recuperação do pesticida clorpirifós em amostra de tomate para os sensores 1 e 3a

Sensor	[adicionada] (mol L^{-1})	[encontrada] (mol L^{-1})	Recuperação (%)
1	$6,00 \times 10^{-8}$	$5,79 \times 10^{-8}$	97 (± 6)
3a	$2,00 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{-8}$	102 (± 7)

CONCLUSÃO

A modificação da argila montmorilonita com as sequências peptídicas 1 ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), 2 ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) e 3 ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) foi demonstrada pelas técnicas de caracterização análise térmica, difração de raios X e infravermelho, bem como pelas técnicas eletroquímicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A partir da diferença nas curvas DTG argila/mix e no aumento das bandas de IR mix/argila, foi possível evidenciar as interações argila-peptídeos, que ficaram comprovadas pela análise de DRX. A presença das sequências peptídicas adsorvidas na argila afeta a orientação e o arranjo das partículas de montmorilonita, uma vez que os peptídeos podem se localizar entre suas lamelas, facilitando a abertura ou fechamentos destas de acordo com suas concentrações, pHs, naturezas e pesos moleculares.

Os voltamogramas cíclicos para os eletrodos modificados com SWy-1 e mixes (argila modificada com as sequências peptídicas) mostraram um perfil diferente do obtido para o branco Pt, e o recobrimento superficial (θ) foi estimado para cada eletrodo. Utilizando a técnica EIS, foi possível observar uma diminuição na resistência a transferência de carga ao se comparar a SWy-1 com os mixes. Essa diminuição ocorreu pela presença das sequências peptídicas na estrutura da montmorilonita, uma vez que as interações ocorridas podem se dar de maneiras diferentes. O estudo eletroquímico do filme da argila montmorilonita mostrou que o transporte de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ através da camada de montmorilonita é limitado pela heterogeneidade do filme formado na superfície do eletrodo, devido as partículas de argila formarem placas sobrepostas não regulares, observada nas microscopias.

A interação argila modificada-pesticida clorpirifós foi demonstrada por DSC. A inserção da molécula de pesticida provocou uma perturbação na quantidade e nos tipos de águas presentes no sistema. Os três mixes apresentaram comportamentos distintos frente ao pesticida devido a sequência de aminoácidos que compõe a cadeia peptídica serem diferentes. Dentre os três, o mix 2, montmorilonita modificada com a sequência ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), apresentou menor interação, justamente devido a sua estrutura, o que pôde ser comprovado pelas imagens de microscopia.

Entre as três sequências peptídicas que mimetizam o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, as sequências 1 ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) e 3 ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) apresentaram bons resultados no que tange a interação argila-peptídeos-pesticida, podendo ser utilizadas satisfatoriamente, em substituição à enzima original, na construção de sensores eletroquímicos para detecção de clorpirifós.

Os sensores desenvolvidos apresentaram boa linearidade (sensor 1: $R = 0,9997$; sensor 3: $R = 0,9999$ e $R = 0,9950$, para duas faixas de concentrações) e limites de detecção de $2,40 \times 10^{-10}$ e $1,41 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para os sensores 1 e 3, respectivamente. A aplicação em amostras de tomate, sem qualquer pré-tratamento, obteve recuperação aceitável dentro da faixa recomendada pela ANVISA.

Portanto, com esse trabalho, foi possível concluir que o desenvolvimento de sensores a base de montmorilonita modificada com sequências peptídicas que mimetizam o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase pode ser satisfatoriamente realizado, como sendo uma alternativa rápida, com menores custos e eficiente na determinação do pesticida clorpirifós em amostras de alimentos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Avaliação da estabilidade dos sensores construídos;
- ✓ Avaliação da seletividade dos sensores empregando diferentes pesticidas;
- ✓ Avaliação dos possíveis interferentes presentes em amostras de alimentos;
- ✓ Validação metrológica do método desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAVALCANTI, R. K. B. C.; BRASILEIRO, C. T.; MACEDO R. O.; FERREIRA, H. S. Maquiagem mineral desenvolvida a partir de argilas bentoníticas naturais e tratadas organofilicamente. **Cerâmica**, v 64, n 370, 2018.
- [2] SILVA-VALENZUELA, M. G.; MATOS, C. M.; SHAH, L. A.; CARVALHO, F. M. S.; SAYEG, I. J.; VALENZUELA-DIAZ, F. R.; **Int. J. Modern Eng. Res.**, v 1, n 3, p 163 2013.
- [3] MURRAY, H. H.. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. **Appl. Clay Sci.**, v 17, n 5, p 207, 2000.
- [4] VISERAS, C.; AGUZZI, C.; CEREZO, P.; LOPEZ-GALINDO, A.. Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. **Appl. Clay Sci.** v 36, n 1, p 37, 2007.
- [5] CHRZANOWSKI, W.; KIM, S. Y.; NEEL, E. A. A.. Biomedical applications of clay. **Aust. J. Chem.**, v 66, n 11 p 1315, 2013.
- [6] FERREIRA, H. S.; CAMPOS, L. F. A.; MENEZES, R. R.; CARTAXO, J. M.; SANTANA, L. N. L.; NEVES, G. A.; FERREIRA, H. C.. Influência das variáveis de processo na obtenção de argilas. **Cerâmica**, v 59, p 277, 2013.
- [7] BERTUOLI, P. T. Desenvolvimento e caracterização de uma tinta em pó base poliéster contendo montmorilonita funcionalizada com silano. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologias) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- [8] BARUEL, A. F.; DUTRA, R. C. L.; BALDAN, M. R.; LOPES, C. M. A.; CASSU, S. N.. Organofilização e silanização de argila bentonita. **Química Nova**, v 41, n 2, 2018.
- [9] AHMED, A.; CHAKER, Y.; BELARBI, E. H.; ABBAS, O.; CHOTARD, J. N.; ABASSI, H. B.; NGUYEN VAN NHIE, A.; HADRI, M. E.; BRESSON, S.. XRD and ATR/FTIR investigations of various montmorillonite clays modified by monocationic and dicationic imidazolium ionic liquids. **Journal of Molecular Structure**, v 1173, p 653, 2018.
- [10] TEIXEIRA-NETO, E.; TEIXEIRA-NETO, A. A.. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 809-817, 2009.
- [11] CHAGAS, A. P.. **Argilas: as essências da terra**. 2ª Edição. São Paulo: Ed. Moderna, 1996.
- [12] SANTOS, P. S.. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. 2ª Edição. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1989.
- [13] MACKENZIE, R. C.. The classification and nomenclature of clay minerals. **Clay Minerals Bull.**, v 4, p 52, 1959.

- [14] CAMPOS, T. M. P.. **Argilominerais: Propriedades e Aplicações**. PUC-Rio, 2011.
- [15] MACHADO, M. C. P.; LANGBEHN, OLIVEIRA, J. T. C. M.; ELYSEU, F.; CARGNIN, M.; DE NONI JR A.; FRIZON, T. E. A.; PETERSON, M.. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. **Cerâmica**, v 64, n 370, 2018.
- [16] BARROS, A.; FERREIRA, M.; CONSTANTINO, C. J. L.; BORTOLETO, J. R. R.; FERREIRA, M.. Synergy between polyaniline and omt clay mineral in langmuir–blodgettfilms for the simultaneous detection of traces of metal íons. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v 7, p 6828, 2015.
- [17] BARROS, A.; FERREIRA, M.; CONSTANTINO, C. J. L.; FERREIRA, M.. Nanocompositesbased on LbL films of polyaniline and sodium montmorillonite Clay. **Synth. Met.**, v 197, p 119, 2014.
- [18] MOUSTY, C.; Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—newtrends. **Applied Clay Science**, v 27, p 159, 2004.
- [19] LUCENA, N. C.; MIYAZAKI, C. M.; SHIMIZUB, F. M.; CONSTANTINO, C. J. L.; FERREIRA, M.. Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine. **Applied Surface Science**, v 436, p 957-966, 2018.
- [20] SADRI, S.; JOHNSON, B. B.; RUYTER-HOOLEY, M.; ANGOVE, M. J.. The adsorption of nortriptyline on montmorillonite, kaolinite and gibbsite. **Applied Clay Science**, v 165, p 64-70, 2018.
- [21] CHEN, T.; ZHAO, Y., SONG, S.. Comparison of colloidal stability of montmorillonite dispersion in aqueous NaCl solution with in alcohol-water mixture. **Powder Technology**, v 322, p 378-385, 2017.
- [22] FITCH, A. Clay-modified electrodes: a review. **Clays and Clay Minerals**, v 38, n 4, p 391-400, 1990.
- [23] DEMIR, F.; DEMIR, B.; YALCINKAYA, E. E.; CEVIK, S.; DEMIRKOL, D. O.; ANIK, U.; TIMUR, S.. Amino acid intercalated montmorillonite: electrochemical biosensing applications. **RSC Advances**, v 4, n 91, p 50107-50113, 2014.
- [24] SOUZA, G. R.; FERTONANI, L. F.; PASTRE, I. A.. Estudo espectro eletroquímico de sistemas estruturados argila-corante. **Eclética Química**, v 28, n 1, p 77-83, 2003.
- [25] KULA, P., NAVRÁTILOVÁ, Z. Voltammetric copper (II) determination with a montmorillonite-modified carbon paste electrode. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 354(5-6), p. 692-695, 1996.

- [26] FERTONANI, F. L.; LUPI, C. P.; MARTINS, L. A.; PASTRE, I. A.; SANTOS, C. C. M.; GUIZZELINI, F. C.; FRANZIN, B. T.. Thermal and electrochemical study of Fe(III) organophilic montmorillonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 131, p 713-723, 2016.
- [27] PASTRE, I. A.; NASCIMENTO OLIVEIRA, I.; MOITINHO, A. B. S.; SOUZA, G. R.; IONASHIRO, E. Y.; FERTONANI, F. L. Thermal behaviour of intercalated 8-hydroxyquinoline (oxine) in montmorillonite clay. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 75, p 663, 2004.
- [28] LUPI, C. P.; FRANZIN, B. T.; PEREIRA, P. R.; DAMACENO, A. J.; DADAMOS, T. R. L.; SANTOS, C. C. M.; PASTRE, I. A.; FERTONANI, F. L.. Thermal and electrochemical studies of Cu(II) 8-hydroxyquinoline organophilic montmorillonit. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 131, p 799-810, 2018.
- [29] PARK, Y.; SUN, Z.; AYOKO, G. A.; FROST, R. L.. Removal of herbicides from aqueous solutions by modified forms of montmorillonit. **Journal of Colloid and Interface Science**, v 415, p 127–132, 2014.
- [30] HILLIE, T.; HLOPHE, M.. Nanotechnology and the challenge of clean water. **Nat. Nano**, v 2, p 663, 2007.
- [31] TRIGO, C.; KOSKINEN, W.C.; CELIS, R.; SADOWSKY, M.J.; HERMOSIN, M.C.; CORNEJO, J.. Bioavailability of organoclay formulations of atrazine in soil. **J. Agric. Food Chem.**, v 58, p 11857-11863, 2010.
- [32] CABRERA, A.; COX, L.; SPOKAS, K. A.; CELIS, R.; HERMOSIN, M. C.; CORNEJO, J.; KOSKINEN, W. C.. Comparative sorption and leaching study of the herbicides fluometuron and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) in a soil amended with biochars and other sorbents. **J. Agric. Food Chem.**, v 59, p 12550, 2011.
- [33] HERMOSIN, M. C.; CELIS, R.; FACENDA, G.; CARRIZOSA, M. J.; ORTEGA-CALVO, J.J.; CORNEJO, J.. Bioavailability of the herbicide 2,4-D formulated with organoclays. **Soil Biol. Biochem.**, v 38, p 2117-2124, 2006.
- [34] SOLOMON, R. D. J.; SANTHI, V. S.. Controlled release formulations of butachior and oxadiazon – na evaluation of sorption/desorption. **J. Agron.**, v 6, p 370, 2007.
- [35] XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R.. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Appl. Clay Sci.**, v 49, p 255, 2010.
- [36] SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARINAS, B. J.; MAYES, A. M.. Science and Technology for Water Purification in the Coming Decades. **Nature**, v 452, p 301-310, 2008.
- [37] GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na

determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v 29, n 1, p 105–112, 2006.

[38] BARBOSA, S. C. B.. Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa.

[39] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regularização de produtos – Agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro>> Acesso em 09 nov. 2018.

[40] ABBACI, A.; AZZOUZ, N.; BOUZNIT, Y.. A new copper doped montmorillonite modified carbon paste electrode for propineb detection. **Applied Clay Science**, v 90, p 130-134, 2014.

[41] MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAH, M.. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch. Toxicol.**, v 91, 549–599, 2017.

[42] BLANKSON, G.K.; OSEI-FOSU, P.; ADEENDZE, E. A.; ASHIE, D.. Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. **Food Control**, v 68, p 174–180, 2016.

[43] YU, Q.; LI, Y.; MA, A. Z.; LIU, W. F.; WANG, H. L.; ZHUANG, G. Q.. An efficient design strategy for a whole-cell biosensor based on engineered ribosome binding sequences. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 401, p 2891–2898, 2011.

[44] YANG, L.; & WANG, G-C.; LIU, Y-J.; & AN, J-J.; WANG, M.. Development of a stable biosensor based on a SiO₂ nanosheet–Nafion–modified glassy carbon electrode for sensitive detection of pesticides. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 405, p 2545–2552, 2013.

[45] CREMONESE, C.; FREIRE, C.; CAMARGO, A. M.; LIMA, J. S.; KOIFMAN, S.; MEYER, A.. Pesticide consumption, central nervous system and cardiovascular congenital malformations in the south and southeast region of Brazil. I **JOMEH**, v 27 p 474–486, 2014.

[46] HAYDEN, K. M.; NORTON, M. C.; DARCEY, D.; OSTBYE, T.; ZANDI, P. P.; BREITNER, J. C.; WELSH-BOHMER, K. A.. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the cache county study. **Neurology**, v 74, p 1524–1530, 2010.

[47] VOPHAM, T.; BROOKS, M. M.; YUAN, J. M.; TALBOTT, E. O.; RUDELL, D.; HART, J. E.; CHANG, C. C. H.; WEISSFELD, J. L.. Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: a case-control study using a geographic information system (GIS) to link SEER-Medicare and California pesticide data. **Environ. Res.**, v 143, p 68–82, 2015.

[48] KEIFER, M.C.; FIRESTONE, J.. Neurotoxicity of pesticides. **J. Agromed.**, v 12, p 17–25, 2007.

- [49] ELERŠEK, T.; FILIPI, M.; Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, v 12, 243, 2016.
- [50] ALINEJAD, S., ZAMANI, N., ABDOLLAHI, M., & MEHROUR, O. A narrative review of acute adult poisoning in Iran. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v 42(4), p 327–346, 2017.
- [51] JOHN, H., VAN DER SCHANS, M. J., KOLLER, M., SPRUIT, H. E. T., WOREK, F., THIERMANN, H., & NOORT, D.. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. **Forensic Toxicology**, v 36(1), p. 61–71.
- [52] BATISTA, T. J.. Efeitos da exposição crônica ao organofosforado clorpirifós sobre a função cardiorespiratória. 2018. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- [53] IBAMA. 2017. HISTORICO DE CONSUMO DE AGROTÓXICOS ENTRE 2000-2016 NO BRASIL. <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> Acesso em 15 de nov. de 2018.
- [54] DE ANGELIS, S.; TASSINARI, R.; MARANGHI, F.; EUSEPI, A.; DI VIRGILIO, A.; CHIAROTTI, F.; RICCI, L.; VENEROSI PESCIOLINI, A.; GILARDI, E.; MORACCI, G.; CALAMANDREI, G.; OLIVIERI, A.; MANTOVANI, A. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. **Toxicol. Sci.**, v 108, n 2, p 311-9, 2009.
- [55] HAVILAND, J. A.; BUTZ, D. E.; PORTER, W. P. Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. **Reprod. Toxicol.**, v 29, n 1, p 74-79, 2010.
- [56] JOSHI, S. C.; MATHUR, R.; GULATI, N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. **Toxicol. Ind. Health**, v 23, n 7, p 439-44, 2007.
- [57] EATON, D. L.; DAROFF, R. B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L. G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W. C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P. S.. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v 38, n 2, 2008.
- [58] VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L.; MATEO, C.. An immobilized acetylcholinesterase as test system to screen new inhibitor drugs to treat Alzheimer's disease. **Sensors & Actuators B: Chemical**, v 278, p 196–201, 2019.
- [59] KUČA, K.; SOUKUP, O.; MAREŠOVÁ, P.; KORABENCNY, J.; NEPOVIMOVÁ, E.; KLIMOVA, B.; HONEGR, J.; RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. C.. Current Approaches Against Alzheimer's Disease in Clinical Trials. **J. Braz. Chem. Soc.**, v 27, p 641–649, 2016.

- [60] ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES A. A.. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v 8, p 1818-1834, 2016.
- [61] SGOBBY, L. F. Desenvolvimento de um biosensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento. 2016. Tese. (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [62] SONG, D.; WANG, Y.; LU, X.; GAO, Y.; LI, Y.; GAO, F.. Ag nanoparticles-decorated nitrogen-fluorine co-doped monolayer MoS₂ nanosheet for highly sensitive electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. **Sensors and Actuators B**, v 267, p 5–13, 2018.
- [63] PAULA, C. G.; TOLEDO, R. A.; VAZ, C. M. P.; MARQUES, P. J.; BATISTUTI, J. P.; PASTRE, I. A.; SHIM, H.; FERTONANI, F. L.. A Solid Film Electrode of Intermetallic Ag₂Hg_{3.02} for the Direct Determination of Folic Acid in Fresh and Processed Fruit Juices. **Electroanalysis**, v 26, p 1 – 8, 2014.
- [64] SGOBBI, L. F.; MACHADO, S. A. S.. Functionalized polyacrylamide as an acetylcholinesterase-inspired biomimetic device for electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v 100, p 290–297, 2018.
- [65] ZHAO, H. Y.; JI, X. P.; WANG, B. B.; WANG, N.; LI, X. R.; NI, R. X.; REN, J. J.. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles--cyclodextrin/prussian blue chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v 65, p 23–30, 2015.
- [66] LU, X.; TAO, L.; SONG, D.D.; LI, Y.; GAO, F. M.. Bimetallic Pd@Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides. **Sens. Actuators B Chem.**, v 255, p 2575–2581, 2018.
- [67] DING, J.; ZHANG, H.; JIA, F.; QIN, W.; DU, D.. Assembly of carbon nanotubes on a nanoporous gold electrode for acetylcholinesterase biosensor design. **Sens. Actuators B. Chem.**, v 199, p 284–290, 2014.
- [68] PENG, L.; DONG, S.Y.; WEI, W. B.; YUAN, X.J.; HUANG, T.L.. Synthesis of reticulated hollow spheres structure NiCo₂S₄ and its application in organophosphate pesticides biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v 92, p 563–569, 2017.
- [69] SONG, D. D.; LI, Y.; LU, X.; SUN, M. X.; LIU, H.; YU, G. M.; GAO, F. M.. Palladium-copper nanowires-based biosensor for the ultrasensitive detection of organophosphate pesticides. **Anal. Chim. Acta**, v 982, p 168–175, 2017.
- [70] ZAPP, E. D. B.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sensors and Actuators B**, v 155, p 331–339, 2011.

- [71] LANG, Q.; HAN, L.; HOU, C.; WANG, F.; LIU, A.. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. **Talanta**, v 156-157, p 34–41, 2016.
- [72] YU, G.; WU W.; ZHAO, Q. ; WEI, X. ; LU, Q.. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v 68, p 288–294, 2015.
- [73] WEI, M.; WANG, J. J.. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. **Sens. Actuators B: Chem.**, v 211, p 290–296, 2015.
- [74] ZHOU, Q.; YANG, L.; WANG G. C.; YANG, Y.. Acetylcholinesterase biosensor based on SnO₂ nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides. **Biosens. Bioelectron.**, v 49, p 25–31, 2013.
- [75] ZHAI, C.; SUN, X.; ZHAO, W.; GONG, Z.; WANG, X.. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition. **Biosens. Bioelectron.**, v 42, p 124–130, 2013.
- [76] WEI, M.; ZENG, G.Y.; LU, Q.Y.. Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres. **Microchim. Acta**, v 181, p 121–127, 2014.
- [77] CANCAR, H.D.; SOYLEMEZ, S.; AKPINAR, Y.; KESIK, M.; GÖKER, S.; GUNBAS, G.; VOLKAN, M.; TOPPARE, L.. A novel acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v 8, p 8058–8067, 2016.
- [78] MOGHA, N. K.; SAHU, V.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K.; MASRAM, D. T.. Biocompatible ZrO₂ - reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection. **Materials and Design**, v 111, p 312–320, 2016.
- [79] AN, N.; ZHOU, C.H.; ZHUANG, X.Y.; TONG, D.S.; YU, W.H.. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Appl. Clay Sci.**, v 114, p 283–296, 2015.
- [80] TULLY, J.; YENDLURI, R.; LVOV, Y.. Halloysite clay nanotubes for enzyme immobilization. **Biomacromolecules**, v 17, p 615–621, 2016.
- [81] MOUSTY, C.. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 396, p 315–325, 2010.

- [82] SELECI, M.; AG, D.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D.O.; GULER, C.; TIMUR, S.. Amine intercalated montmorillonite matrices for enzyme immobilization and biosensing applications. **RSC Adv.**, v 2, p 2112–2118, 2012.
- [83] DEMIR, B.; SELECI, M.; AG, D.; CEVIK, S.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D.; ANIK, U.; TIMUR, S.. Amine intercalated clay surfaces for microbial cell immobilization and biosensing applications. **RSC Adv.**, v 3, p 7513–7519, 2013.
- [84] SONGURTEKIN, D.; YALCINKAYA, E. E.; AG, D.; SELECI, M.; DEMIRKOL, D.O.; TIMUR, S.. Histidine modified montmorillonite: laccase immobilization and application to flow injection analysis of phenols. **Appl. Clay Sci.**, v 86, p 64–69, 2013.
- [85] BONGARTZ, R.; AG, D.; SELECI, M.; WALTER, J. G. G.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D. O.; STAHL, F.; TIMUR, S.; SCHEPER, T.. Folic acid-modified clay: targeted surface design for cell culture applications. **J. Mater. Chem. B**, v 1, p 522–528, 2013.
- [86] SONMEZ, B.; SAYIN, S.; YALCINKAYA, E. E.; SELECI, D. A.; YILDIZ, H. B.; DEMIRKOL, D. O.; TIMUR, S.. Calixarene modified montmorillonite: a novel design for biosensing applications. **RSC Adv.**, v 4, p 62895–62902, 2014.
- [87] MAIGA, M.; YALCINKAYA, E. E.; SONMEZ, B.; PUGLIA, D.; YAVUZ, M.; DEMIRKOL, D. O.; KENNY, J. M.; TIMUR, S.. CTAB modified dellite: a novel support for enzyme immobilization in bio-based electrochemical detection and its in vitro antimicrobial activity. **Sensors Actuators B-Chem.**, v 235, p 46–55, 2016.
- [88] UNAL, B.; YALCINKAYA, E. E. ; DEMIRKOL, D. O.; TIMUR, S.. An electrospun nanofiber matrix based on organo-clay for biosensors: PVA/PAMAM-Montmorillonite. **Applied Surface Science**, v 444, p 542–551, 2018.
- [89] LI, C-P.; FAN, S.; YIN, C.; ZHANG, N.; DUA, S.; ZHAO, H.. Carboxylic silica nanosheet–platinum nanoparticle modified glass carbon electrodes for pesticide detection. **Anal. Methods**, v 6, p 1914, 2014.
- [90] SCOGNAMIGLIO, V., PEZZOTTI, G., PEZZOTTI, I., CANO, J., BUONASERA, K., GIANNINI, D., GIARDI, M.T., 2010. **Microchim. Acta**, v 170, n 3, p 215–225, 2010.
- [91] SANTOS, G. P.; SILVA, B. F.; GARRIDO, S. S.; MASCINI, M.; YAMANAKA, H. Design, synthesis and characterization of a hexapeptide bio-inspired by acetylcholinesterase and its interaction with pesticide dichlorvos. **Analyst**, v 139, n 1, p 273–9, 2014.
- [92] MASCINI, M.; SERGI, M.; MONTI, D.; CARLO, M DEL.; COMPAGNONE, D. Oligopeptides as mimic of acetylcholinesterase: from the rational design to the application in solid-phase extraction for pesticides oligopeptides as mimic of acetylcholinesterase: from the rational design to the application in solid-phase extraction for pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9150–9156, 2008.

- [93] RODRIGUES, N. F. M.. Desenvolvimento de sensor bioinspirado em hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas. 2018. Tese. (Doutorado em Química). Instituto de Química – UNESP, Araraquara.
- [94] KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.. Aplicações de QCM, EIS E SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v 27, n 6, p 970-979, 2004.
- [95] DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T.. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v 27, n. 6, p 970-979, 2004.
- [96] BARSOUKOV, E.; MacDONALD, J. R.. **Impedance spectroscopy: theory, experiment and applications**. 2^a ed. - Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
- [97] ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, D.. **Electrochemical impedance spectroscopy**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008.
- [98] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, v 5, 1996.
- [99] WANG, J.. **Analytical Electrochemistry**. Ed. Wiley-VCH, 2^a ed., New York, 2001.
- [100] GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J.. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, New York, John Wiley & Sons LTD, Ellis Horwood Limited, 1985.
- [101] MELO, L. O.. Preparação e caracterização de filmes finos sol-gel de N_2O_5 dopados com Li^+ visando possível aplicação em arquitetura. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [102] ILER, R.. Multilayers of colloidal particles. **J. Colloid Interface Sci.**, v 21, p 569–594, 1966.
- [103] LEE, D.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E.. All-nanoparticle thin-film coatings. **Nano Lett.**, v 6, p 2305–2312, 2006
- [104] DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J.. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, p 210–211, 831–835, 1992.
- [105] DUBAS, S. T.; SCHLENOFF, J. B.. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. **Macromolecules**, v 32, p 8153–8160 1999.
- [106] RICHARDSON, J. J.; BJÖRNMALM, M.; CARUSO, F.. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. **Science**, v 348, n 6233, 2015.

- [107] VOSSEN, C. A. Nanocompósitos de ABS/PA e argilas organofílicas. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [108] PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V.. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v 54, n 330, p 213, 2008.
- [109] SOLOMONS, T. W. G.; CRAIG FRYHLE, C.. **Química Orgânica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: ed. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1996.
- [110] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: ed. Livros Técnicos e Científicos, 2000.
- [111] IONASHIRO, C. J.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 121, n. 26, p. 17-24, 1980.
- [112] WATT, I. M. **The Principles and Practice of Electron Microscopy**. New York: Cambridge University Press, 2nd ed., 1997.
- [113] CHEN, D.; SUN, X.; GUO, Y. QIAO, L.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-SnO₂-chitosan nanocomposite. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, p. 315–321, 2015.
- [114] SEQUARIS, J. M.. Hexacyanoferrate(III) Transport in Coated Montmorillonite Clay Films. Effects of Water-Soluble Polymers. **Langmuir**, v 16, n 3, p 1368–1378, 2000.
- [115] BOZOKALFA, G.; AKBULUT, H.; DEMIR, B.; GULER, E.; GUMUS, Z. P.; DEMIRKOL, D. O.; ALDEMIR, E.; YAMADA, S.; ENDO, T.; COSKUNOL, H.; TIMUR, S.; YAGCI, Y.. Polypeptidelfunctional surface for the aptamer immobilization: electrochemical cocainebiosensing. **Anal. Chem.**, v 88, n 7, p 4161–4167, 2016.