

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

João Pedro Corrêa de Camargo

**Preparação e caracterização de biossensores baseado na
eletrodeposição de grafeno/polipirrol/acetilcolinesterase para
determinação de pesticidas em amostras de frutas e vegetais**

Botucatu

2017

JOÃO PEDRO CORRÊA DE CAMARGO

Preparação e caracterização de biossensores baseado na eletrodeposição de grafeno/polipirrol/acetilcolinesterase para determinação de pesticidas em amostras de frutas e vegetais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ivana Cesarino

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Camargo, João Pedro Corrêa. Preparação e caracterização de biossensores baseado na eletrocodeposição de grafeno/polipirrol/acetilcolinesterase para determinação de pesticidas em amostras de frutas e vegetais / João Pedro Corrêa Camargo. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivana Cesarino
Capes: 90500008

1. Biossensores. 2. Pesticidas - Resíduos em alimentos.
3. Nanotecnologia. 4. Frutas. 5. Produtos vegetais.

Palavras-chave: Biossensores; Carbaril; Imobilização; Nanotecnologia.

Agradecimentos

Aos meus pais, Marcos e Silvia, pelo carinho, dedicação, amor e confiança ao percorrer de todo esse caminho. O amor e compreensão de vocês foram essenciais para que mais essa etapa da minha vida fosse concluída

Ao meu Irmão, Vitor, pela amizade e companheirismo.

A minha família que me apoiou e me ajudou em momentos decisivos para que tudo desse certo em minha jornada para conclusão desse mestrado.

À minha namorada Giseli que sempre me deu forças para continuar e me incentivou cada vez mais a conseguir meus objetivos.

Aos meus sogros Iara e Ricardo, sempre solícitos em ocasiões em que foi preciso, meu sincero obrigado.

A Profa. Dra. Ivana Cesarino, pelo conhecimento, pela orientação e pela paciência que foi necessária para continuar os estudos. Obrigado

Ao Prof. Dr. Alcides Lopes Leão, por ter disponibilizado o local para os estudos, disponibilizado a ser coorientador quando foi preciso, e pela oportunidade da viagem ao exterior. Muito obrigado pela confiança.

Ao Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa, que sempre disponibilizou seu tempo e conhecimento nas horas que precisei, sempre solicito a ajudar em todos os momentos, as críticas de como melhorar tanto academicamente como em horas de apresentação. Meu muito obrigado.

Aos colegas de laboratório pelo apoio e carinho e pelas conversas e companhia para animar o ambiente de trabalho deixando-o mais leve e fácil de se trabalhar.

A Juliana Cristina Rubio Lampkowski e seu marido Marcelo Lampkowski, pela amizade e risadas compartilhadas, e pelos conselhos valiosos que me foram ditos.

Aos amigos da pós-graduação em Biotecnologia pelos momentos de amizade e descontração.

A fundação de amparo a pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto nº 2015/02136-2, meu sincero obrigado.

Resumo

Um novo biossensor foi desenvolvido baseado na simples eletrodeposição do óxido de grafeno reduzido (rGO), polipirrol (PPy) e da enzima acetilcolinesterase (AChE) na superfície do eletrodo de platina (Pt). No intervalo de potencial -0,2 a +0,5 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹), utilizando voltametria de pulso diferencial (DPV), observou-se um processo em +0,1 V e este corresponde a dimerização dos produtos de oxidação eletroquímica da tiolcolina, formando ditio-bis-colina. O biossensor desenvolvido foi avaliado utilizando DPV na análise do pesticida carbaril, o qual inibe a ação da enzima AChE. Os melhores resultados obtidos foram com as seguintes condições otimizadas: 75 mV amplitude de pulso, incremento de potencial de 4 mV, e uma solução tampão fosfato (PBS) 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0. Usando tais parâmetros observou-se uma resposta linear para o carbaril no intervalo de 0,1 a 0,5 µmol L⁻¹, com um limite de detecção de 11,6 nmolL⁻¹ (2,3 µg/kg), que é um limite adequado para determinar carbaril nas culturas em que este pesticida é aplicado considerando o limite máximo de resíduo permitido pelas legislações brasileiras. O biossensor proposto, Pt/rGO/PPy/AChE, foi aplicado com sucesso na determinação de carbaril em amostras de tomate e repolho.

Palavras – chave: Biossensores, nanotecnologia, carbaril, imobilização, acetilcolinesterase.

Abstract

A new biosensor was developed by a simple electrocodeposition of reduced graphene oxide (rGO), polypyrrole (PPy) and the enzyme acetylcholinesterase (AChE) on surface of platinum (Pt) electrode. In potential range of -0.2 to +0.5 V vs. Ag/AgCl/KCl (3.0 mol L⁻¹), using differential pulse voltammetry (DPV), it was observed a process in + 0.1 V and this corresponds to the dimerization of electrochemical oxidation products of thiocholine, resulting in ditio-bis-choline. The biosensor developed was evaluated using DPV in the analysis of carbaryl, which inhibits the AChE enzyme action. The best results achieved were with the followings optimized conditions: 75 mV pulse amplitude, step potential of 4 mV, and a phosphate buffer solution (PBS) 0.2 mol L⁻¹ and pH 6.0. Using these parameters was observed a linear response to carbaryl in a range of 0.1 to 0.5 μmol L⁻¹, with a detection limit of 11.6 nmol L⁻¹ (2.3 μg/kg), which is an appropriate limit for determination of carbaryl in the cultures which these pesticide is applied, considering the maximum residue limit allowed by Brazilian legislation. The biosensor proposed, Pt/rGO/PPy/AChE, was applied successfully in the determination of carbaryl in samples of cabbage and tomato.

Key words: Biosensor, nanotechnology, carbaryl, immobilization, acetylcholinesterase.

Lista de Abreviaturas

PPy – Polipirrol

rGO – Oxido de grafeno reduzido

AChE – Acetilcolinesterase

GO – Oxido de grafeno

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PANI – Polianilina

BSA – Soro de albumina bovina

CV – Voltametria cíclica

DPV – Voltametria de pulso diferencial

GC – Carbono vítreo

AChI – Iodeto de acetiltiocolina

ANVISA – Agencia nacional de vigilância sanitária

MAPA – Ministério da Agricultura, pecuário e abastecimento

LOD – Limite de detecção

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química do carbaril.....	14
Figura 2 – Funcionamento do Biossensor.....	15
Figura 3 – Esquema mostrando alguns tipos de imobilização.....	16
Figura 4 – Estrutura 2D do grafeno.....	19
Figura 5 – Oxido de grafeno reduzido quimicamente.....	20
Figura 6 – Estrutura química do pirrol e polipirrol.....	23
Figura 7 – Mecanismo de ação da enzima acetilcolinesterase, principio o qual o biossensor confeccionado por este trabalho se baseia.....	24
Figura 8 – Célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , junto com os três eletrodos utilizados neste trabalho.....	27
Figura 9 – Eletrodo de platina usado para preparação do biossensor de rGO/PPy/AChE.28	
Figura 10 – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.....	28
Figura 11 – Eletrodo auxiliar constituído de uma placa com um fio de platina, conectado em um fio de cobre e recoberto com um capilar de vidro.....	29
Figura 12 – Mistura de oxido de grafeno, dodecilsulfato de sódio e etanol.....	32
Figura 13 – Oxido de grafeno reduzido em tubos de centrifuga para sua lavagem	33
Figura 14 – Mistura depois de lavada na centrifuga pela primeira vez, notando assim as impurezas contidas no tubo.....	34
Figura 15 – Mistura de etanol com oxido de grafeno reduzido, após passar por três processos de centrifugação, percebendo o sobrenadante cristalino.....	35
Figura 16 – Mostrando o solido em placa de petri, para ser levado à estufa e seco	36
Figura 17 – Oxido de grafeno reduzido quimicamente, e seco pela estufa para estudos...36	
Figura 18 – Eletrodo de platina modificado com rGO/PPy/AChE, modificado visualmente com sucesso devido ao fato da mudança de coloração na superfície do eletrodo.....	38
Figura 19 – Suco de repolho já coado para ser feita sua análise.....	39
Figura 20 – Suco de tomate já coado para ser feita sua análise	40
Figura 21 – Procedimento de análise do repolho “ <i>in situ</i> ”	41

Figura 22 – Voltamogramas cíclicos para os eletrodos GC/GO e GC/rGO em solução de H_2SO_4 contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	42
Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura para: A) rGO, B) PPy, C) compósito rGO/PPy e D) biossensor rGO/PPy/AChE.....	44
Figura 24 – Voltamogramas de pulso diferencial para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 na ausência do AChI (linha pontilhada) e na presença de $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI (linha sólida)	45
Figura 25 – Voltamogramas de pulso diferencial para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI e após adições de (a) 1,0; (b) 2,0; (c) $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril.....	46
Figura 26 – DPV para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0: (a) após a adição de $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI; (b) após a adição de $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril; (c) após deixado em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 por 10 min e realizado o estudo, novamente, com $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI.....	46
Figura 27 – DPV para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI para (a) 2, (b) 5, (c) 10 ciclos na CV no intervalo de potencial de -1,2 V a +0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	47
Figura 28 – DPV e variação do pH vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI para os diferentes valores de pH.....	48
Figura 29 – DPV e variação da amplitude de pulso vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI..	49
Figura 30 – DPV e variação do incremento de potencial vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI..	50
Figura 31 – Voltamogramas DPV para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0. As concentrações de carbaril em $\mu\text{mol L}^{-1}$ são: T) $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ AChI; a) 0,1; b) 0,2; c) 0,3; d) 0,4; e) 0,5. No detalhe: Dependência linear da porcentagem de inibição da corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em relação a concentração de carbaril adicionada.....	51

Figura 32 – Experimentos de cronoamperometria para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE contendo somente o substrato (linha vermelha) e após adições de carbaril (linhas pretas). No detalhe: dependência linear da corrente de pico com as concentrações de carbaril.....52

Figura 33 – Curvas DPV obtidas pelo biossensor Pt/rGO/PPy/AChE para a determinação de carbaril em amostra de repolho: (T) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AChI; (a) amostra, (b) amostra mais 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril; (C) amostra mais 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril; (d) amostra mais 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril. No detalhe: dependência linear da porcentagem de inibição da corrente de pico em relação a concentrações de carbaril.....53

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros otimizados por DPV para o sinal analítico da ditio-bis-colina usando o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE.

Tabela 2 – Resultados para determinação de carbaril em amostras de repolho e tomate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Considerações gerais.....	13
1.2. Pesticidas.....	13
1.3. Carbaril.....	14
1.4. Biossensores.....	15
1.5. Tipos de imobilização.....	16
1.5.1. Adsorção Física.....	17
1.5.2. Microencapsulamento.....	17
1.5.3. Ligação covalente e ligação covalente cruzada.....	18
1.5.4. Oclusão em gel.....	18
1.6. Grafeno.....	19
1.6.1. Óxido de grafeno.....	20
1.6.2. Óxido de grafeno reduzido.....	21
1.6.2.1. Tratamento térmico.....	21
1.6.2.2. Redução por micro-ondas e iluminação.....	22
1.6.2.3. Redução Química.....	23
1.7. Polipirrol.....	23
1.8. Acetilcolinesterase.....	25
1.9. Dispositivos eletroquímicos para análise de pesticidas.....	26
2. OBJETIVO.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Equipamentos e Métodos.....	28
3.2. Reagentes e Soluções.....	30
3.3. Síntese do óxido de grafeno.....	30
3.4. Síntese do óxido de grafeno reduzido.....	32
3.5. Preparação do eletrodo de carbono vítreo modificados com GO/rGO.....	36
3.6. Preparação do Biossensor.....	37

3.7. Preparação da solução de iodeto de acetiltiocolina e adições de carbaril.....	38
3.8. Preparação dos vegetais e frutas para análise de pesticidas.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Caracterização eletroquímica dos materiais sintetizados: GO e rGO.....	42
4.2. Caracterização morfológica dos materiais.....	43
4.3. Caracterização eletroquímica do biossensor.....	44
4.4. Parâmetros para a otimização do processo de oxidação da tiocolina em resposta ao biossensor Pt/rFO/PPy/AChE.....	47
4.5. Resposta analítica do carbaril utilizando o biossensor proposto.....	50
4.6. Análise de carbaril em amostras de repolho e tomate.....	52
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS.....	56

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

O aumento da população mundial induz à busca por meios de produção mais eficientes de alimentos. Na lavoura, as pragas constituem uma ameaça, pois diminuem a quantidade e a qualidade dos alimentos produzidos. Assim, para atender a necessidade de produção cada vez maior, estas pragas são intensamente combatidas com os conhecidos pesticidas, que são substâncias químicas tóxicas, adicionados às culturas para o controle das pragas. Por serem tóxicos, estes pesticidas causam malefícios à saúde humana, sendo que, a quantidade destes pesticidas em alimentos, águas e mesmo no ar deve ser continuamente monitorada.

Atualmente, os métodos para a determinação e/ou monitoramento ambiental de pesticidas incluem a cromatografia gasosa, líquida, de camada delgada e várias técnicas espectroscópicas. Entretanto, as matrizes ambientais, de alimentos ou biológicas são muito complexas, apresentando uma quantidade de interferentes que, na maioria das vezes, inviabilizam a determinação direta. Assim, uma manipulação das amostras é normalmente necessária, o que dificulta e torna o custo das análises e determinações consideravelmente elevado. Desta forma, estas técnicas apresentam desvantagens associadas ao custo, tempo de execução, sendo a principal desvantagem a impossibilidade da análise *in situ*.

Diante desse cenário, técnicas analíticas adequadas que permitam a análise de campo e *in situ*, com o objetivo da determinação de pesticidas em baixos níveis de concentração nessas amostras complexas são extremamente importantes. Assim, foi desenvolvido e caracterizado biossensores eletroquímicos baseados na eletrodeposição do polipirrol (PPy), óxido de grafeno reduzido (rGO) e a enzima acetilcolinesterase (AChE) para a determinação do pesticida carbaril em amostras de frutas e vegetais.

1.2. Pesticidas

Segundo o ministério do meio ambiente do Brasil, pesticidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas,

nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais¹.

Ou seja, são substâncias que visam mudar a composição da fauna e flora para preservá-las de ações danosas de seres vivos considerados nocivos, também são considerados pesticidas produtos desfolhantes, dessecantes, estimuladores, e inibidores de crescimento. Os pesticidas, também conhecido como agrotóxicos, podem ser classificados em duas formas diferentes, os agrícolas e os não-agrícolas.

Os agrícolas, são usados nos setores de produção, armazenamento e benefício de produtos agrícolas, nas pastagens e nas florestas plantadas – cujos registros são concedidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, atendidas as diretrizes e exigências dos Ministérios da Saúde e do Meio Ambiente.

Os não-agrícolas são destinados a proteção da floresta nativa, outros ecossistemas ou ambientes hídricos, ambientes urbanos e industriais, domiciliares, públicos ou coletivos, ao tratamento de água, e ao uso em campanhas de saúde pública¹.

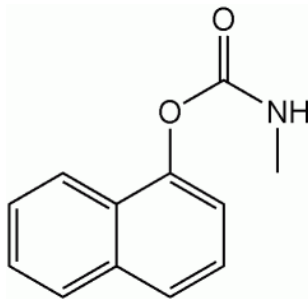
Devido a sua grande aplicabilidade e quantidades usadas nas plantações, grande parte dos alimentos que não são orgânicos, podem chegar ao consumidor com pesticidas, podendo causar diversos problemas à saúde humana, fazendo-se assim, necessário um monitoramento das quantidades dos pesticidas nestas amostras de alimentos.

1.3. Carbaril

O carbaril (1- naftil metilcarbamato), apresentado na Figura 1, é um princípio ativo de muitos pesticidas, com fórmula molecular $C_{12}H_{11}NO_2$ ². Sendo no Brasil, pesticidas com esse princípio ativo só podem ser empregados em culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate, tendo cada cultura um intervalo de segurança a ser respeitado para a distribuição do produto em centros comerciais². O carbaril foi escolhido para ser estudo deste trabalho devido ao fato de ser um dos pesticidas usados em culturas de tomate e couve-flor. O Brasil é um dos maiores produtores de tomate do mundo, e seu comércio vem crescendo cada dia mais, fazendo-se necessário o desenvolvimento de um

método de análise preciso e *in situ* para descobrir se o método de lavagem do produto foi efetivo ou não.

Figura 1. Estrutura molecular do Carbaril

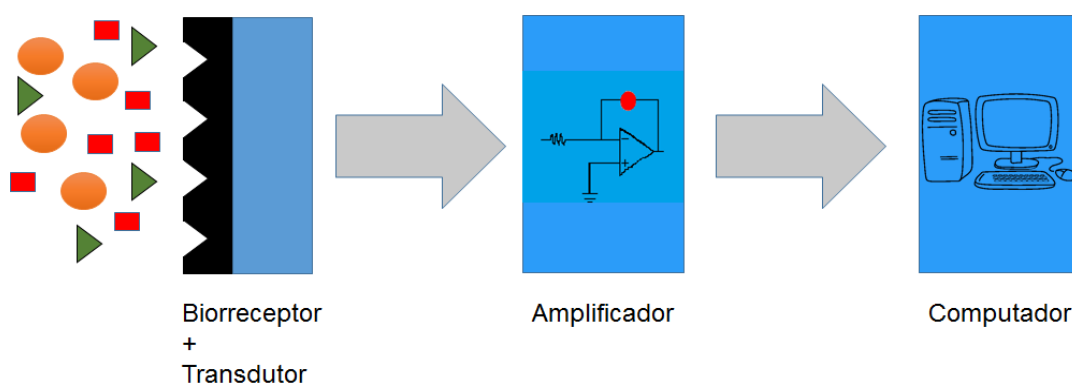


Fonte: Agencia nacional de vigilância sanitária (ANVISA)

1.4. Biossensores

Biossensores são dispositivos baseados em componentes biológicos (enzimas, anticorpos, tecidos animais e vegetais, etc.), ligado a um material capaz de transformar um tipo de estímulo não mensurável em tipo de estímulo mensurável (transdutor), no qual converte um estímulo biológico (reação química) que não é mensurável, em um estímulo elétrico que pode ser medido por algum tipo de equipamento, como representado na Figura 2. Para um biossensor funcionar, é necessário a imobilização um material biológico em um transdutor, que fará uma avaliação para verificar a perda ou o ganho de algum componente ou de sinais elétricos³.

Figura 2. Representação do funcionamento de um biossensor



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Os biossensores que se tem estudado nos últimos tempos, são os biossensores enzimáticos, utilizando a técnica de imobilização enzimática em um transdutor para a conversão de reações químicas em corrente, tensão, ou transformar em qualquer forma de energia mensurável.

Sendo que na superfície do eletrodo, ocorrerá um processo dinâmico em que a conversão da enzima em produto e a difusão do produto vindo da camada enzimática, tendo o complexo enzima e substrato, comitantemente com a formação do produto por ser um processo dinâmico⁴.

Sendo assim, os biossensores são materiais de baixo custo, versáteis, de fácil síntese e com grande potencial analítico, sendo considerados dispositivos promissores, devido sua facilidade de manipulação e simplicidade, sendo alvo cada vez mais de pesquisas tanto na área da saúde quanto na área alimentícia.

1.5. Imobilização Enzimática e tipos de imobilização da enzima

A imobilização da enzima é de extrema importância devido a algumas características que a imobilização concede, como por exemplo, evita a perda de sua atividade enzimática, facilita a sua estabilidade e, principalmente, reduz o tempo de resposta do processo enzimático.

A enzima pode ser imobilizada com duas classes: a imobilização reversível e a imobilização irreversível. A imobilização reversível, é quando o complexo enzima-substrato pode ser desfeito, assim como o próprio nome sugere (reversível), sendo ele dividido em três diferentes tipos - competitivo (compete pelo sítio ativo do substrato), não competitivo (se liga em outro sítio) e incompetitivo (quando a enzima tem afinidade pelo complexo enzima-substrato).

Já na imobilização irreversível, ou também conhecida como imobilização suicida, a substância que promoverá a imobilização, geralmente se liga de forma covalente e progressiva à enzima, que continua até a sua inibição e, em alguns casos, podendo até provocar a destruição da função da enzima. Nesse trabalho usaremos a imobilização reversível competitiva.

Atualmente, conhecemos algumas técnicas de imobilização reversível como a adsorção física, microencapsulamento, oclusão em gel, ligação covalente cruzada e

ligação covalente (Figura 3). Vale ressaltar que para cada tipo de biossensor, pode ser usado um tipo diferente de imobilização que podem conferir vantagens e desvantagens ao biossensor (sendo necessários estudos de como é o melhor jeito de imobilização para o biossensor que está sendo utilizado), influenciando e, até mesmo, modificando as respostas obtidas⁴.

1.5.1. Adsorção Física

Esse é o método mais simples de se imobilizar a enzima, pois se baseia nas interações ocorridas entre a enzima e a superfície da matriz. A grande vantagem de se usar o método de adsorção física são os baixos custos e a facilidade de imobilização, contudo, as interações feitas por esse tipo de imobilização podem ser facilmente desfeitas, devido ao fato de que as forças de ligações envolvidas nesse processo resultam em uma variação grande de pH e temperatura, resultando em rompimento da imobilização⁴.

1.5.2. Microencapsulamento

Esse método se baseia no confinamento da enzima em uma membrana que se encontra na superfície do eletrodo. Essa membrana retém a enzima, apresentando uma porosidade controlada, permitindo a livre difusão do substrato e dos produtos da reação e crescimento da mesma. Como exemplos temos as membranas de náilon, nitrato de celulose, acetato de celulose, resinas, colágeno e policarbonatos. Uma das desvantagens desse tipo de imobilização está associada aos fenômenos de transferência de massa do substrato, aos produtos da reação e ao crescimento de microrganismos na membrana⁴.

1.5.3. Ligação covalente e ligação covalente cruzada

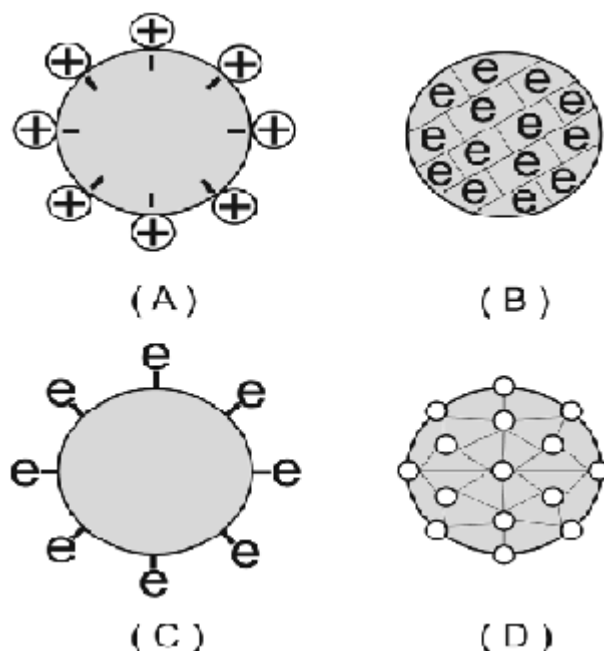
Esta tem sido a forma de imobilização mais usada, sendo baseada na retenção da enzima na superfície do suporte pela ligação entre grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. A desvantagem que temos nesse tipo de imobilização está na perda de parte da atividade enzimática devido às alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima. E na ligação covalente cruzada (*crosslinking*) tem-se a formação de um

sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma ligação enzima-enzima mais sólida, na qual, podemos ter a formação de barreiras de difusão, resultando no aumento de resposta do biossensor⁴.

1.5.4. Oclusão em gel

Esse método se dá no confinamento da enzima dentro dos espaços intersticiais de um gel, permitindo a livre difusão de substratos de baixo peso molecular e dos produtos da reação. Como exemplos de materiais que tem sido utilizado para a oclusão da enzima, têm-se o gel de poliacrilamida, álcoois polivinílicos, grupos catiônicos e aniônicos, entre outros, sendo a oclusão de enzimas em camadas de polímeros condutores uma das formas de imobilização que possui cada vez mais estudos e pesquisas. A vantagem do método é que, na maior parte desses estudos, não é necessário a utilização de agentes aglutinantes, que se ligam aos sítios ativos da enzima, inibindo sua atividade, e sua desvantagem é que em alguns casos a inibição da enzima pode ocorrer na oclusão em gel, devido ao fato de que podem existir radicais livres em meio ao gel, possibilitando a inibição da enzima⁴.

Figura 3. Esquema ilustrando alguns tipos de imobilização: (a) absorção, (b) encapsulação, (c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada. (



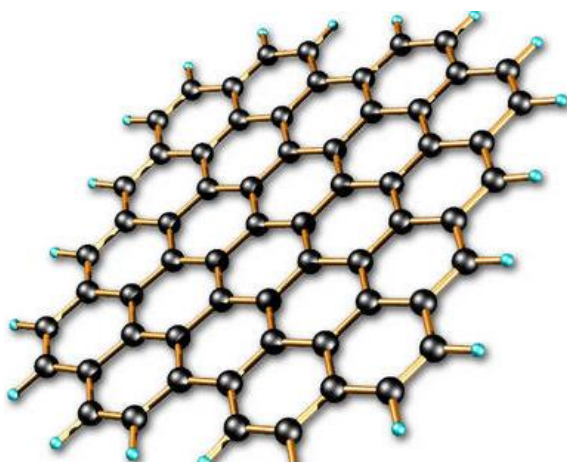
Fonte: MARQUES P.; YAMANAKA H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. Química nova, 2008, v.31, p.1791-1799.

1.6. Grafeno

O grafeno é um material que tem sido estudado nos últimos anos como um nanomaterial com conformação em 2D e com excepcionais propriedades físicas, químicas e eletroquímicas. O grafeno apresenta grandes vantagens quando comparado com o grafite ou aos nanotubos de carbono. Um exemplo é a área superficial do grafeno que é de $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, muito maior que a do grafite ($\sim 10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e relativamente maior que do nanotubo de carbono ($1315 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)⁵.

Os eletrodos de grafeno têm uma uniformidade maior quando distribuídos sobre o substrato e possuem uma distribuição eletroquímica dos sítios ativos melhor quando comparado com o grafite, possuindo propriedades elétricas semelhantes as dos nanotubos de carbono. Contudo, a grande vantagem é que o grafeno é preparado a partir do grafite, por isso, tem-se uma diminuição de materiais heterogêneos, diferente dos nanotubos de carbono que são obtidos a partir de gases contendo carbono e catalisados por nanopartículas metálicas⁵.

Figura 4. Forma estrutural do grafeno 2D



Fonte: Domínio público (<http://tecnologia.culturamix.com/tecnologias/o-que-e-grafeno>).

1.6.1. Óxido de Grafeno (GO)

O óxido de grafeno foi preparado pela primeira vez por Brodie⁶, tendo uma mistura oxidativa de cloreto de potássio e ácido nítrico. Muitos outros processos foram feitos contendo oxidantes fortes e um ou mais ácidos concentrados⁷, entretanto em 1957 o cientista William S. Hummers⁷ desenvolveu um método que utiliza menos ácidos

concentrados e menos agentes oxidantes, conhecido por método de Hummers, o qual foi efetivo e satisfatório para a obtenção de óxido de grafeno quando comparado com os métodos anteriormente usados para oxidar o grafeno, com duas grandes vantagens: 1) pode ser produzido com grafite como matéria prima e oxidado por processos químicos de baixo custo e alta eficiência, e 2) é altamente hidrofílico, podendo formar soluções muito estáveis na presença de coloides por um processo simples e barato.

O óxido de grafeno tem uma estrutura molecular parecida com a do grafite, entretanto o plano dos átomos de carbonos no óxido de grafeno é bastante carregado por grupos que contém oxigênio, que além de aumentar a distância entre as camadas fazendo com que, as camadas se tornem hidrofílicas, permitindo que essas camadas oxidadas possam ser expostas a banhos de água com vibrações moderada na água. Uma propriedade que tem atraído interesse do GO é sua capacidade de ser reduzido. Grafeno obtido a partir do GO reduzido, que também é chamado de folhas de grafeno funcionalizadas ou óxido de grafeno quimicamente reduzido, geralmente tem defeitos estruturais abundantes⁸⁻⁹ e grupos funcionais¹⁰, que são vantagens para aplicações eletroquímicas.

1.6.2. Óxido de grafeno reduzido (rGO)

O óxido de grafeno reduzido é tipicamente considerado uma forma do grafeno quimicamente derivado. Assim, temos algumas formas de se obter o grafeno funcionalizado ou reduzido. Os dois métodos mais utilizados são o tratamento térmico e a redução química, tendo os dois vantagens e desvantagens na hora da síntese e nas propriedades obtidas do grafeno¹¹. A Figura 5 mostra o rGO obtido pelo método químico e utilizado neste trabalho.

Figura 5. Óxido de grafeno reduzido quimicamente



Fonte: Próprio autor

1.6.2.1. Tratamento Térmico

O óxido de grafeno pode ser reduzido por um tratamento térmico chamado tratamento térmico de redução, que consiste em um aquecimento rápido do GO para se obter o grafeno a partir do óxido de grafeno ($>2000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Com isso, o mecanismo de exfoliação é, primariamente, a rápida expansão do CO_2 e CO envolvendo espaços entre a folha de grafeno, durante o aquecimento rápido. Com isso, os grupos funcionais de oxigênio acabam se decompondo em gases que criam uma grande pressão no sistema, entre as folhas empilhadas, sendo necessário uma pressão de 2,5 MPa para separar duas folhas de grafeno. A decomposição dos grupos contendo oxigênio também acaba levando consigo alguns átomos de carbono do grafeno, levando assim, um dano à estrutura do grafeno, devido a retirada dos carbonos pelo dióxido de carbono. Isto causa alterações inevitáveis nas propriedades eletroquímicas do grafeno devido a diferença de tamanho da estrutura e criando centros de espalhamento no material, ocorrendo a perda de condutividade elétrica, devido as imperfeições no material. Algumas formas de diminuir as imperfeições causadas pelas altas temperaturas estão sendo estudadas, como por exemplo, fazer o tratamento térmico em ambientes inertes, como em gás H_2 . Isto pode ajudar a diminuir a temperatura do sistema sem que diminua as propriedades desejadas no material. Outro exemplo, é o tratamento em baixa pressão utilizando NH_3 . Esta opção tem sido efetiva, não causando perdas na condutividade elétrica do material. Outros estudos que estão sendo realizados para a recuperação da estrutura do rGO é colocar o mesmo sob uma fonte de carbono em alta temperatura ($800\text{ }^{\circ}\text{C}$). Trabalhos nesse sentido foram feitos com etileno e moléculas aromáticas durante a pirólise, e esses pós-tratamentos ajudam na recuperação de condutividade elétrica perdida durante o tratamento térmico¹¹.

O tratamento térmico do grafeno apresenta ainda mais alguns inconvenientes. Alta temperatura, por exemplo, demanda de um grande consumo de energia. Outro problema é que os tratamentos necessitam ser realizados para que se diminua os danos causados pela a exposição a altas temperaturas é realizada em aquecimento lento, caso contrário, a estrutura pode sofrer uma quebra e causar somente a exfoliação do grafeno aumentando assim o tempo de para se obter a redução do oxido de grafeno. Finalmente, o mais

importante de todos, não é possível trabalhar com materiais que tenham um ponto de ebulição baixo devido as altas temperaturas¹².

1.6.2.2. Redução por micro-ondas e luminosidade

Atualmente, tem-se usado o método de redução por irradiação térmica, no qual o GO é disperso em uma superfície plana e levado ao micro-ondas convencional por um minuto em condições ambientes. A grande vantagem desse método é que o GO é reduzido uniformemente e rapidamente. Já na redução por luminosidade, o GO é iluminado em uma distância muito próxima por uma luz de xênon e a energia emitida pode ser nove vezes maior que a energia térmica, a qual pode ser mais que o suficiente para a degradação do GO para sua forma reduzida. Sendo assim, os filmes de GO podem aumentar seu tamanho dez vezes mais, devido à rápida retirada dos gases resultando assim em uma condutividade elétrica um pouco maior quando comparado com o método de micro-ondas¹².

1.6.2.3. Redução química

A redução química é o método baseado no uso de reagentes químicos, podendo ser realizada em temperatura ambiente ou em temperatura pouco acima de 25 °C. Devido os equipamentos necessários para essa redução serem de baixo custo, esse método acaba sendo o meio economicamente viável para a produção em larga escala do rGO, tendo em vista que o tratamento térmico é necessário altíssimas temperaturas e a utilização de muita energia¹³.

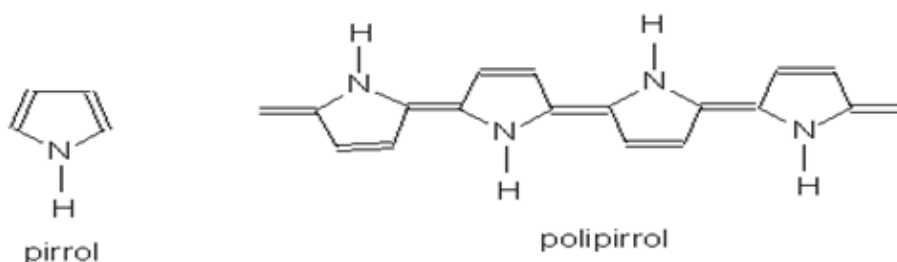
Na época em que foi desenvolvido o processo e suas primeiras reduções eram feitos com hidrazina e seus derivados (hidrazina hidratada e dimetilhidrazina), sendo a hidrazina considerado um bom reagente químico para reduzir o GO. Entretanto, outros reagentes químicos apareceram com a mesma função de reduzir o GO como, por exemplo, o borohidreto de sódio (NaBH_4). Trabalhos da literatura mostram que o NaBH_4 foi mais eficiente que a hidrazina na redução do GO, sendo mais efetivo para reduzir ligações $\text{C} = \text{O}$. Porém, ele tem uma menor efetividade em reduzir grupos epóxi e ácidos carboxílicos e se hidrolisa com baixa velocidade em água¹⁴. Uma possível solução para uma completa redução do GO quando o borohidreto de sódio foi proposto por Gao *et al*¹⁵, que é a desidratação utilizando ácido sulfúrico concentrado (98%) à 180 °C, depois da redução com NaBH_4 , resultando em um aumento da condutividade elétrica. O método de redução

química do GO utilizando o borohidreto de sódio, foi aplicado neste trabalho para a ser utilizado na confecção do biossensor.

1.7. Polipirrol

O polipirrol é um polímero condutor, com grande importância na pesquisa, devido sua biocompatibilidade, catálise, estabilidade, condutividade, sendo uma de suas principais vantagens, é que sua polimerização pode ser realizada em pH neutro. Mesmo com todas essas vantagens, o polipirrol é um composto que tem poucos estudos, entretanto, atualmente, o polipirrol vem ganhando cada vez mais espaço no âmbito dos biossensores¹⁶.

Figura 6. Estrutura química do pirrol e polipirrol.



Fonte:

Domínio

público

(<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA2hIAH/trabalho-polimeros?part=2>).

O polipirrol pode ser sintetizado de duas maneiras diferentes: a primeira é quimicamente, utilizando agentes oxidantes muito fortes com uma solução de monômeros. A segunda é o método eletroquímico, o qual é a preferência da maioria dos pesquisadores devido sua simplicidade e controle do material. Preparara-se uma solução de pirrol em uma célula, juntamente com o material que será eletrodepositado junto com o pirrol. Depois da célula preparada, coloca-se o eletrodo de trabalho juntamente com os eletrodos de referência e auxiliar imersos na solução, a qual se deseja fazer o filme, com a passagem de corrente elétrica, o pirrol se eletropolimerizará no eletrodo de trabalho em um monômero composto de cinco pirróis heterocíclicos, obtendo-se assim o composto polipirrol. Essa eletropolimerização deve ocorrer em potenciais acima de 600 mV vs. Ag/AgCl como eletrodo de referência¹⁷ para que a eletropolimerização ocorra com sucesso, normalmente usando-se um potencial de 800 mV vs. Ag/AgCl. Esse polímero

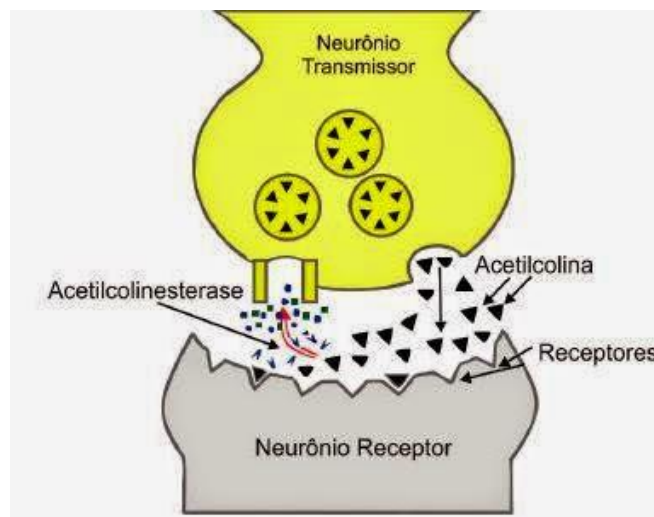
foi escolhido para a confecção do biossensor, pois ele permite a eletrodeposição na superfície do eletrodo em pH neutro, sendo assim, possível realizar a eletrodeposição de todos os materiais na superfície do sensor sem que a alteração de pH seja efetuada em cada uma das adições, e garantindo assim também a vida útil da enzima, já que não houve alterações no pH, o meio se encontra em perfeitas condições para que a enzima efetue suas reações sem que a mesma seja prejudicada por uma inibição, com a adição de que esse acaba sendo, por todas suas conveniências, um método rápido e de fácil preparação do biossensor proposto nesse trabalho.

1.8. Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)

A enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) tem como função hidrolisar compostos colina. No corpo humano (Figura 7), ela é responsável pela terminação da transmissão do impulso nervoso pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina, apresentando assim, uma grande especificidade à pesticidas de forma geral, com o biossensor confeccionado por esse trabalho. Não é possível determinar qual pesticida está sendo usado na lavoura, mas sim, se estão utilizando ou não o pesticida e quanto de pesticida está chegando ao consumidor nas prateleiras de supermercados, utilizando esse princípio o biossensor confeccionado por esse trabalho utiliza um composto com colina para realizar a reação, e após a adição do substrato, inibimos o sinal formado com os pesticidas.

Os pesticidas da classe dos carbamatos e organofosforados são os principais inibidores da enzima acetilcolinesterase. Eles inibem o sítio ativo da enzima bloqueando o resíduo de serina que seria gerado na catálise da acetilcolinesterase com a colina, pela fosforilação ou carbamilação. Os inibidores enzimáticos dessa enzima são muito estudados para o tratamento de doenças degenerativas neuromusculares, sendo utilizados nos primeiros medicamentos contra a doença de Alzheimer¹⁹. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase estão sendo cada vez mais estudados para a confecção de biossensores para controle de pesticidas como é o propósito desse trabalho.

Figura 7. Mecanismo de ação da enzima acetilcolinesterase, princípio o qual o biossensor confeccionado por esse trabalho se baseia.



Fonte: PRETRONILHO, E . C; PINTO, A. C; VILLAR, J. D. F; Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química, RMCT-067-E5A-11²⁵

1.9. Dispositivos eletroquímicos para análise de pesticidas

Atualmente, encontram-se na literatura alguns trabalhos focados na detecção de pesticidas utilizando sensores eletroquímicos. Os principais deles são descritos abaixo.

Cesarino *et al.*¹⁹ desenvolveu um biossensor baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase utilizando nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e polianilina (PANI), atingido assim um limite que permite a detecção dos pesticidas em concentrações baixas o suficiente para que se fosse possível avaliar pesticidas em lavouras no Brasil. Entretanto, a confecção do biossensor se dá em duas partes já que a polianilina necessita ser eletrodepositada em meio ácido e, logo após a fase de eletrodeposição do composto MWCNT/PANI, a imobilização da enzima AChE é realizada. Wang *et al.*²⁰, por sua vez, confeccionou um biossensor amperométrico para análise de organofosforados e carbaril, utilizando, também, a enzima acetilcolinesterase, porém, foi usado um nanocompósito baseado em quantum dots de sulfeto de cádmio e grafeno. O nanocompósito foi gotejado no eletrodo e deixado secar em temperatura ambiente, sendo depois, revestido com a enzima acetilcolinesterase e levado para incubação durante 30 minutos com temperatura de 25 °C, apresentando, também, um baixo limite de detecção.

Imunossensores foram desenvolvidos para detecção de pesticidas sendo reportado e desenvolvido por March *et al.*²¹. Eles propuseram um imunossensor com soro de albumina bovina (BSA) para análises de suco de frutas, sendo o alvo desse estudo os

princípios ativos carbaril e TCP (3,5,6-Tricloro-2-piridinol). O sensor proposto pode ser usado para ensaios de microgravimetria, atingindo um limite de detecção de $11,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Wang *et al.*²² reportou um dispositivo eletroquímico sem a presença de enzimas, baseado em cobalto II e óxido de grafeno reduzido (rGO), com o intuito de analisar carbofuranos e carbaril em amostras de uvas, laranjas, tomates e couve. Porém, a síntese desse composto baseado em Co/rGO é relativamente complexa e utiliza altas temperaturas que chegam até a 500°C . O sensor proposto atingiu limites de detecção de $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $7,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o carbofurano e carbaril, respectivamente. A grande novidade desse trabalho é a fácil confecção do biossensor, já que se realiza a eletrocodeposição de todos os constituintes (rGO/PPy/AChE), não sendo necessário o gotejamento manual dos materiais, sendo uma aposta promissora para uma análise com um curto tempo e baixo custo.

2. Objetivos

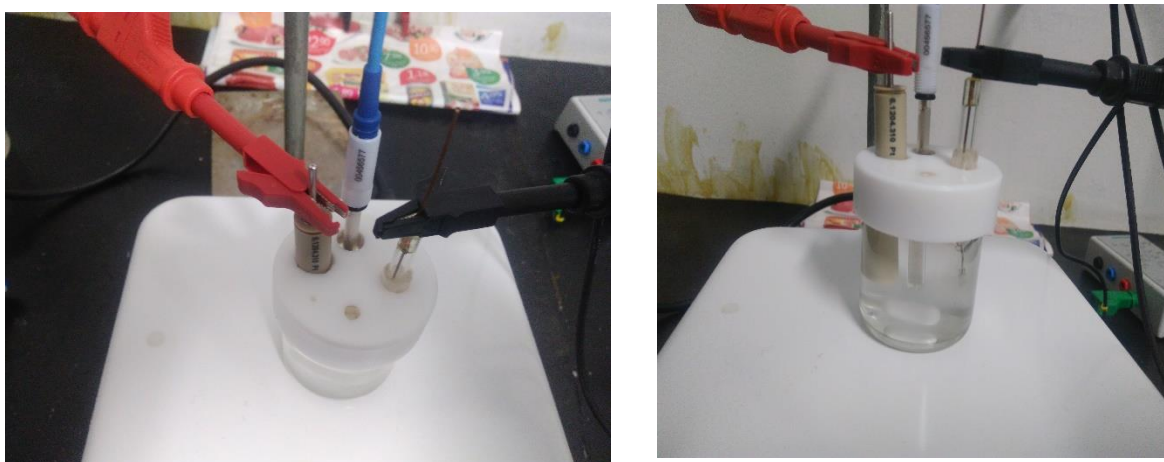
O objetivo principal desse trabalho foi a preparação, otimização, caracterização e aplicação do biossensor baseado no compósito polipirrol e grafeno na imobilização da enzima acetilcolinesterase para a determinação do pesticida carbaril em amostras de frutas e vegetais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Equipamentos e Métodos

As técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizadas utilizando um sistema eletroquímico modelo Autolab 128N (Eco Chemie, Utrecht, Holanda) equipado com *software* NOVA (Eco Chemie, Utrecht, Holanda). Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica de vidro convencional de três eletrodos como mostrado na Figura 8.

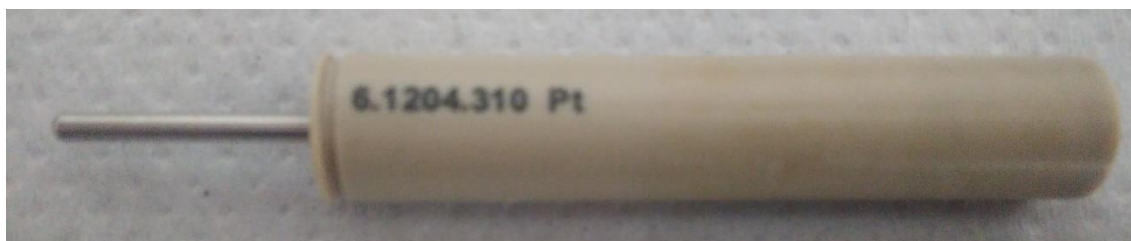
Figura 8. Célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato (PBS) 0,2 mol L⁻¹, junto com os três eletrodos utilizados nesse trabalho.

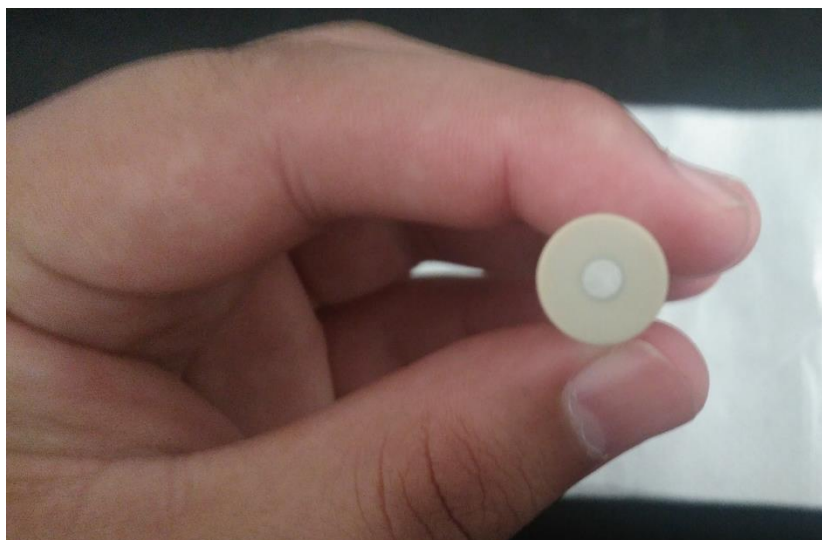


Fonte: Próprio autor

Como eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de platina como mostrado na figura 9. Onde o filme de rGO/PPy/AChE, será eletrodepositado.

Figura 9. Eletrodo de platina usado para a preparação do biossensor Pt/rGO/PPy/AChE





Fonte: Próprio autor.

Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), como mostrado na Figura 10.

Figura 10. Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl).



Fonte: Próprio autor.

E como eletrodo auxiliar foi utilizado uma placa de platina. O eletrodo auxiliar mostrado na Figura 11, é utilizado para ajudar na transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e o meio em que ele se encontra, sendo uma placa de platina para aumentar a superfície de contato.

Figura 11. Eletrodo auxiliar constituído de uma placa com um fio de platina, conectado em um fio de cobre e recoberto com um capilar de vidro.



Fonte: Próprio autor.

As medidas de DPV foram realizadas com uma amplitude de pulso de 75 mV, incremento de potencial de 4 mV, ao longo de um intervalo relevante potencial, em solução tampão fosfato (PBS) 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0.

3.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram com as concentrações mais puras que se pode adquirir por vias comerciais e usados sem purificação prévia. A enzima acetilcolinesterase (Sigma-Aldrich 2000 U/mg), sendo utilizado 80 U/mg por biossensor confeccionado, iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich) com 99% de pureza foi utilizado como substrato para as reações com a enzima acetilcolinesterase, pesticida carbaril com 99% de pureza, utilizado como inibidor da enzima para demonstrar a aplicabilidade do biossensor, tampão fosfato com concentração de 0,2 mol L⁻¹, pó de grafite (Sigma – Aldrich), 99% de pureza, para a confecção do óxido de grafeno, que posteriormete será reduzido para se transformar em óxido de grafeno reduzido, pirrol (Sigma – Aldrich) 99,9% de pureza, para ser levado ao potenciostato e eletropolimerizado junto com todos os outros reagentes para confecção do biossensor (descrito posteriormente) assim com a eletropolimerização se tornando polipirrol. Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em um sistema Millipore Milli-Q (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

3.3. Síntese do Óxido de Grafeno (GO)

O óxido de grafeno (GO) foi preparado com base no pó de grafite (tamanho de partícula menor que 20 μm – Sigma Aldrich) pelo método modificado de Hummers [7].

A princípio foi usada uma massa 12 g de grafite (Sigma – Aldrich) e colocado em um béquer de 250 mL, sendo acrescentado 11 g de NaNO₃(s) [PA 99%]. O recipiente foi reservado à parte, depois, utilizando uma proveta adicionou-se 400 mL de H₂SO₄(98%) [PA] em um erlenmeyer de 1000 mL. Esta vidraria foi colocada em banho de gelo – gelo este que atuará como uma fonte de absorção de calor, já que a reação ocorrida na adição

do grafite ao ácido (e posteriormente do oxidante KMnO_4 à mistura) é extremamente exotérmica.

Transferiu-se a mistura de grafite e $\text{NaNO}_3(\text{s})$ para o erlenmeyer que estava imerso no banho de gelo. Os recipientes, erlenmeyer e bacia, foram colocados sobre um o agitador magnético. A agitação magnética da mistura foi realizada de maneira suave, por aproximadamente 30 minutos. Durante os 30 minutos de espera, foi medido 60 g de $\text{KMnO}_{4(\text{s})}$ [PA] – permanganato de potássio: um oxidante forte – em um béquer de 250 mL, previamente medida sua massa na balança. Após transcorrido aproximadamente 30 minutos, adicionou-se de modo lento e cuidadoso toda a massa de permanganato de potássio à mistura do erlenmeyer, mantendo-o sob agitação e resfriamento com banho de gelo, por sua reação ainda exotérmica. Novamente esperou-se aproximadamente meia hora para se concluir a reação de oxidação do grafite e, após liberação de todos os vapores originados no processo, vedou-se, a boca do erlenmeyer utilizando parafilm®,

O recipiente foi deixado em repouso na geladeira e por um período de 24 horas. Passado o tempo, o erlenmeyer foi retirado da geladeira e colocado sobre uma chapa de aquecimento por aproximadamente 20 minutos a uma temperatura de 40°C . Como o grafite oxidado é extremamente viscoso aqueceu-se a mistura com o objetivo de torná-la mais líquida para que sua manipulação fosse facilitada, durante o aquecimento da mistura, colocou-se em uma proveta 150 mL de $\text{H}_2\text{O}_2 \sim 30\%$ (peróxido de hidrogênio concentrado), desligou-se o aquecimento depois dos 20 minutos estipulados anteriormente, a quantidade de H_2O_2 medida foi posta em uma pisseta e transferida aos poucos (quando necessário utilizando conta-gotas) vagarosamente e com muito cuidado no erlenmeyer. Esta etapa realiza a adição de outro oxidante para que a reação pare, pois, todos os compostos na reação já estão totalmente oxidados, finalizando este processo.

Aguardou-se o resfriamento parcial da mistura, com o objetivo de minimizar os gases desprendidos durante o processo, para então dividir ao meio a quantidade contida no erlenmeyer (~ 600 mL), transferindo a outra metade para um novo erlenmeyer, em seguida, adicionou-se 500 mL de água ultrapura nos dois erlenmeyer, fazendo com que os novos volumes ficassem próximos a 800 mL.

As misturas foram reservadas até seu completo resfriamento, chegando à temperatura ambiente. Depois vedou-se os erlenmeyers com parafilm®, mantendo-os em repouso absoluto, durante um período de 4 dias, na geladeira, posteriormente aos 4 dias,

os sobrenadantes (1) de cada erlenmeyer foram reunidos e transferidos em tubos para a centrifugação. Os sólidos, que estavam presentes no fundo dos recipientes, contendo diversas espécies e impurezas oxidadas foram refugados.

Após o sobrenadante (1) ser centrifugados a uma rotação de 20,000 rpm por 5 ou 6 vezes sempre observando se ocorrem mais separações, os resíduos sólidos que continham o grafeno oxidado foram concentrados em um único tubo, já os sobrenadantes (2) que se formavam novamente, foram desprezados, o HCl possui a função de retirar impurezas restantes, como íons e etc. assim, foi lavado o sólido resultante centrifugando com uma pequena porção de HCl 5%, sendo o novo sobrenadante (3) desse processo, desprezado. Este método foi realizado mais três vezes, utilizando água nano purificada para a lavagem do sólido, observou-se um pH próximo de sete ($\text{pH} \sim 7,0$ – neutro) no sobrenadante (água) após a quarta lavagem, dessa forma, o sólido derivado de todo o processo foi levado para ser liofilizado, obteve-se um sólido marrom, após, finalmente, o processo de liofilização, material este que em seguida foi caracterizado como sendo óxido de grafeno – GO.

3.4. Síntese do Óxido de Grafeno Reduzido (rGO)

A síntese do material em questão será ilustrada em sequência, demonstrando todas as fases do processo.

Em um béquer de 50 mL, foi posto sobre uma balança previamente zerada para que o peso do béquer não influenciasse na quantidade de massa a ser pesada. Logo após foi pesado 51 mg de óxido de grafeno (GO) e 20 mg de dodecilsulfato de sódio [PA] (surfactante). Depois, adicionou-se 15 mL de etanol (Sigma Aldrich) a esta mistura para que ela ficasse em uma cor preta como mostra a Figura 12. Sendo que o surfactante (tensoativo) foi utilizado para diminuir a tensão superficial da suspensão que será formada, já que é um composto com a singularidade de alterar propriedades superficiais e interfaciais de um líquido.

Figura 12. Mistura de óxido de grafeno, dodecilsulfato de sódio e etanol.



Fonte: Próprio autor

O béquer que continha a mistura foi levado para banho de ultrassom por aproximadamente 20 minutos, decorrido este tempo, acrescentou-se 40 mg de NaBH_4 (borohidreto de sódio) saturado à mistura. O NaBH_4 foi colocado em excesso para agir como um redutor do óxido de grafeno, novamente a mistura foi colocada em banho de ultrassom, porém o tempo foi prolongado de vinte minutos para que completasse a solubilização do sal (NaBH_4), notando-se o total desaparecimento do sólido branco que estava no fundo do béquer.

A mistura foi transferida para um tubo que se utiliza na centrífuga como mostrado na Figura 13.

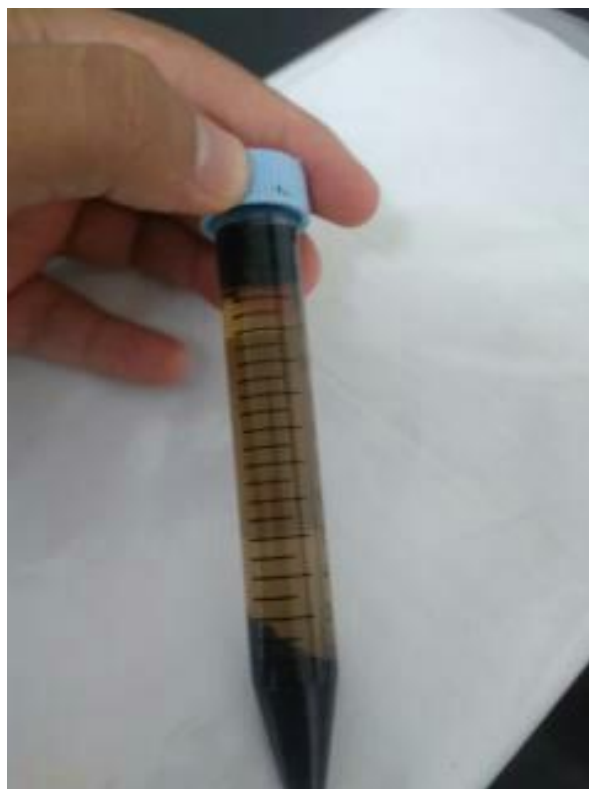
Figura 13. Óxido de grafeno reduzido em tubos de centrífuga para sua lavagem.



Fonte: Próprio autor.

Lavou-se o béquer com etanol, para que se minimizassem perdas do sólido, centrifugou-se a mistura por dez minutos a uma rotação de 3300 rpm, ao fim da centrifugação rejeitou-se o sobrenadante, que visivelmente conseguíamos observar as impurezas contidas no tubo, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Mistura depois de levada a centrifuga pela primeira vez, notando assim as impurezas contidas no tubo.



Fonte: Próprio autor

Etanol foi adicionado ao tubo que continha sólido em seu fundo, promovendo assim, agitação vigorosa em centrifuga até que se fosse obtido uma solução escura, misturando assim o etanol com o oxido de grafeno reduzido com o propósito de quando levado à centrifuga, fosse separado mais uma vez o solido do liquido, removendo assim suas impurezas, por isso misturou-se etanol para depois ser repetido o processo de centrifugação, esta lavagem foi realizada três vezes consecutivas com etanol até ser obtido um sobrenadante cristalino como mostra a Figura 15.

Figura 15. Mistura de etanol com óxido de grafeno reduzido, após passar por 3 processos de centrifugação, percebendo o sobrenadante cristalino.



Fonte: Próprio autor

Descartou-se, no final, o sobrenadante e o sólido foi colocado em uma placa de vidro, a qual foi deixada em estufa por um período próximo de 1 h e 30 min, promovendo a constante raspagem do sólido, para que ele não ficasse aderido à placa como mostra na Figura 16.

Figura 16. Mostra o sólido em placa de petri, para ser levado à estufa e seco.



Fonte: Próprio autor

Finalmente, foi recolhido o óxido de grafeno reduzido (rGO). O produto desejado, realizado por todas estas etapas, foi colocado em um eppendorf e armazenado apropriadamente para estudos posteriores como mostra a Figura 17.

Figura 17. Óxido de grafeno reduzido quimicamente, e seco pela estufa para estudos.



Fonte: Próprio autor.

3.5. Preparação dos eletrodos de carbono vítreo modificados com GO/rGO

A partir dos sólidos resultantes dos processos de síntese (GO e rGO), preparou-se suspensões desses materiais para que estes fossem caracterizados eletroquimicamente.

Assim, mediu-se 2 mg de cada material em um eppendorf diferente e adicionou-se 1000 μL (micropipeta) de água ultra purificada a cada um dos dois recipientes, sendo devidamente fechados e vedados com *parafilm*®.

Em seguida, os dois eppendorfs foram levados ao banho de ultrassom, onde permaneceram por aproximadamente trinta minutos com a finalidade de se alcançar a completa “homogeneização” das suspensões. Portanto, obteve-se as suspensões desejadas de cada material na concentração de 2 mg/mL. Após, pipetou-se 10 μL da suspensão contendo o material de interesse (GO e rGO) com o auxílio da micropipeta e foi gotejado este volume sobre os eletrodos de carbono vítreo (GC). Os eletrodos GC/GO e GC/rGO foram secos em temperatura ambiente.

3.6. Preparação do Biossensor

O eletrodo de Pt foi polido em feltro com alumina 0,5 μm e colocado em um banho ultrassônico com água destilada durante 10 minutos para a limpeza de resíduos de alumina e feltro, e seco à temperatura ambiente. Após esse procedimento, uma solução contendo 25,0 mL de NaCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e 7,0 mg de rGO foram levados ao ultrassom de ponteira durante uma hora, ou até se obter uma solução de coloração preta e que não tenha resquício do rGO visível no béquer. A solução foi colocada em um agitador de barra magnética e adicionou-se 443 μL de pirrol e 200 μL da enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) contendo 80 U/mL^{-1} . Após, a mistura foi colocada em uma célula eletroquímica convencional e levada ao potenciostato para a eletrodeposição dos materiais no eletrodo de Pt. A eletrodeposição consistiu em CV em um intervalo de potencial entre -1,2 V a +0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), utilizando 10 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Após, observou-se que o eletrodo de Pt estava recoberto com o rGO/PPy/AChE, característico pela superfície preta do eletrodo. O biossensor rGO/PPy/AChE foi seco em temperatura ambiente e a modificação pode ser comprovada devido ao fato que a ponta do eletrodo sofreu alteração na cor, passando de metal para uma cor preta, como mostra a Figura 18.

Figura 18. Eletrodo de platina modificado com rGO/PPy/AChE, modificado visualmente com sucesso devido ao fato da mudança de coloração na ponta do eletrodo.



Fonte: Próprio autor.

3.7. Preparação da solução de iodeto de acetiltiocolina e adições de carbaril

Primeiramente foi preparado uma solução tampão de fosfato (PBS), com pH de 6,0, em uma concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, sendo realizado cinco voltametrias de pulso diferencial (DPV) para a estabilização do biossensor para evitar erros durante as medidas. Em seguida, foi adicionado $400 \text{ }\mu\text{L}$ de iodeto de acetiltiocolina em uma concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e, realizada mais duas DPVs para observação do processo de oxidação referente a dimerização dos produtos de oxidação eletroquímica da tiocolina, formando ditio-bis-colina. Realizadas as medidas descrita acima, foi adicionado o pesticida carbaril, primeiramente, em uma concentração de $0,1 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, para se observar o decréscimo do estímulo já obtido através da adição do substrato iodeto de acetiltiocolina, sendo foram feitas 12 adições de carbaril e em cada adição, foram adicionados $1,0 \text{ }\mu\text{mol}$ de carbaril, até que a concentração total almejada fosse alcançada, alcançando a concentração final de carbaril na amostra de $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ na amostra.

3.8. Preparação dos vegetais e frutas para análise de pesticidas

Primeiramente, foi usado nesse projeto um vegetal e uma fruta para realizar os procedimentos, e o vegetal escolhido foi o repolho e como fruta o tomate.

Primeiro foi extraído de 3 a 4 folhas do repolho, totalizando uma massa variando de 30g a 40g, levado ao liquidificador e adicionado uma quantidade suficiente de tampão fosfato para que as folhas ficassem submersas no tampão, utilizando em média 100 mL de tampão para que as folhas ficassem submersas no mesmo. Em seguida era triturado

em liquidificador, transferido para um béquer e coado em uma peneira pequena o suficiente para que só permita a passagem do líquido, garantindo uma diminuição na matriz do alimento assim como mostra a Figura 19, possibilitando assim uma análise mais precisa que em vegetal com toda sua matriz, e levado ao potenciostato para que as análises fossem realizadas.

Em seguida, em uma célula eletroquímica foi adicionado o tampão fosfato, para ser medido o sinal sem nenhum substrato, logo após, foi adicionado 400µL de iodeto de acetiltiocolina com concentração de 0,1 µmol, para que em solução essa concentração fosse de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em seguida, outra medida foi realizada para se obter o sinal do substrato e em seguida, foi adicionado o suco do repolho para se analisar se houve uma perda de sinal, significando a presença de pesticida no meio reacional.

Figura 19. Solução de repolho já coado para ser feita sua análise.



Fonte: Próprio autor

O mesmo procedimento foi executado para com o tomate, entretanto foi cortado o tomate com polpa e sua parte externa, com uma média de massa semelhante ao repolho (de 30 g a 40g), levado ao liquidificador e adicionado 100 mL de tampão fosfato para garantir que o tomate ficasse submerso no tampão. Também triturado em liquidificador e

vertido em um béquer e coado para que diminuísse a matriz que poderia causar alguma interferência nas medias, sendo levado em seguida ao potenciostato para que as análises fossem realizadas, como mostrado na Figura 20.

O mesmo procedimento utilizado para análise do repolho, foi utilizado para a análise do tomate.

Figura 20. Solução de tomate já coado para análise.



Fonte: Próprio autor.

Como mostrado na Figura 21, o procedimento de detecção foi feito '*in situ*' no repolho, foi feita uma cavidade no caule, suficiente para que se chegasse nas folhas internas do repolho, após feita a cavidade foi adicionado o tampão fosfato suficiente para que se enchesse até o topo da cavidade feita, deixando entre 5 a 10 minutos, para que o tampão pudesse absorver qualquer traço do pesticida, em seguida o eletrodo foi imerso no tampão que estava no repolho, esperando 10 minutos para que o eletrodo reagisse com o tampão, para identificar a presença ou não do pesticida.

Sendo o eletrodo imerso na solução tampão dentro do próprio repolho, transformando-o em uma célula eletroquímica, sendo os dois levados ao potenciostato para análise do mesmo.

Figura 21. Procedimento de análise do repolho '*in situ*'.



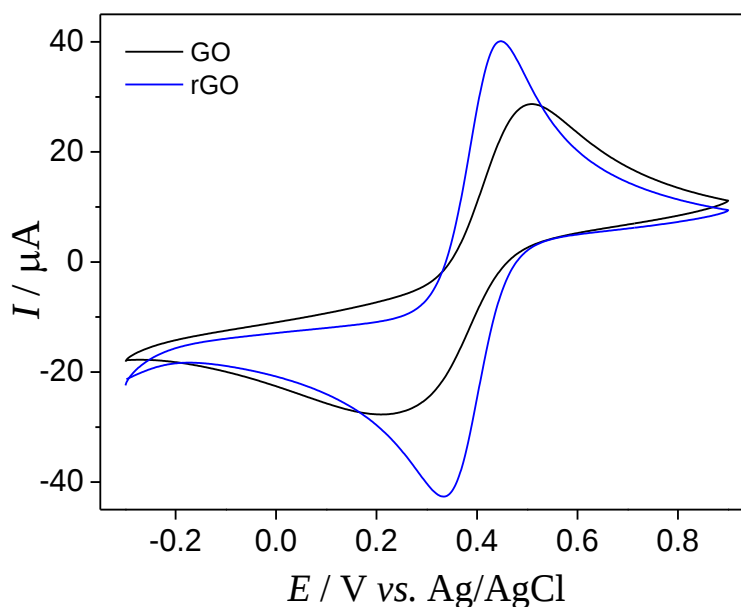
Fonte: Próprio autor

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização eletroquímica dos materiais sintetizados: GO e rGO

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados em solução de hexacianoferrato (III) de potássio – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ – $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} no intervalo de $-0,2 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) para a caracterização eletroquímica do GO e rGO. A Figura 22 apresenta os perfis voltamétricos para os dois diferentes eletrodos: eletrodo de carbono vítreo modificado com GO e eletrodo de carbono vítreo modificado com rGO.

Figura 22. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos GC/GO e GC/rGO em solução de H_2SO_4 contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Fonte: Próprio autor.

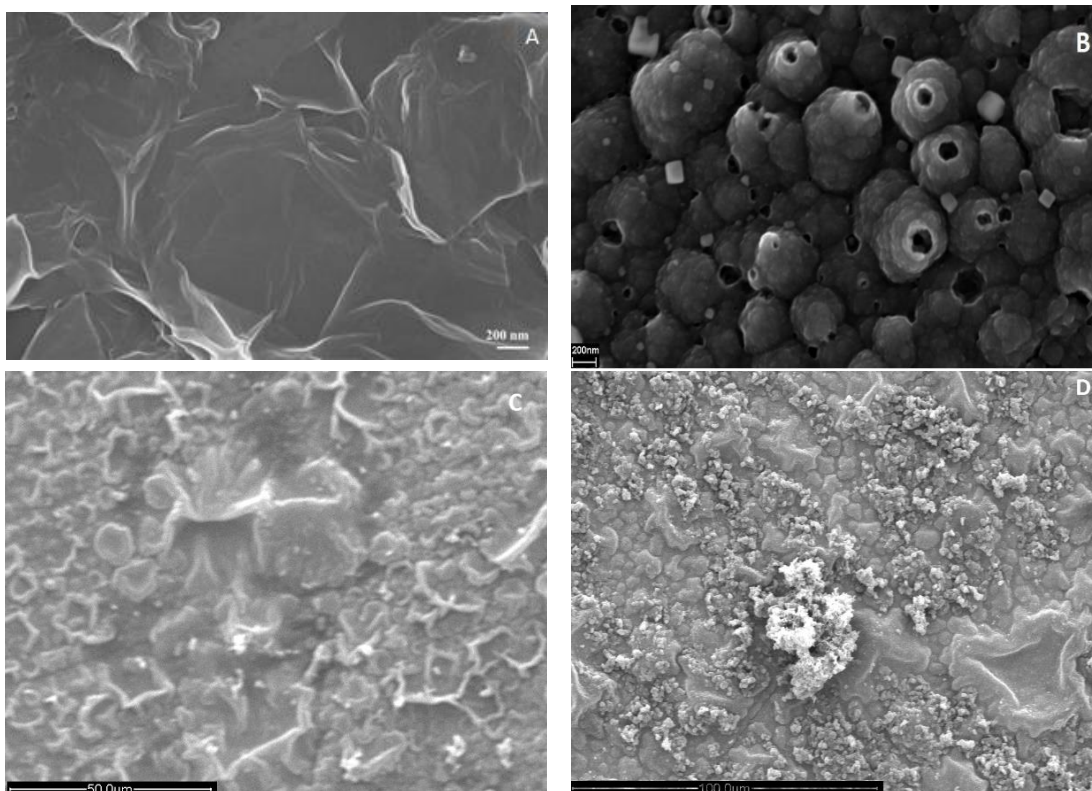
Os perfis voltamétricos apresentaram picos de oxidação e redução bem definidos para os dois eletrodos estudados devido ao par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em potenciais de aproximadamente $+0,44 \text{ V}$ e $+0,33 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), para o eletrodo GC/rGO e em $+0,51 \text{ V}$ e $+0,20 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) para o eletrodo GC/GO. Porém, o eletrodo GC/rGO apresentou uma melhora na reversibilidade dos processos. Pela observação do voltamograma, o eletrodo GC/rGO também apresentou um aumento de 1,4 vezes na corrente de pico quando comparado com o eletrodo GC/GO, aumento

esse devido à presença de defeitos introduzidos no óxido de grafeno reduzido. Assim, tem-se um indício que as sínteses dos materiais foram realizadas com sucesso.

4.2. Caracterização morfológica dos materiais

A morfologia dos materiais rGO, PPy, do compósito rGO/PPy e do biossensor rGO/PPy/AChE foram obtidas utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como apresentado na Figura 23. A Figura 23A apresenta a imagem do rGO, a qual é possível observar que o material de grafite exibi uma estrutura típica torcida, enrugada e com muitas ondulações, aumentando assim a área superficial do eletrodo quando aplicado aos biossensores (a redução do óxido de grafeno faz com que as folhas se desempilhem e, conseqüentemente, há o desbloqueio dos sítios ativos). Já a Figura 23B mostra uma imagem da eletropolimerização do polipirrol sobre o eletrodo de Pt, formando glóbulos, em que cada glóbulo tem um tamanho médio de 400 nm. Além disso, nesta microscopia foi observada estruturas cúbicas em torno de 100 nm. Estes cristais são de NaCl utilizado na eletropolimerização. A Figura 23C apresenta o rGO eletrodepositado com o polímero PPy, mostrando que o filme se fixa em toda a extensão do material de forma eficiente e que o compósito rGO/PPy forma cavidades, em que as biomoléculas, como enzimas, podem ser adequadamente imobilizadas. Esses compósitos apresentam muitos grupos nitrogênio provenientes do PPy, os quais são responsáveis pela biocompatibilidade entre o compósito e as biomoléculas. Sendo assim, nenhum agente aglutinante (gluteraldeído ou di-imida) é necessário para a imobilização da enzima AChE. Isso constitui uma real contribuição do compósito rGO/PPy para a eficiência do biossensor, uma vez que os agentes aglutinantes frequentemente se ligam aos sítios ativos das enzimas, inibindo, assim, a sua atividade. Finalmente, a Figura 23D apresenta a imagem do biossensor rGO/PPy/AChE, a qual é possível observar que a enzima é imobilizada de forma eficiente nas cavidades formadas pelos defeitos do rGO e PPy.

Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura para: A) rGO, B) PPy, C) compósito rGO/PPy e D) biossensor rGO/PPy/AChE.



Fonte: Próprio autor.

4.3. Caracterização eletroquímica do biossensor

O biossensor Pt/rGO/PPy/AChE foi avaliado utilizando a técnica de DPV com os seguintes parâmetros: amplitude de pulso de 70 mV, incremento de potencial 2 mV e uma solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo 20 μmol L⁻¹ do iodeto de acetiltiocolina (AChI), o substrato da enzima. Os resultados são apresentados na Figura 24. Nenhum processo eletroquímico foi observado na ausência do substrato (curva pontilhada). Entretanto, na presença do AChI (linha sólida) um pico de oxidação bem definido em aproximadamente +0,1 V é observado. Esse processo eletroquímico é associado a oxidação da tiocolina gerando o seu respectivo dímero, ditio-bis-colina, como mostrado nas seguintes reações:

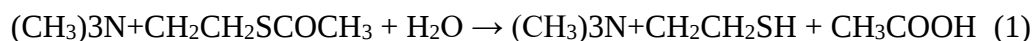
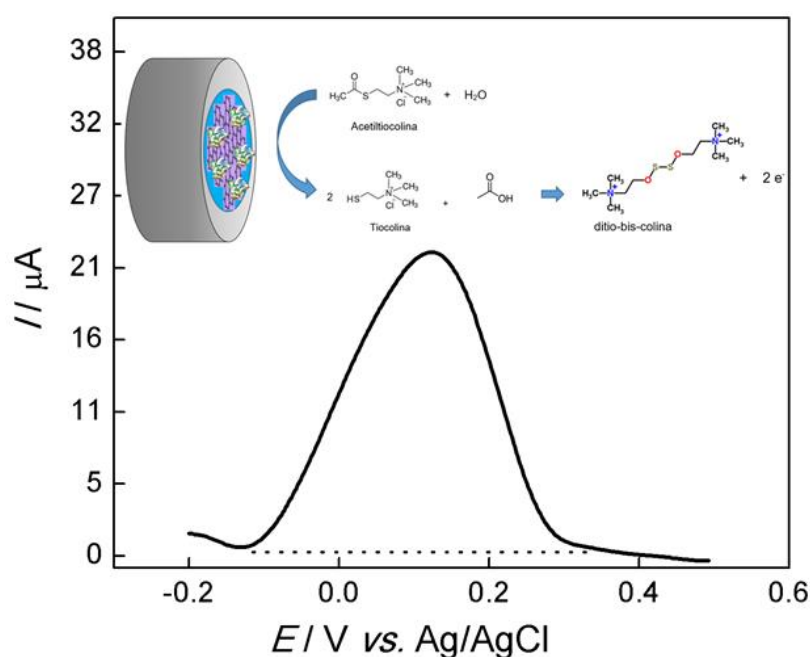


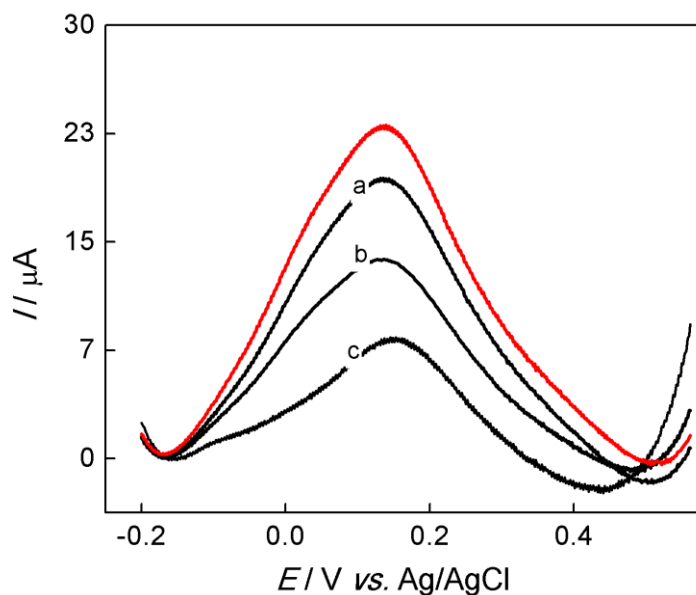
Figura 24. Voltamogramas de pulso diferencial para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 na ausência do AChI (linha pontilhada) e na presença de 20 μmol L⁻¹ do AChI (linha sólida).



Fonte: Próprio autor

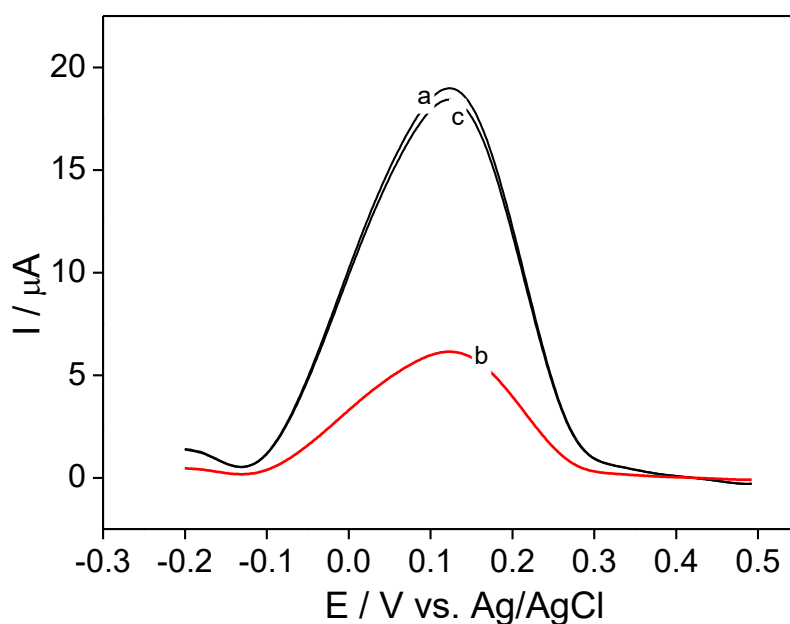
O biossensor desenvolvido também foi avaliado na análise do pesticida carbaril, o qual inibe a ação da enzima AChE, utilizando os mesmos parâmetros descritos acima. É possível observar na Figura 25 que, após a adição de quantidades crescentes de carbaril e um tempo de incubação de 10 min, os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram correntes de pico menores, embora com o mesmo potencial que o obtido para a oxidação da tiocolina. Isso é associado à adsorção reversível competitiva do carbaril nos sítios ativo da enzima, inibindo sua atividade. Portanto, esse fenômeno pode ser usado para quantificar o pesticida carbaril em amostras de alimentos. Devido ao carácter reversível da inibição dos carbamatos, a atividade do biossensor pode ser restaurada, após o uso, por uma simples imersão do biossensor em solução PBS durante 10 min, como apresentado na Figura 26. Na Figura 26, curva a, o processo de oxidação da tiocolina utilizando o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE é exibido. Já na curva b observa-se a inibição desse processo após a adição de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril. Após, o biossensor foi retirado da solução e deixado em uma solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 por 10 min. Novamente, os estudos eletroquímicos por DPV foram realizados em solução PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ do AChI e observa-se, na curva c, que a atividade enzimática recupera seu valor inicial reproduzindo a mesma oxidação da tiocolina obtida antes da inibição.

Figura 25. Voltamogramas de pulso diferencial para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo 20 μmol L⁻¹ do AChI e após adições de (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 3,0 μmol L⁻¹ de carbaril.



Fonte: Próprio autor

Figura 26. DPV para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0: (a) após a adição de 20 μmol L⁻¹ do AChI; (b) após a adição de 3,0 μmol L⁻¹ de carbaril; (c) após deixado em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 por 10 min e realizado o estudo, novamente, com 20 μmol L⁻¹ do AChI.



Fonte: Próprio autor

Segundo Marques e Yamanaka⁴, a ligação carbaril-enzima é considerada reversível devido ao fato que o complexo formado por enzima-inibidor pode ser desfeito desde que haja condições específicas de equilíbrio entre a enzima e o inibidor.

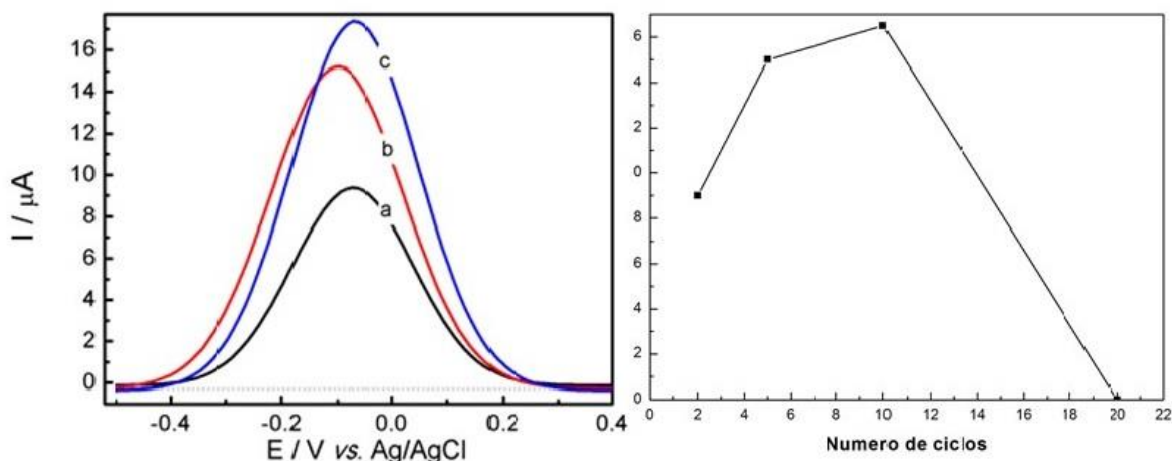
4.4. Parâmetros para a otimização do processo de oxidação da tiocolina em resposta ao biossensor Pt/rGO/PPy/AChE

Para maximizar o sinal analítico da oxidação da tiocolina por DPV, os efeitos dos parâmetros experimentais (pH, quantidades dos materiais para a preparação do biossensor, número de ciclos para a eletrodeposição dos materiais, amplitude de pulso, incremento de potencial) foram estudados utilizando o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ contendo 20,0 μmol L⁻¹ de AchI.

Primeiramente, o número de ciclos por CV foi avaliado no intervalo de potencial entre -1,2 V a +0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹) para a eletrodeposição de 443 μL de pirrol²³, 7 mg de rGO e 200 μL da AChE contendo 100 U mL⁻¹. Os resultados são apresentados na Figura 27, em que na curva a, b e c tem-se o estudo utilizando 2, 5 e 10 ciclos, respectivamente, para a eletrodeposição dos materiais. É possível observar que a maior corrente de pico anódica para a ditio-bis-colina ocorre quando 10 ciclos foram utilizados para a eletrodeposição dos materiais, mostrando que há uma maior e mais eficiente imobilização do biomaterial com esse valor. Esse mesmo estudo também foi

realizado utilizando 20 ciclos para eletrodeposição dos materiais, porém neste valor houve a passivação do biossensor e não foi possível observar nenhum processo referente a oxidação da tiocolina. Portanto, um número de 10 ciclos na CV foi utilizado nos próximos estudos para a preparação do biossensor.

Figura 27. DPV para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo 20 μmol L⁻¹ do AChI para (a) 2, (b) 5, (c) 10 ciclos na CV no intervalo de potencial de -1,2 V a +0,8 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹) e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

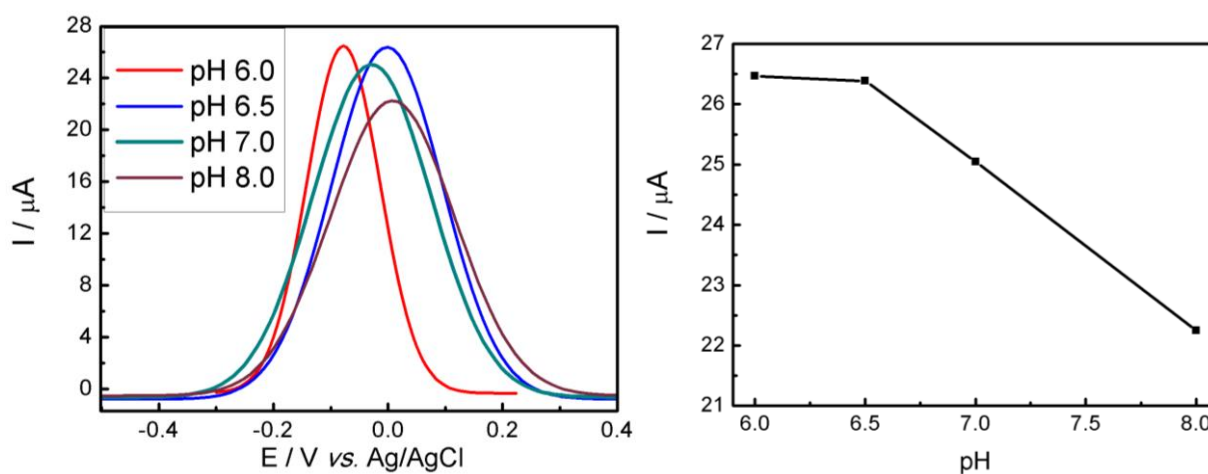


Fonte: Próprio autor

O próximo estudo realizado foi a quantidade de rGO utilizada na preparação do biossensor, a qual foi variada entre 2,0 a 9,0 mg. Foi possível observar um aumento da corrente de pico anódica da ditio-bis-colina no intervalo de 2,0 a 7,0 mg de rGO, atingindo um valor máximo quando 7,0 mg de rGO foi utilizado na preparação do biossensor Pt/rGO/PPy/AChE. Para quantidades de rGO maior que 7,0 mg, a corrente de pico da oxidação da tiocolina decresceu significativamente. Assim, um valor ótimo de 7,0 mg de rGO foi otimizado. Após, foi variada as unidades da enzima AChE no intervalo de 10 a 100 U mL⁻¹. Observou-se que a corrente de pico anódico da ditio-bis-colina foi crescente no intervalo de 10 a 80 U mL⁻¹, sendo que de 80 a 100 U mL⁻¹, não foram notadas variações significantes no sinal analítico da ditio-bis-colina. Portanto, um valor de 80 U mL⁻¹ da enzima AChE foi utilizada nos próximos estudo.

Outro estudo realizado foi a variação do pH da solução PBS 0,2 mol L⁻¹, no intervalo de 6,0 a 8,0, como apresentado na Figura 28. O gráfico de I_{pa} em relação ao pH mostra que a corrente de pico anódica da ditio-bis-colina não sofreu grandes alterações no intervalo de pH de 6,0 a 7,0, com o maior valor e melhor resolução da corrente de pico em pH 6,0. Já em pH 8,0, houve um pequeno decréscimo de I_{pa} . Assim, uma solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 foi utilizada nos estudos posteriores.

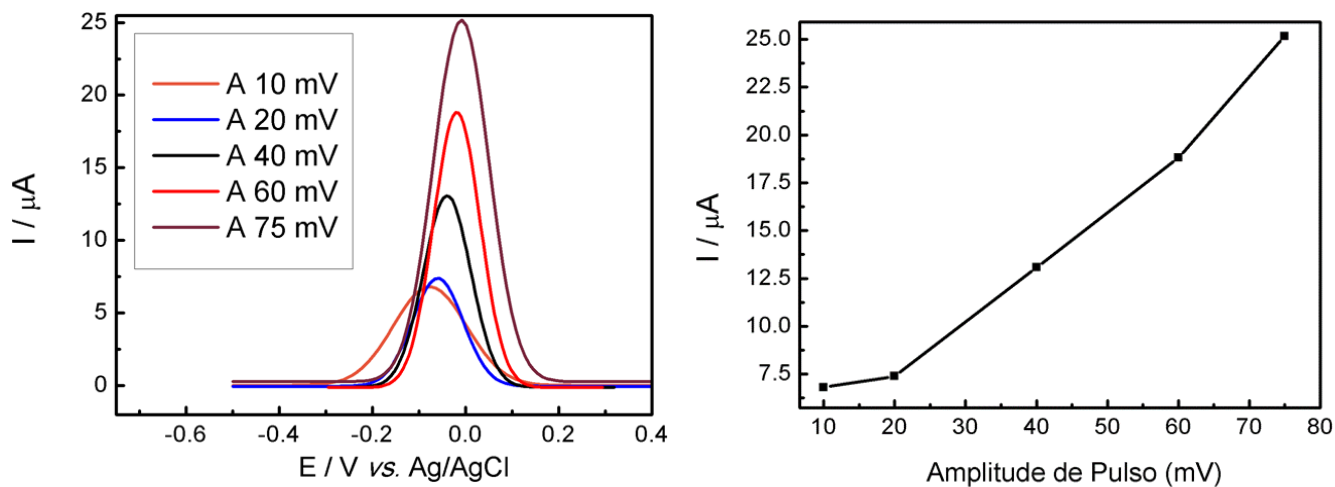
Figura 28. DPV e variação do pH vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ contendo 20 μ mol L⁻¹ do AChI para os diferentes valores de pH.



Fonte: Próprio autor

A influência dos parâmetros da DPV também foi avaliada. Assim, a amplitude de pulso foi variada entre 15 e 75 mV, como apresentado na Figura 29. Os voltamogramas de pulso diferencial também são apresentados na Figura 29, para mostrar que não foi observado nenhum aumento significativo nas larguras dos picos para a oxidação da tiocolina, mesmo em amplitudes maiores que 50 mV. Uma vez que as correntes de pico foram proporcionais ao aumento da amplitude de pulso para a ditio-bis-colina, a amplitude de pulso de 75 mV foi escolhida como a amplitude otimizada por DPV.

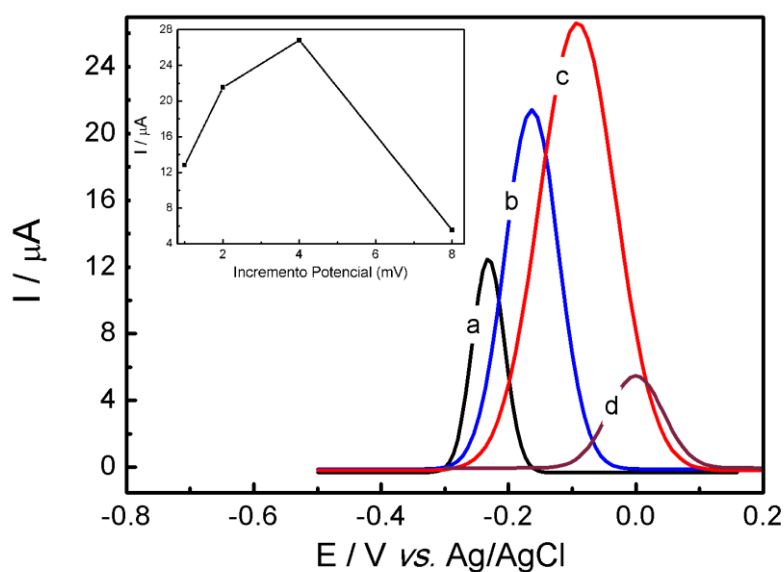
Figura 29. DPV e variação da amplitude de pulso vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 contendo 20 μ mol L⁻¹ do AChI.



Fonte: Próprio autor

O último parâmetro avaliado foi o incremento de potencial, variado no intervalo de 1 a 10 mV. Para incrementos de potenciais acima de 8 mV, a deformação dos perfis voltamétricos foram observados. No intervalo de potencial de 1 a 8 mV, observa-se que a maior I_{pa} foi obtida para incremento de potencial de 4 mV, como apresentado na Figura 30. Assim, foi escolhido um incremento de potencial de 4 mV.

Figura 30. DPV e variação do incremento de potencial vs. I_{pa} para biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 contendo 20 μ mol L⁻¹ do AChI sendo que (a) 0,1 mV de incremento de potencial, (b) 0,2 mV, (c) 0,4 mV e (d) 0,8 mV.



Fonte: Próprio autor

Tabela 1 - Parâmetros otimizados por DPV para o sinal analítico da ditio-bis-colina usando o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE.

Parâmetros	Valor otimizado
Número de ciclos em CV	10 ciclos
Quantidade de rGO	7,0 mg
Unidades da AChE	80 U mL ⁻¹
Eletrólito suporte e pH	PBS 0,2 mol L ⁻¹ e pH 6,0
Amplitude de pulso	75 mV
Incremento de potencial	4 mV

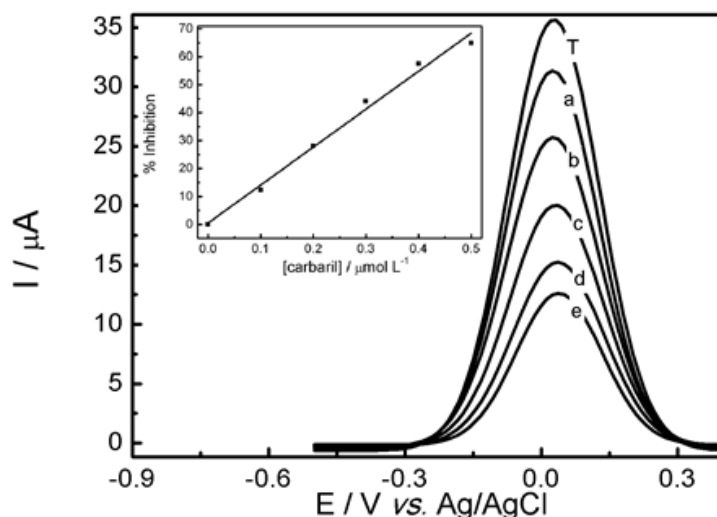
4.5. Resposta analítica do carbaril utilizando o biossensor proposto

Utilizando as condições otimizadas por DPV, descritas na Tabela 1, o biossensor proposto foi aplicado para avaliar a resposta eletroquímica em função da concentração de carbaril. Todas as medidas foram feitas em triplicada. A resposta analítica apresentada na Figura 31 mostra um intervalo linear entre 0,1 a 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de acordo com a seguinte equação:

$$\% I = 0,52 + 1,35 [\text{carbaril}]; r = 0,9897; n=5 \quad (3)$$

O limite de detecção (LOD) para o carbaril foi de 11,6 nmol L^{-1} (2,3 $\mu\text{g/kg}$) determinado utilizando 3 coeficiente angular / σ ; onde σ é o desvio padrão do valor médio de 10 voltamogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC²⁴.

Figura 31. Voltamogramas DPV para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0. As concentrações de carbaril em $\mu\text{mol L}^{-1}$ são: T) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AChI; a) 0,1; b) 0,2; c) 0,3; d) 0,4; e) 0,5. No detalhe: Dependência linear da porcentagem de inibição da corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em relação a concentração de carbaril adicionada.



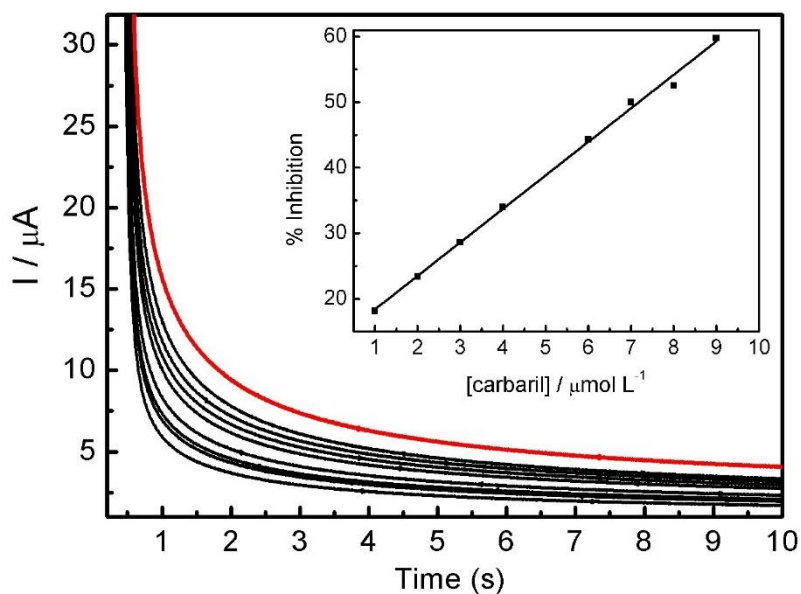
Fonte: Próprio autor

A curva analítica para o carbaril, também foi realizada pela técnica de cronoamperometria do tipo potential-step, na qual são aplicados dois potenciais. O primeiro potencial (E_1) é aplicado em uma região onde não ocorre reação com as espécies eletroativas e tem como função carregar a dupla camada elétrica na superfície do eletrodo de trabalho. Já o segundo potencial (E_2) é o potencial no qual ocorre a dimerização dos produtos de oxidação eletroquímica da tiolcolina.

Para monitorar a inibição da acetilcolinesterase, causada por adições de carbaril, partiu-se do potencial 0,0 V durante 5 s, seguido pela aplicação de um salto de potencial de oxidação a um potencial final ($E_2 = 0,15$ V) durante 60 s e registrou-se a variação da corrente com o tempo. A corrente de pico no biossensor Pt/rGO/PPy/AChE foi proporcionalmente linear com a concentração de carbaril na região de 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (72,4 $\mu\text{g/kg}$), determinado utilizando a razão $3\sigma/\text{coeficiente angular}$; onde σ é o desvio padrão dos valores da corrente de difusão de 10 cronoamperogramas do branco, conforme recomendado pela IUPAC [24]. A equação de regressão linear (veja detalhes na Figura 32) é:

$$\% I = 13,25 + 5,11 [\text{carbaril}]; r = 0,9969; n=8 \quad (4)$$

Figura 32. Experimentos de cronoamperometria para o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE contendo somente o substrato (linha vermelha) e após adições de carbaril (linhas pretas). No detalhe: dependência linear da corrente de pico com as concentrações de carbaril.



Fonte: Próprio autor

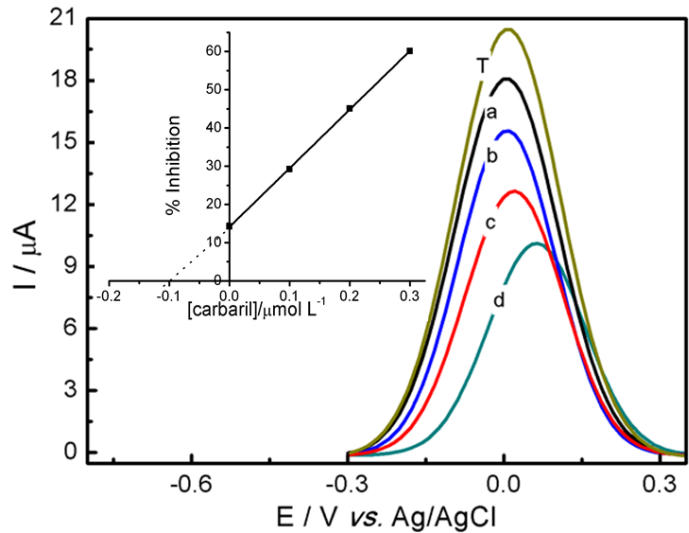
Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a aplicação de carbaril é autorizado em algumas culturas como abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, maçã, tomate, dentre outras. O limite máximo de resíduo de carbaril permitido pelas legislações brasileiras varia entre 0,02 a 100 mg/kg, sendo o LOD determinado por DPV baixo o suficiente para determinação de carbaril em relação ao limite máximo de resíduo permitido pelas legislações brasileiras.

4.6. Análise de carbaril em amostras de repolho e tomate

O eletrodo desenvolvido foi utilizado para a quantificação de carbaril em amostras de tomate e repolho, preparada como descrito no item 2.6 da parte experimental e os resultados são apresentados na Tabela 2. Determinações de carbaril foram realizadas em triplicada, usando o método de adição de padrão como apresentado na Figura 33. Os resultados obtidos (média $\pm$ SD) para três determinações foram: $0,094 \pm 0,002 \mu mol L^{-1}$ para determinação de carbaril em amostras de repolho e $0,093 \pm 0,001 \mu mol L^{-1}$ para determinação de carbaril em amostras de tomate. Recuperações entre 94,1% e 101,2% de carbaril em amostras de repolho ($n = 3$) foram obtidas para 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu mol L^{-1}$ de carbaril adicionado em cada amostra. Em amostras de tomate, recuperações entre 95,8 e 100,9% de carbaril ($n = 3$) foram obtidas para 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu mol L^{-1}$ de carbaril adicionado em cada amostra.

Não houve diferenças significativas entre as concentrações adicionadas e encontradas de carbaril, o que indica que o biossensor Pt/rGO/PPy/AChE pode ser usado com sucesso na determinação de carbaril em amostras de frutas e vegetais, sob as condições otimizadas e utilizando o método de adição de padrão.

Figura 33. Curvas DPV obtidas pelo biossensor Pt/rGO/PPy/AChE para a determinação de carbaril em amostra de repolho: (T) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AChI; (a) amostra, (b) amostra mais 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril; (C) amostra mais 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril; (d) amostra mais 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ carbaril. No detalhe: dependência linear da porcentagem de inibição da corrente de pico em relação a concentrações de carbaril.



Fonte: Próprio autor

Tabela 2. Resultados para determinação de carbaril em amostras de repolho e tomate.

Repetição	Carbaril/ $\mu\text{mol L}^{-1}$		Erro relativo/%	
	Repolho	Tomate	E ₁	E ₂
1	0,092	0,094	-8,0	-6,0
2	0,096	0,092	-4,0	-8,0
3	0,094	0,093	-6,0	-7,0
Média $\pm$ SD	0,094 $\pm$ 0,002	0,093 $\pm$ 0,001		

Sendo que o erro relativo foi dado pela equação 3, onde V_e é o valor encontrado pela análises, V_v é o valor verdadeiro sendo esse valor o valor adicionado de carbaril que foi $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

$$Er = V_e - V_v / V_v \times 100 \% \quad (5)$$

5. CONCLUSÃO

O eletrodo de Pt modificado com o compósito rGO/PPy foi caracterizado e aplicado com sucesso na imobilização da enzima acetilcolinesterase e na determinação do pesticida carbaril em amostras de repolho e tomate, demonstrando ser uma metodologia conveniente para o controle de pesticidas em alimentos.

O limite de detecção obtido utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial é baixo o suficiente para determinação de carbaril nas culturas de alimento que este pesticida é aplicado considerando o limite máximo de resíduo permitido pelas legislações brasileiras.

De maneira geral pretendeu-se ampliar os conhecimentos e estratégias para a aplicação da nanotecnologia na imobilização de enzimas e fornecer subsídios para futuros estudos utilizando outras enzimas e suas aplicações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ministério do Meio Ambiente, <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>, acessado julho 2016.
- [2] Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[14094-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[14094-1-0].PDF), acessado julho 2016.
- [3] FATIBELLO-FILHO O.; CAPELATO. M. D. Biossensores. *Química nova*, 1992, v.15, p.28-39.
- [4] MARQUES P.; YAMANAKA H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química nova*, 2008, v.31, p.1791-1799.
- [5] PUMERA M. Electrochemistry of graphene: New horizons for sensing and energy storage. *The Chemical Record*, 2009, v.9, p.211-223.
- [6] HUMMERS W.S.; OFFERMAN. R.E.; AM. J. Preparation of graphene oxide. *Chem. Soc.* 1958, v.80, p.1339.
- [7] PARK S., RUOFF R.S., Chemical methods for the production of graphenes. *Nat. Nanotech*, v 4, p. 217, 2009.
- [8] SCHNIEPP H.C.; LI J.L.; MCALLISTER M.J.; SAI H.; HERRERA-ALONSO M.; ADAMSON D.H.; PRUDHOMME R.K.; CAR R.; SAVILLE D.A.; AKSAY I.A.; Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *J. Phys. Chem. B*, v.110, p.8535-8539, 2006.
- [9] STANKOVICH S.; DIKIN D.A.; PINER R.D.; KOHLHAAS K.A.; KLEINHAMMES A.; JIA Y.; WU Y.; NGUYEN S.T.; RUOFF R.S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, v. 45, p. 1558, 2007.
- [10] MCALLISTER M.J.; LI J-L.; ADAMSON D.H.; SCHIEPP H.C.; ABDALA A.A.; LIU J. et al. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite. *Chem Mater*, v.19(18), p.4396–404, 2007.
- [11] LOPEZ V.; SUNDARAM R.S.; GOMEZ-NAVARRO C.; OLEA D., BURGHARD M.; GOMEZ-HERRERO J. et al. Chemical vapor deposition repair of graphene oxide: a route to highly-conductive graphene monolayers. *Adv Mater*, v.21 n.46, p.4683–6, 2009.
- [12] SU Q.; PANG S.; ALIJANI V.; LI C.; FENG X.; MULLEN K. Composites of graphene with large aromatic molecules. *Adv Mater*, v.21, n.31, p.3191–5, 2009.
- [13] SONGFENG P.; HUI-MING C. The reduction of graphene oxide. *Carbon*, v.50, p.3210–3228, 2012.
- [14] GAO W.; ALEMANY L.B.; CI L.; AJAYAN P.M. New insights into the structure and reduction of graphite oxide. *Nat Chem*, v.1, n.5, 403–8, 2009.

- [15] CHENG F.A.; ZHANG M.L.; WANG H. Fabrication of Polypyrrole Nanowire and Nanotube Arrays. *Sensors*, v.5, p.245-249, 2005.
- [16] ATEH D.D.; NAVSARIA H.A.; VADGAM P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *J. R. Soc. Interface*, v.3, p.741–752, 2006.
- [17] DVIR H.; SILMAN I.; HAREL M.; ROSENBERRY T.L.; SUSSMAN J.L. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*, v.187 n.1-3, p.10–22, 2010
- [18] CESARINO I.; MORAES F.C.; LANZA M.R.V.; MACHADO S.A.S. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. *Food Chemistry*, v.135, p.873–879, 2012.
- [19] WANG K.; LIU Q.; DAI L.; YAN J.; JU C.; QIU B.; WU X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor base on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite. *Analytica Chimica Acta*, v.695, p.84–88, 2011.
- [20] MARCH C.; MANCLÚS J.J.; JIMÉNEZ Y.; ARNAU A.; MONTROYA A. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, v.78, p.827–833, 2009.
- [21] WANG M.Y.; HUANG J.R.; WANG M.; ZHANG D.E.; CHEN J. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v.151, p.191–197, 2014.
- [22] SCHOMBURG D.; SALZMANN M. *The Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991, Vol. 3, EC 3.1.1.7, p. 2.
- [23] CESARINO I.; GALESCO H.V.; MORAES F.C.; LANZA M.R.V.; MACHADO S.A.S. Biosensor based on electrocodeposition of carbon nanotubes/polypyrrole/laccase for neurotransmitter detection. *Electroanalysis*, v. 25, p.394 – 400, 2013.
- [24] Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst*, v.112 p.199, 1987.
- [25] PRETRONILHO E.C.; PINTO A.C.; VILLAR J.D.F.; Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química, *RMCT*, v.067 p.E5A, 2011.