**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA

**Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol
oxidase para a detecção de pesticidas**

**São Carlos
2016**

IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA

Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas

Versão Corrigida

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Francisco Eduardo Gontijo
Guimarães

**São Carlos
2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

ARRUDA, Izabela Gutierrez de.

A773b Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas / Izabela Gutierrez de Arruda; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães. São Carlos, 2016.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Biossensor. 2. Polissacarídeo extracelular algal. 3. ZnO. 4. Polifenol oxidase. 5. Pesticida. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA**

Título da tese: "Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas"

Data da defesa: 27/07/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães
(Orientador)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovada

Prof. Dra. **Cristina Souza Freire Nordi**
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Aprovada

Prof. Dr. **Antonio Riul Junior**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

APROVADA

Dra. **Edna Regina Spada**
(Pós-doutoranda/CNPq)

Aprovada

Profa. Dra. **Maria Del Pilar Taboada Sotomayor**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

*Ao meu esposo Sidney Gomes de Arruda, por
todo amor, cuidado, respeito, carinho e
incansável apoio ao longo período de elaboração
desse trabalho e a minha princesinha Anny
Beatriz por me encher de alegria todos os dias
demonstrando um amor incondicional. Amo
você!*

AGRADECIMENTOS

Ao Bom, Eterno e Verdadeiro Deus que me guiou até aqui e em tudo tem me abençoado. Ele me ensinou nesse tempo a sonhar, a conquistar e a realizar os sonhos que Ele tem para mim. A Deus toda honra, glória e louvor.

Ao meu orientador prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães, pelos ensinamentos, correções e incentivos, contribuição imprescindível com que desempenhou o seu papel de orientador, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À prof. Dr^a. Cristina Nordi pela disponibilidade, discussões, incentivos e doação do PSE.

Ao prof. Dr. Romildo Jeronimo Ramos (IF/UFMT) pela amizade, confiança, discussões, incentivos e apoio na aquisição de materiais e equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos amigos do IFSC que contribuíram para a minha aprendizagem.

À minha amiga Dr^a. Edna pelas horas dedicadas, auxílio constante e também pelo carinho, que Deus levante sempre pessoas para te ajudar em sua caminhada. Você foi um anjo em minha vida.

À Juliana Coatrini e ao Andrey pela amizade e apoio que muito contribuiu para o meu crescimento.

À Escola de Engenharia de São Carlos e seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de aprender e realizar o curso de doutorado em um ambiente de alto nível acadêmico.

À Secretaria de Estado de Educação do Estado de Mato Grosso (SEDUC) pela concessão de licença para qualificação profissional em nível de doutorado.

À agência Capes pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro.

Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pelo apoio e colaboração.

À Igreja Presbiteriana Renovada de São Carlos por todo apoio e carinho. Em especial, minha gratidão ao pastor Nelson, irmã Solange e sua família pela atenção, hospitalidade e amor. Que Deus os abençoe e os recompense por toda boa obra.

Ao meu esposo Sidney que me deu apoio absoluto, me incentivando nas horas difíceis de desânimo e cansaço, acreditando em mim mesmo quando nem eu acreditava. Eu te amo!

À minha família e em especial a minha irmã Debora que esteve sempre ao meu lado e independente das circunstâncias serão as pessoas que Deus me deu para conviver, amar, respeitar e admirar. Também aproveito para orar para que Deus os abençoe com toda a sorte de bênçãos contidas em Sua Palavra.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na realização deste trabalho e na participação desta etapa da minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

Aquele que me serve, meu Pai o honrará.
João 12:26b

RESUMO

ARRUDA, I. G. **Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas.** 89 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A utilização descontrolada de pesticidas tem provocado no decorrer dos anos a intoxicação de milhares de pessoas no mundo, uma vez que, seus resíduos têm sido depositados em alimentos, em solos e em ambientes aquáticos. Assim, a construção de duas novas plataformas sensoras para a detecção de pesticidas é o objetivo desse trabalho. Na primeira plataforma foi utilizado o polieletrólito catiônico polietilenoimina (PEI) em conjunto com o polissacarídeo extracelular algal (PSE) produzido pela microalga *criptofíceia* *Cryptomonas tetrapirenoidosa* preparados através da técnica de deposição "spin-coating". E a segunda plataforma foi produzida por eletrodeposição pulsada, entre um potencial de redução e um de oxidação, utilizando nanoestruturas de óxido de zinco (ZnO). Para caracterizar as plataformas, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG-SEM), difração de raios X (XRD), espectroscopia de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis), microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de reflexão-absorção no Infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). Através da imobilização da enzima polifenol oxidase na forma de extrato bruto em sua fonte natural (fruto abacate), as plataformas de PEI/PSE e ZnO, foram avaliadas como biossensores de catecol e do inseticida carbaril. De modo comparativo, as plataformas de PEI/PSE sem a presença imobilizada da enzima também foram estudadas para a detecção do catecol e do carbaril. A simplicidade na formação e na construção dessas plataformas vem qualificá-las como viáveis a serem produzidas em escala industrial e com baixo custo de processamento. E diante dos resultados obtidos no desenvolvimento desses biossensores destaca-se a eficiência e a rapidez de detecção, o que os tornam economicamente promissores e competitivos em termos de aplicações ambientais.

Palavras-chave: Biossensor. Polissacarídeo extracelular algal. ZnO. Polifenol oxidase. Pesticida.

ABSTRACT

ARRUDA, I. G. **Amperometric biosensors fabricated from enzymatic electrodes oxidase polyphenol for the detection of pesticides.** 89 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The uncontrolled use of pesticides has resulted over the years the intoxication of thousands of people in the world, since their waste has been deposited in food, in soil and aquatic environments. Thus, the construction of two new sensors platforms for pesticide detection is the objective of this work. At first platform was used cationic polyelectrolyte polyethyleneimine (PEI) along with the extracellular algal polysaccharide (EPS) produced by *microalgae criptofíceas* *Cryptomonas tetrapirenoidosa* prepared by deposition technique "spin-coating". The second platform was produced by pulsed electrodeposition between a reduction and an oxidation potential using nanostructures zinc oxide (ZnO). To characterize the platforms, we used the techniques of field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM), X-ray diffraction (XRD), ultraviolet visible absorption spectroscopy (UV-Vis), atomic force microscopy (AFM), and polarization modulation infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS). By immobilization of the polyphenol oxidase enzyme as a crude extract in their natural source (avocado fruit), platforms PEI/PSE and ZnO, they were evaluated as catechol and carbaryl insecticide biosensors. In a comparative way, the platforms PEI/PSE without the presence of immobilized enzyme were also studied for detection of catechol and carbaryl. The simplicity in the formation and construction of these platforms comes qualify them as viable to be produced on an industrial scale and low cost processing. And on the results obtained in the development of such biosensors stand out the efficiency and speed of detection, which make them economically promising and competitive in terms of environmental applications.

Keywords: Biosensor. Extracellular algal polysaccharide. ZnO. Polyphenol oxidase. Pesticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um biossensor.....	30
Figura 2 – Modelo esquemático do sítio ativo da PFO	33
Figura 3 – Estrutura química geral dos pesticidas carbamatos.....	34
Figura 4 – Fórmula estrutural do carbaril	35
Figura 5 – Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com o eletrodo de referência, contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho (a); ampliação do eletrodo de trabalho (b).....	38
Figura 6 – Microscópio confocal de varredura (LSM 780, ZEISS®) utilizado neste trabalho.	40
Figura 7 – Esboço esquemático das etapas da formação dos filmes poliméricos ultrafinos utilizando a técnica de deposição spin-coating.	42
Figura 8 – Espectro de absorvância das soluções de PSE e de PEI (a); Espectro de absorvância da solução de catecol, da solução da enzima tirosinase extraída do abacate e da solução da enzima tirosinase purificada (b).	46
Figura 9 – Espectro de absorvância da solução com a enzima tirosinase purificada, a reação da enzima purificada com 20µL de catecol e a reação da solução da enzima extraída com 20µL de catecol (a); Reação da enzima tirosinase purificada com 20µL de catecol em um intervalo de 20 min (b).	47
Figura 10 – Espectro de absorvância de dez bicamadas de PEI/PSE, seguida de uma camada da enzima tirosinase imobilizada por 1 min (a); Absorvância a 270 nm em função do número de bicamadas depositadas dos filmes PEI/PSE (b).	48
Figura 11 – Espectro de absorvância da plataforma de (PEI/PSE) ₃ sem a tirosinase e com a tirosinase imobilizada durante 15 min e a diferença entre as curvas.	49
Figura 12 – Micrografias ópticas dos filmes: (PEI/PSE) ₃ (a); (PEI/PSE) ₅ (b); (PEI/PSE) ₅ (ampliada) (c).....	50
Figura 13 – Imagem de microscopia confocal: 1 monocamada PEI (a); (PEI/PSE) (b); (PEI/PSE) ₃ (c); (PEI/PSE) ₅ (d); (PEI/PSE) ₁₀ (e); (PEI/PSE) ₅ (ampliada) (f). ...	51
Figura 14 – Imagens obtidas por AFM dos filmes: (PEI/PSE) ₃ (a) e (PEI/PSE) ₅ (b).....	52
Figura 15 – Micrografias dos eletrodos: Cr/Au (a); 1 monocamada PEI (b); (PEI/PSE) (c); (PEI/PSE) ₃ (d); (PEI/PSE) ₅ (e); (PEI/PSE) ₁₀ (f);.....	55

Figura 16 – Valores de rugosidade dos filmes de (PEI/PSE).	55
Figura 17 – Análise PM IRRAS do filme com apenas uma camada de PEI e 1, 3 e 5 bicamadas de PEI/PSE.	57
Figura 18 – Difração de raios X das estruturas de ZnO.	58
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FEG) de filmes de ZnO: (a) e (b) 5 ciclos (50 μm e 10 μm); (c) e (d) 10 ciclos (50 μm e 10 μm).	59
Figura 20 – Micrografias obtidas por AFM dos filmes de ZnO_5Ciclos, ZnO_5Ciclos_APTES e ZnO_5Ciclos_APTES_Enzima Tirosinase.	60
Figura 21 – Imagens obtidas por AFM dos filmes de ZnO_10Ciclos, ZnO_10Ciclos_APTES e ZnO_10Ciclos_APTES_Enzima Tirosinase.	61
Figura 22 – Medidas com o filme (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase em diferentes concentrações de tampão PBS com adições de catecol.	63
Figura 23 – Sinal do biossensor (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase para detectar 25 μM de catecol.	65
Figura 24 – Medidas com filme (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase com adições de diferentes alíquotas de catecol (a); Curva de calibração com filme (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase (b).	66
Figura 25 – Sinal da plataforma (PEI/PSE) ₅ sem a enzima tirosinase a fim de detectar 25 μM de catecol.	67
Figura 26 – Medidas com adições de diferentes alíquotas de catecol em filme (PEI/PSE) ₅ sem a enzima Tirosinase (a); Curva de calibração com filme (PEI/PSE) ₅ sem a enzima Tirosinase (b).	68
Figura 27– Espectro de absorbância da solução PSE, e a reação entre 100, 200, 300 e 400 μL de catecol (5,0 mmol.L^{-1}) e a solução de PSE.	69
Figura 28 – Sinal do biossensor de ZnO a fim de detectar 25 μM de catecol.	70
Figura 29 – Medidas com adições de diferentes alíquotas de catecol em filme de ZnO_5ciclos com enzima tirosinase (a); Curva de calibração com o filme de ZnO_5Ciclos com enzima tirosinase (b).	71
Figura 30 – Sinal característico do eletrodo (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase para determinação de 25 $\mu\text{mol/mL}$ de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril (linha em vermelho).	73
Figura 31 – Curva analítica para determinação do pesticida carbaril expressa em porcentagem de inibição enzimática da plataforma (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase.	75
Figura 32 – Sinal característico do eletrodo (PEI/PSE) ₅ para determinação de uma	

concentração conhecida de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril.....	76
Figura 33 – Curva analítica para determinação do pesticida carbaril expressa em porcentagem de inibição da plataforma (PEI/PSE) ₅	77
Figura 34 – Sinal característico do eletrodo de ZnO para a determinação de uma concentração conhecida de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril (linha em vermelho).....	79
Figura 35 – Curva analítica para determinação do carbaril expressa em porcentagem de inibição enzimática da plataforma de ZnO.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sais utilizados e a concentração correspondente para confecção de 1L de tampão 1X PBS (pH~7.4).....	37
Tabela 2 – Valores de rugosidade dos filmes de ZnO.....	62
Tabela 3 – Sensibilidade analítica, limite de detecção e variação da densidade de corrente dos filmes (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase, (PEI/PSE) ₅ e ZnO.....	72
Tabela 4 – Comparação da porcentagem de inibição entre as plataformas (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase, (PEI/PSE) ₅ e ZnO	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Absorbância

AFM – Microscopia de Força Atômica

Ag/AgCl – Prata/Cloreto de Prata

APTES – 3-Aminopropyltriethoxysilane

Au – Ouro

BK7 – Condutores de vidro

[Carbaril] – Concentração de Carbaril

[Catecol] – Concentração de Catecol

CARB – Carbamatos

CCMC – Crescimento de cristais e materiais cerâmicos

Cr – Cromo

E – Enzima

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

FEG-SEM – Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo

FTO – Óxido de estanho dopado com flúor

HCl – Ácido Clorídrico

Hg/HgCl – Eletrodo de calomelano

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

IRRAS – Espectroscopia de infravermelho no modo reflexão-absorção

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KCl – Cloreto de Potássio

KMnO₄ – Permanganato de Potássio

KOH – Hidróxido de potássio

LOD – Limite de detecção

LDRX – Laboratório multiusuário de difração de raios-X

m – Inclinação da reta ou sensibilidade analítica

NaOH – Hidróxido de sódio

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

P – Produto

PBS – Tampão fosfato

PEI – Polietilenoimina

PFO – Enzima polifenol oxidase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PM-IRRAS – Espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação da polarização

PSE – Polissacarídeo extracelular

Pt – Platina

RMS – Rugosidade média quadrática

rpm – Rotação por minuto

S – Substrato

Sb – Desvio padrão

UV-Vis – Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

XRD – Difração de raios X

ZnO – Óxido de Zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	29
2.1 Definição e histórico do desenvolvimento dos biossensores	29
2.2 Enzimas empregadas como material biológico em biossensores.....	31
2.2.1 Enzima polifenol oxidase (PFO).....	32
2.3 Pesticidas Carbamatos.....	33
2.4 Biossensores nanoestruturados com Polissacarídeos Extracelulares Algais.....	35
2.5 Biossensores com nanoestruturas de ZnO eletrodepositadas	36
CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Materiais e soluções utilizadas	37
3.2 Técnicas de caracterização das plataformas PEI/PSE e ZnO.....	39
3.3 Preparação dos filmes PEI/PSE.....	41
3.3.1 Formação dos filmes	41
3.3.2 Metodologia usada na detecção do carbaril	43
3.4 Preparação dos filmes nanoestruturados de ZnO	44
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Caracterização por espectroscopia na região do UV-Vis.....	45
4.1.1 Caracterização dos materiais em solução	45
4.1.2 Caracterização da deposição dos filmes de PEI/PSE.....	48
4.2 Caracterização morfológica e estrutural das plataformas	49
4.2.1 Microscopia óptica das plataformas de PEI/PSE.....	49
4.2.2 - Microscopia Confocal de Varredura a laser	50
4.2.3 AFM das plataformas de PEI/PSE.....	52
4.2.4 PM-IRRAS das plataformas PEI/PSE	56
4.2.5 Raios-X das plataformas de ZnO	57
4.2.6 FEG-SEM das plataformas de ZnO	58
4.2.7 AFM das plataformas de ZnO	60

4.3 Caracterização das plataformas como biossensores	63
4.3.1 Resposta do sistema a diferentes concentrações de tampão PBS.....	63
4.3.2 (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase: Biossensor de catecol	64
4.3.3 (PEI/PSE) ₅ : Biossensor de catecol	67
4.3.4 ZnO: Biossensor de catecol.....	70
4.3.5 (PEI/PSE) ₅ /Tirosinase: Biossensor de pesticida.....	72
4.3.6 (PEI/PSE) ₅ : Biossensor de pesticida	76
4.3.7 ZnO: Biossensor de pesticida.....	78
4.3.8 Comparação das plataformas.....	80
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
5.1 Conclusões.....	81
5.2 Perspectivas Futuras	82
REFERÊNCIAS.....	83

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, milhares de habitantes do mundo são intoxicados por agrotóxicos, e até mesmo no leite materno já foram encontrados seus resíduos. Nos seres humanos, a falta de controle no uso desses pesticidas tem provocado o aumento nas incidências de câncer, depressão, doenças no sistema nervoso, doenças mentais, disfunções na reprodutividade humana, distúrbios hormonais, malformação fetal e até mortes^{1,2}. Tais problemas vêm ao longo do tempo estimulando a demanda por novos sensores e biossensores que possam ser utilizados nas detecções dessas substâncias³. Assim, a construção de biossensores para a detecção de pesticidas é o foco desse trabalho, uma vez que o Brasil se tornou um dos maiores produtores de grãos no mundo, o que consequentemente o levou ao uso intensivo de grandes quantidades de agrotóxicos a fim de inibir as pragas nas lavouras.

Entre os vários pesticidas agrícolas, o inseticida carbaril pertencente à classe dos carbamatos é um dos mais usados para controlar e exterminar as pragas⁴. Ele apresenta uma capacidade potencial teratogênico, o que exige sua monitoração contínua em alimentos e em águas potáveis⁵. Neste sentido, a presente proposta visou o desenvolvimento de novos biossensores para a detecção do inseticida carbaril, através da viabilidade de utilização de duas plataformas distintas:

1) Filmes híbridos nanoestruturados formados por um eletrodo de vidro recoberto com Cr/Au, convenientemente modificado com o polieletrólito catiônico polietilenoimina (PEI)^{6,7} em conjunto com o polissacarídeo extracelular (PSE) produzido pela microalga *criptofícea* *Cryptomonas tetrapirenoidosa*⁸, preparados através da técnica de deposição "spin-coating"⁹, que possibilita criar filmes multicamadas de diferentes materiais em escala nanométrica e de maneira simples.

2) Filmes nanoestruturados de ZnO fabricados por eletrodeposição pulsada¹⁰, técnica que possibilita produzir plataformas de baixo custo e aplicáveis como ensaios de alta capacidade para detecção sensível e em tempo real de uma ampla gama de espécies biológicas. Os filmes de ZnO foram crescidos sobre substratos revestidos de Cr/Au, entre um potencial de redução e um de oxidação usando uma solução eletrolítica à base de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

Inicialmente, as duas plataformas foram testadas como biossensores eletroquímicos para a detecção do composto orgânico catecol¹¹, baseados na imobilização da enzima polifenol oxidase (PFO) conhecida como tirosinase, na forma de extrato bruto em sua fonte natural (fruto abacate), desta forma, diminuindo os custos de construção do dispositivo

em comparação com o uso de enzimas comerciais. Como a tirosinase tem sua ação inibida na presença de pesticidas carbamatos e organofosforados, foram construídos biossensores eletroquímicos com objetivo de detectar de forma rápida e eficaz pequenas quantidades do inseticida carbaril por meio da detecção indireta do catecol. E além disso, de modo comparativo, as plataformas de PEI/PSE sem a presença imobilizada da enzima foram estudadas para a detecção do catecol e do carbaril.

Existe uma procura por métodos eficazes de detecção e quantificação dessas substâncias, que sejam ao mesmo tempo inócuas ao meio ambiente e de baixo custo¹², uma vez que o uso intensificado desses defensivos agrícolas tem provocado à degradação de vários ecossistemas e a contaminação dos meios aquáticos, os quais são frequentemente fonte de água para o consumo humano. Também, como resultado da conscientização social devido à intensa aplicação desses pesticidas, novos programas de vigilância e controle mais rigorosos vem surgindo, todavia, para que esses programas alcancem sucesso são necessárias técnicas que permitam a análise diretamente no local de coleta e de um grande número de amostras¹³. Essas substâncias tóxicas ainda são detectadas por meio de métodos analíticos incluindo cromatografia em fase gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência¹⁴ e análise por injeção de fluxo (FIA)¹⁵ que são métodos que exigem muito tempo na análise das amostras, equipamentos sofisticados e caros, além de equipe técnica especializada e com conhecimento avançado.

Todavia na construção das plataformas PEI/PSE e ZnO destacam-se a simplicidade no processamento, a eficiência e a rapidez de detecção. Características importantes que as fazem economicamente promissoras e aptas a serem produzidas em escala industrial, com baixo custo, boa sensibilidade, pois exibem em tempo real e futuramente no local de coleta uma melhor precisão na detecção de pequenas quantidades do inseticida carbaril, o qual é comumente utilizado na lavoura brasileira¹⁶.

A apresentação dos resultados obtidos foi dividida em: capítulo 1, onde são estabelecidos os objetivos do trabalho, apresentando os principais conceitos teóricos e aplicações de biossensores usados na detecção de pesticidas; capítulo 2, que apresenta uma fundamentação teórica sobre o desenvolvimento dos biossensores, as enzimas empregadas como material biológico, destacando a definição da enzima polifenol oxidase (PFO), um resumo dos pesticidas carbamatos e dos biossensores com o polissacarídeo PSE e ZnO; enquanto que, no capítulo 3 são descritos os materiais e os métodos usados na preparação dos filmes PEI/PSE e ZnO, incluindo os equipamentos e as técnicas de caracterização; no capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados experimentais de confecção, caracterização e

aplicação das plataformas produzidas como biossensores de catecol e do pesticida carbaril; finalizando, no capítulo 5 são revisadas as conclusões finais e as perspectivas de trabalhos futuros complementares aos da tese.

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo foram revisados os princípios químicos e físicos que descrevem os biossensores, sua estrutura, sua operação, bem como seus aspectos experimentais e teóricos, dando ênfase aos biossensores amperométricos. Foram apresentadas as enzimas empregadas como material biológico nos biossensores que sofrem inibição na presença de pesticidas e descritos os métodos de fabricação dos biossensores nanoestruturados com polissacarídeos extracelulares algais e com o ZnO eletrodepositado. E por fim uma breve descrição do uso de pesticidas da classe dos carbamatos bastante usados na agricultura do Brasil, destacando o inseticida carbaril.

2.1 Definição e histórico do desenvolvimento dos biossensores

Os biossensores são dispositivos compactos, práticos, economicamente atrativos e competitivos em termos de aplicações ambientais. Nesses dispositivos, pesticidas podem ser quantificados de maneira direta¹⁷ ou indireta¹⁸. Especificamente, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)¹⁹ um biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa de análise seletiva, utilizando um elemento de reconhecimento biológico²⁰ em contato direto com um dispositivo integrado transdutor-receptor que apresenta a propriedade de transformar uma informação química em um sinal elétrico mensurável²¹.

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lions em 1962, conhecido como "eletrodo enzimático"²². Desde então, um grande avanço foi alcançado quanto ao desenvolvimento de biossensores para a determinação e análises clínicas de diversas substâncias, destacando-se o desenvolvimento e aprimoramento dos biossensores amperométricos, potenciométricos, condutométricos, impedancimétricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos²³. Os diversos tipos de sensores são classificados segundo os princípios químicos e físicos, tais como temperatura, luz, som, calor, radiação, tensão elétrica, pressão, etc²⁴.

A Figura 1 apresenta o esquema básico de um biossensor. A amostra contendo o analito entra em contato com o material biológico específico que está imobilizado e conectado a um transdutor. Neste local ocorre uma reação bioquímica/biológica responsável pela geração do sinal que pode ser eletroquímico. O sinal criado, proporcional à concentração do analito é convertido em um sinal mensurável, permitindo verificar as diferenças de concentração do analito. E o transdutor detecta e transforma esse sinal biológico em um sinal elétrico que em seguida será amplificado, sendo por fim processado²⁰.

Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um biossensor.
Fonte: SOARES²⁵.

Os biossensores eletroquímicos são compostos por um eletrodo quimicamente modificado formado por um material biológico adsorvido em sua superfície²⁶. Dentre as classes de biossensores eletroquímicos destaca-se a subclasse dos biossensores amperométricos, onde existe a ocorrência de transferência de elétrons, ou seja, a corrente gerada pela oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas na superfície do

eletrodo de trabalho é medida e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas²⁷.

Os biossensores eletroquímicos estão em um período bastante avançado de pesquisa em comparação com outros biossensores, pois oferece alta especificidade, baixo custo, versatilidade, limites de detecção e seletividade específica²⁰. Esse tipo de biossensor apresenta adequada interação com o analito, propriedade fundamental para o bom funcionamento de um biossensor, uma vez que essa interação provoca alterações físico-químicas (geração de íons, elétrons, etc) que podem ser detectadas e medidas no transdutor. O componente biológico imobilizado adequadamente deve reagir seletivamente com o analito a ser investigado e o transdutor deverá detectar apenas um reagente específico²⁸.

2.2 Enzimas empregadas como material biológico em biossensores

As enzimas são biocatalizadores de grande importância utilizados na construção de biossensores como elementos de reconhecimento biológico²⁹, pois apresentam alta seletividade, sendo responsáveis pela geração do sinal no transdutor, podendo ser imobilizadas fisicamente ou quimicamente em uma matriz (suporte ideal). Uma das principais preocupações na construção dos biossensores amperométricos é o processo de imobilização das enzimas, a fim de que, a maior quantidade de enzimas ativas permaneça ligada à superfície do eletrodo³⁰. Outro problema é a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo de trabalho, responsável por transmitir o sinal ao sistema, que em seguida converte o sinal da reação biológica em um sinal elétrico, sendo este sinal proporcional à concentração do substrato. Determinadas enzimas aumentam a velocidade de certas reações em até 10^{14} vezes, sem exigir condições extremas de temperatura, pressão e pH³¹.

A reação de catálise de uma enzima, onde a enzima atua sobre o substrato (S) que se transforma em produto (P), pode ser ilustrada da seguinte forma:

As enzimas se destacam entre os catalisadores mais específicos, tanto para o substrato como para o tipo de reação executada sobre o substrato. As estruturas tridimensionais da enzima permitem um preciso encaixe com o substrato, devido às ligações não-covalentes (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals) entre o substrato e o sítio ativo. A fim de explicar a especificidade da enzima foram propostos os modelos de chave-fechadura e encaixe induzido^{32,33}.

Entre os diversos fatores que influenciam a atividade enzimática, estão o pH, a temperatura, a concentração do substrato, o tempo e o produto da reação³⁴.

Os inibidores são moléculas capazes de inibir a ação catalítica de uma enzima, ocupando o seu centro ativo por afinidade estrutural com o substrato original (inibidor competitivo)^{18,29} ou alterando a conformação espacial da enzima, que impede a união da enzima com o substrato (inibidor não competitivo)^{18,29}.

Inúmeros pesquisadores têm analisado e estudado os métodos de imobilização³⁵ a fim de obter uma melhor atividade enzimática e alta estabilidade, evitando o processo de desnaturação, uma vez que o melhor método está ligado diretamente ao desempenho do biossensor. Esses métodos se baseiam em ligações físicas, onde a enzima não apresenta nenhuma alteração em sua estrutura química, pois envolve apenas fracas interações entre o suporte e a enzima, e ligações químicas entre a biomolécula e o suporte, neste caso a enzima é ligada quimicamente ao suporte através de ligações covalentes entre a enzima e o suporte^{36,37}.

Os principais métodos usados para a imobilização de enzimas por ligação física são: adsorção^{38,39}, retenção em membranas⁴⁰, microencapsulamento³⁵ e eletropolimerização⁴¹. Para imobilização por ligação química os métodos utilizados são: covalente⁴² e covalente cruzada⁴³. Para a produção de sensores enzimáticos, a enzima escolhida e o método de imobilização da enzima em uma matriz adequada são de fundamental importância.

2.2.1 Enzima polifenol oxidase (PFO)

A enzima polifenol oxidase (PFO) foi descoberta em 1895 por Bourquelot e Bertrand⁴⁴, pertence ao grupo das oxirredutases, sendo conhecida como tirosinase, fenolase, creolase e catecol oxidase⁴⁵. Ela se encontra amplamente distribuída em plantas e fungos e

têm sido estudadas em várias plantas alimentares, incluindo banana, trigo e abacate⁴⁶.

A PFO catalisa dois tipos diferentes de reações na presença de oxigênio molecular, a o-hidroxilação de monofenóis para produzir o-difenóis (atividade de monofenolase ou cresolase EC 1.14.18.1) e a oxidação de o-difenóis para produzir a o-quinonas (atividade difenolase ou catecolase EC 1.10.3.2)⁴⁷. Ou seja, ela oxida difenóis, transformando-os em quinonas⁴⁸ na presença do oxigênio molecular, e é usada na determinação de compostos fenólicos, sendo a responsável pelo efeito de escurecimento de muitos vegetais e frutas⁴⁹.

Estudos químicos e espectroscópicos demonstram que o sítio ativo da tirosinase é composto por um complexo de cobre binuclear. A forma oxigenada da enzima (oxitirosinase, Eoxy) consiste em dois átomos de Cu (II) tetragonais cada um coordenado com três moléculas de histidina⁵⁰ por meio de duas ligações de N_{his}, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial fraca. A Figura 2 mostra a enzima PFO exibindo um centro de cobre Tipo 3.

Figura 2 – Modelo esquemático do sítio ativo da PFO
Fonte: DURÁN⁵¹.

2.3 Pesticidas Carbamatos

Os carbamatos (CARB) estão entre as principais classes de pesticidas largamente utilizados na agricultura devido à sua ampla atividade biológica. No entanto, esses pesticidas podem afetar a transmissão do impulso nervoso, induzir toxicidade neurológica, insuficiência crônica de neurodesenvolvimento, disfunção dos sistemas imunológico, endócrino, reprodutivo e muitos outros. Eles atingem o corpo humano por meio da cadeia alimentar e do ciclo de águas, logo, existe uma crescente preocupação pública sobre os resíduos desses

pesticidas nas dietas alimentares, o que levou à regulamentação restrita de limites máximos desses pesticidas nos produtos alimentares⁵².

Trata-se de compostos derivados de ésteres do ácido carbâmico (monoamida do ácido carbâmico)⁵³. A Figura 3 ilustra a estrutura geral dos pesticidas carbamatos.

Figura 3 – Estrutura química geral dos pesticidas carbamatos.
Fonte: STENERSEN⁵³.

Com o objetivo de combater e prevenir pragas na agricultura se faz necessário o uso abundante desses pesticidas, porém, a consequência pode ser as intoxicações de mamíferos, de aves e também de humanos. A intoxicação se dá quando absorvidos pelo organismo por via oral, respiratória, cutânea (dérmica) e mucosas. Como esses pesticidas são largamente empregados na agricultura, existe uma busca por dispositivos que detectem de forma rápida e confiável essas substâncias, a fim de garantir a qualidade e a segurança alimentar da humanidade, protegendo também o meio ambiente. Com isso, vários biossensores têm sido pesquisados e produzidos com o propósito de detecção e determinação desses pesticidas^{54,55,56}, destacando-se os biossensores amperométricos que se baseiam na inibição enzimática da tirosinase^{57,58}.

O carbaril (1-naftil-metilcarbamato) é um inseticida da classe dos carbamatos, considerado muito tóxico (classe toxicológica II). São comercializados com vários nomes, Sevin 480 SC, Sevin 850 PM e Carbaril Fersol. Sendo utilizados em culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pepino, repolho e tomate. Embora seja um inseticida comum na agricultura, algumas vezes, é usado como um fungicida⁵⁹. A exposição ao carbaril causa efeitos neurológicos, náuseas, vômitos, coma, insuficiência respiratória e até morte¹⁴. Logo, diante desses efeitos tóxicos uma detecção sensível e rápida do carbaril é essencial para proteção da saúde humana e do meio ambiente.

A Figura 4 apresenta a fórmula estrutural do carbaril.

Figura 4 – Fórmula estrutural do carbaril
Fonte: NI; CAO; KOKOT⁶⁰.

2.4 Biossensores nanoestruturados com Polissacarídeos Extracelulares Algaeis

As microalgas são grupos de organismos amplamente distribuídos geograficamente, que estão sendo aplicadas em diversos campos de pesquisas devido à facilidade no cultivo e relevância ambiental. Os polissacarídeos extracelulares algais (PSE) consistem na maior parte de matéria orgânica liberada para o meio ambiente por microalgas em rios, lagos e oceanos⁶.

A composição química dos polissacarídeos extracelulares solúveis de várias algas forma um complexo extracelular de heteropolissacarídeos. Os PSE têm monossacarídeos ácidos e grupos sulfatos em suas estruturas, lhes conferindo carga negativa⁶¹.

Os PSE têm se tornado tema de muitas pesquisas devido à sua importância ecológica em ecossistemas aquáticos e devido às suas grandes aplicações potenciais em indústria e biotecnologia. É importante compreender as interações de polissacarídeos com os modelos de membrana, que é fundamental para a sua imobilização em matrizes sólidas. Neste contexto, a imobilização de extratos de algas em filmes ultrafinos é uma abordagem interessante na construção de estruturas organizadas, onde propriedades físico-químicas podem ser controladas⁶¹.

Neste trabalho foram construídas plataformas híbridas formadas pelo polissacarídeo extracelular algal (PSE) em conjunto com o polieletrólito catiônico (PEI), preparados através da técnica de deposição spin-coating, a fim de serem analisadas como um

dispositivo que pode detectar a presença do catecol e do inseticida carbaril. De maneira geral, este resultado é de suma importância tanto para a biotecnologia como para o desenvolvimento sustentável, uma vez que essa nova plataforma poderá ser usada na detecção de pesticidas, contribuindo para a preservação ambiental.

2.5 Biossensores com nanoestruturas de ZnO eletrodepositadas

Os filmes com nanoestruturas de óxido de zinco (ZnO) vêm atraindo muito interesse nas aplicações em biossensores, devido à sua biocompatibilidade, elevado ponto isoelétrico, atividade eletroquímica, elevada mobilidade de elétrons, facilidade de síntese por diversos métodos e uma alta razão área-volume que proporciona um ambiente mais favorável para a preservação da atividade de moléculas imobilizadas⁶². Diversas nanoestruturas de ZnO (fios, hastes, flores, folhas, etc) têm sido investigadas para aplicações em biossensores, sendo sintetizadas por vias químicas e físicas⁶².

Essas nanoestruturas de ZnO podem ser usadas como plataformas sensíveis de detecção em tempo real em uma ampla gama de espécies biológicas⁶³. O óxido de zinco tem emergido como um dos materiais mais promissores devido às suas propriedades elétricas e ópticas, que por ser obtido através de muitos métodos de crescimento é compatível com uma ampla variedade de substratos⁶⁴, podendo assim ser utilizado em diversas aplicações^{65,66}.

CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais, os métodos e as técnicas de caracterização utilizados no processamento das amostras (membranas) PEI/PSE e ZnO.

3.1 Materiais e soluções utilizadas

Todas as vidrarias (béqueres, balão volumétrico) e os substratos de quartzo utilizados passaram por um processo de limpeza com permanganato de potássio (KMnO_4) a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 (1:20)), a fim de garantir a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nos resultados, da mesma maneira os substratos condutores de vidro (BK7), que posteriormente foram cobertos por evaporação com 30 nm de cromo e em seguida com 120 nm de ouro (metalizadora pertencente ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC)). Também foi efetuada uma última etapa de limpeza nos eletrodos de Cr/Au, devido à exposição que eles sofreram ao serem retirados da evaporadora e armazenados, usando solução de etanol por 5 min. Em seguida os eletrodos foram mergulhados em uma solução de hidróxido de potássio (KOH (5mM)) contendo 5% de H_2O_2 por 10 min⁶⁷. Em meio a todas as etapas foram utilizadas água ultrapura para lavagem dos eletrodos e por fim jato de N_2 foi usado na secagem.

O tampão utilizado nas medidas foi o fosfato salino (PBS) com pH de aproximadamente 7,4, cuja receita⁶⁸ para 1 L de solução na concentração correspondente a 10 mM ou como será utilizado no decorrer dessa tese, 1X PBS, está descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Sais utilizados e a concentração correspondente para confecção de 1L de tampão 1X PBS (pH~7.4).

Sal	Massa Molecular (MM)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	137
KCl	74,55	2,7
Na₂HPO₄	141,96	10
KH₂PO₄	136,09	2

Fonte: Elaborada pela autora.

Os reagentes para o processamento das amostras foram adquiridos comercialmente e utilizados como recebidos, os fios de ouro para metalização foram comprados da Alfa Aesar (1 mm de diâmetro e 99% de pureza).

Na extração da enzima tirosinase foi utilizado o fruto abacate em extrato bruto e polyclar 10 (ISP do Brasil), sendo o processo de extração o mesmo descrito por Lupetti⁴⁴. Foram liquidificados 25 g de abacate (polpa), 2,5 g de polyclar com 100 mL de tampão PBS por 3 min, em seguida essa mistura foi filtrada utilizando gaze e centrifugada a 18000 rpm a 4 °C por 1 hora. O sobrenadante foi retirado e armazenado em frascos opacos de 2 mL ao abrigo da luz e a baixa temperatura (congelador à aproximadamente -6°C) para evitar oxidação até o seu uso⁶⁹.

Na detecção de catecol utilizou-se o reagente pirocatecol (Mallinckrodt) diluído em tampão 1X PBS e para a detecção do pesticida, o escolhido foi o carbaril (Carbaryl Pestanal (1-Naphthyl Methylcarb)) adquiridos da Sigma Aldrich, o qual foi diluído em metanol⁷⁰ e armazenado em um frasco no escuro a 4°C.

Durante o desenvolvimento do trabalho foram utilizados: eletrodos de referência de Ag/AgCl e de calomelano saturado (ECS); eletrodo de platina (Pt) como contra-eletrodo; e uma célula eletroquímica (célula de vidro) produzida na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), como mostra a Figura 5.

Figura 5 – Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com o eletrodo de referência, contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho (a); ampliação do eletrodo de trabalho (b)

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Técnicas de caracterização das plataformas PEI/PSE e ZnO

Existem diferentes técnicas que podem ser empregadas na obtenção de informações referentes às características estruturais dos materiais, a fim de se compreender sua estrutura, sua composição e suas propriedades. Assim, as plataformas de PEI/PSE e ZnO foram caracterizadas por diversas técnicas, entre elas estão a espectroscopia UV-Vis, a espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), a difração de raios-X (XRD) e as microscopias óptica, de força atômica (AFM), confocal, e eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG-SEM).

Os espectros das soluções utilizadas na formação das plataformas PEI/PSE e o monitoramento do crescimento das suas multicamadas através da absorbância em função do número de bicamadas adsorvidas foram obtidas por um espectrômetro UV-Vis Varian Cary 50 Scan pertencente ao grupo de Polímeros Prof. Bernhard Gross do IFSC/USP/São Carlos.

As imagens de AFM foram realizadas em um microscópio Icon-Bruker do IFSC/USP/São Carlos usando cantilever de silício de forma retangular com mola de 40 N/m operando na frequência 320 kHz no modo de contato intermitente, com o objetivo de analisar a rugosidade e os defeitos nas superfícies das plataformas.

Na obtenção das imagens de microscopia confocal foi usado um polieletrólito catiônico emissor de luz, o poli (cloreto de tetraidrotiofeno de xililideno) (PTHT), que atuou como marcador em baixa concentração para visualização e quantificação da homogeneidade das camadas automontadas de PEI (não emissor). Foram preparadas soluções de PTHT em conjunto com o PEI, de modo a alcançar uma solução adequada para a formação das camadas, tornando possível obter cada imagem. O PTHT possui absorção em 495 nm, emissão em 519 nm e coeficiente de extinção de $73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para excitar este marcador, foi usado um laser de argônio no comprimento de onda 488 nm. O microscópio utilizado foi o LSM 780 da ZEISS® pertencente ao IFSC/USP/São Carlos, que utiliza a técnica de aquisição de imagens por varredura a laser. Para a aquisição dos dados, assim como para a análise destes, foi utilizado o software ZEN 2010® da ZEISS®. A objetiva utilizada é de imersão em água e possui aumento de 40x. A Figura 6 ilustra a imagem do microscópio confocal.

Figura 6 – Microscópio confocal de varredura (LSM 780, ZEISS®) utilizado neste trabalho.
Fonte: TSUTAE⁷¹

Os espectros de PM-IRRAS foram obtidos a fim de caracterizar a composição química do PEI e a interação PEI/PSE, usando um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), que possui uma lâmpada de Carbetto de Silício (Globar) como fonte de luz IR, um modulador de polarização fotoelástico composto por um cristal de ZnSe (operando em 50 KHz) e um detector de HgCdTe (MCT) modelo PCI-3TE-10.6, pertencente ao grupo de Polímeros Prof. Bernhard Gross do Instituto de Física de São Carlos. Todas as medidas foram realizadas com o ângulo da luz incidente de 81° em relação à normal, na qual a intensidade é maximizada e o nível de ruído é menor.

Como cada material tem um espectro de difração característico da sua estrutura cristalina, a técnica de XRD foi utilizada para identificar a fase cristalina nas amostras de ZnO. A difração de raios-X foi realizada em temperatura ambiente, usando um difratômetro Panalytical modelo X'Pert Pro MPD disponível no Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X (LDRX), junto ao Departamento de Física UFSC. Também foi utilizada a radiação monocromática $K\alpha_1$ do Cu ($\lambda = 1.5406\text{\AA}$). Uma estratégia adotada com o objetivo de

melhorar a razão sinal/ruído foi apresentar o difratograma como a soma de 10 varreduras sucessivas.

O equipamento utilizado para as análises de FEG-SEM foi um microscópio modelo Inspect F50, FEI, pertencente ao grupo de pesquisa de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos (CCMC) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) e ao Departamento de Engenharia de Materiais USP/São Carlos.

E as medidas eletroquímicas foram realizadas no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxilogia (Gnano) do Instituto de Física de São Carlos/USP usando um potenciostato/galvanostato (Eco Chemie/Metrohm Autolab PGSTAT12 GPES versão 4.9) e também no Instituto de Física da UFMT utilizando um potenciostato/galvanostato (PGSTAT 302N NOVA versão 1.10).

3.3 Preparação dos filmes PEI/PSE

Os polissacarídeos PSE foram obtidos como descritos na referência⁷². Cedidos pela professora Dr^a. Cristina Souza Freire Nordi da Universidade Federal de São Paulo/Campus Diadema.

3.3.1 Formação dos filmes

Na formação dos filmes os eletrodos de vidro recobertos com Cr/Au foram modificados através da técnica de deposição spin-coating empregando o método estático, ou seja, uma pequena quantidade de solução foi colocada no centro do substrato em repouso. O polieletrólito catiônico polietilenoimina (PEI) foi preparado na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ e o polissacarídeo extracelular algal (PSE) produzido pela microalga *criptofíceia* *Cryptomonas tetrapirenoidosa* também foi preparado na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, ambos dissolvidos em água ultrapura, sem alteração de pH (pH ~ 7). Para ser solubilizada a solução de PSE foi submetida à agitação por aproximadamente 24h em temperatura ambiente.

A Figura 7 mostra as quatro etapas de fabricação dos filmes PEI/PSE utilizando a técnica spin-coating.

Figura 7 – Esboço esquemático das etapas da formação dos filmes poliméricos ultrafinos utilizando a técnica de deposição spin-coating.

Fonte: ARAÚJO, adaptada pela autora ⁷³.

Conforme mostra a Figura 7, na Etapa 1 com o auxílio de uma pipeta graduada foi adicionado 100 μL da solução catiônica de PEI sobre o centro do substrato, a qual permaneceu em repouso por 60 s para que ocorresse a adsorção do PEI sobre o eletrodo. Na etapa 2, o substrato foi submetido a uma rotação com velocidade de 3000 rpm (rotação por minuto) por 60 s, provocando o espalhamento da solução por força centrífuga, a perda de uma pequena quantidade de material e a formação de uma fina camada de PEI. Na etapa 3, ocorre a evaporação do solvente e a espessura do filme é reduzida e finalmente na etapa 4 o filme está formado. Em seguida todas essas etapas foram novamente repetidas, porém, com 100 μL da solução do polissacarídeo PSE sendo adicionado sobre o substrato modificado com PEI. Uma vez que o PSE tem uma carga líquida negativa⁶¹, era esperada a ligação entre o PEI/PSE por meio de interações eletrostáticas. Os filmes foram produzidos em temperatura ambiente e a espessura adequada dos filmes foi obtida através do controle do número de bicamadas formadas entre o PEI/PSE.

3.3.2 Metodologia usada na detecção do carbaril

Após a produção da plataforma (PEI/PSE)₅, a enzima tirosinase foi imobilizada sobre a mesma, sendo depositados 100 µL da solução da enzima em extrato bruto sobre cada plataforma. Em seguida foram armazenadas sob uma temperatura de 4°C por 1 hora (tempo mínimo para que uma pequena concentração da enzima fosse satisfatoriamente adsorvida pela plataforma).

A detecção do inseticida carbaril foi estudada através de medidas de cronoamperometria em uma célula eletroquímica com 10 mL de tampão PBS diluído 100 vezes (nomeado neste trabalho como tampão 0,01X PBS). Foi utilizado o catecol preparado em tampão 1X PBS (5,0 mmol.L⁻¹) como analito, com um potencial constante de (0,2V vs. Ag/AgCl) sendo aplicado.

As medidas foram realizadas utilizando uma célula com três eletrodos, um eletrodo de platina (Pt) como eletrodo auxiliar, um eletrodo de calomelano (Hg/HgCl) como eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho com membranas de (PEI/PSE)₅.

De maneira simplificada a reação de oxidação do catecol, catalisada pela enzima tirosinase, é representada pela equação 1^{74,75}.

Como a enzima tirosinase foi imobilizada sobre o filme (PEI/PSE)₅, a *o*-quinona pode ser quantificada pelo aumento da densidade de corrente com a variação de catecol, uma vez que a *o*-quinona é um sub-produto da reação entre o catecol e a enzima tirosinase.

3.4 Preparação dos filmes nanoestruturados de ZnO

As plataformas de ZnO foram crescidas por eletrodeposição pulsada¹⁰, sobre substratos revestidos de Cr/Au, entre um potencial de redução (-1,1V) por 3s e um de oxidação (+0,9 V) por 1s usando uma solução eletrolítica (0,1 M) à base de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, adquirido da Sigma Aldrich. Foi utilizada uma célula padrão com três eletrodos: eletrodo platina como contra eletrodo, eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência e o eletrodo revestido de Cr/Au como de trabalho. A temperatura da solução foi mantida a 80 °C durante o crescimento dos filmes. Em seguida, as plataformas foram tratadas em um plasma de oxigênio (0,3 Torr, 25 W Power, por 60 s), a fim de melhorar a reatividade dos filmes, remover qualquer contaminante orgânico e adicionar grupos hidroxilas na superfície, ou seja, oxidando a superfície do filme, expondo os grupos OH^{76} . Seguidamente foram funcionalizadas com uma solução de APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane) (2% em tolueno por 1 hora) e depois lavadas por três vezes no mesmo solvente e em etanol para retirada do material fracamente ligado⁷⁷. O APTES atuou como um agente bifuncional responsável pelo desenvolvimento das ligações covalentemente cruzadas entre as macromoléculas da enzima, o que garantiu à enzima fixar-se melhor à superfície dos eletrodos. Ele tem sido amplamente utilizado em biossensores baseados em afinidade, porque o seu grupo silano pode ligar-se firmemente a substratos de silício ou vidro, enquanto que o seu grupo amina pode formar ligações covalentes com grupos carboxílicos (grupos funcionais que são comumente encontrados em biomoléculas)⁷⁸.

Portanto, a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de ZnO foi obtida por meio de ligações entre os grupos funcionais da enzima tirosinase e a superfície dos eletrodos por meio do APTES. Posteriormente, as plataformas foram aquecidas a 120 °C por 10 min no vácuo⁷⁶ com o objetivo de evaporar totalmente os solventes, e imediatamente, com a membrana do filme preparada, a enzima tirosinase foi covalentemente imobilizada sobre o mesmo, sendo depositada 100 μL da solução da enzima pura sobre o filme, em seguida o filme foi armazenado por 1 hora sob uma temperatura de 4°C. Para a detecção de pequenas concentrações do inseticida carbaril foram realizadas medidas de cronoamperometria, em uma célula com 10 mL de tampão 0,01X PBS, usando o catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) como analito. Foi aplicado um potencial constante (0,2V vs. Ag/AgCl) a fim de verificar a quantidade de catecol consumida ou de *o*-quinona produzida. Nas medidas foram utilizados, respectivamente, os eletrodos de Pt e de Hg/HgCl como eletrodo auxiliar e de referência.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo destina-se a apresentar os resultados obtidos com a fabricação e caracterização das plataformas automontadas por spin-coating de PEI/PSE e das plataformas eletrodepositadas de nanoestruturas de ZnO, a fim de serem aplicadas como biossensores de catecol e biossensores para a detecção do inseticida carbaril.

4.1 Caracterização por espectroscopia na região do UV-Vis

4.1.1 Caracterização dos materiais em solução

As medidas de espectroscopia na região espectral do ultravioleta ao visível (UV-Vis) foram realizadas em uma cubeta de quartzo, inicialmente para caracterizar as soluções PEI, PSE, catecol, enzima tirosinase extraída diretamente do abacate e enzima tirosinase purificada (comercial).

No espectro de absorbância do PSE observamos uma banda em aproximadamente 270 nm e no espectro do PEI não se observa nenhuma banda ou pico na curva, sugerindo que não há nenhuma transição eletrônica na região analisada, conforme ilustra a Figura 8(a). No espectro de absorbância do catecol foi observado um pico em aproximadamente 270 nm Figura 8(b). Já no espectro da enzima tirosinase extraída do abacate se observa uma banda típica de proteínas em aproximadamente 260 nm e no espectro da enzima tirosinase purificada foi observado um pico alargado aproximadamente na mesma região espectral, conforme mostra a Figura 8(b). A absorção em 220 nm se deve provavelmente a transições ópticas de grupos aromáticos. A diferença entre o espectro da enzima purificada e o espectro da enzima extraída diretamente do abacate se dá devido à composição química das duas soluções, pois, na extração direta da enzima do abacate realizada neste trabalho não foi possível separar totalmente a enzima tirosinase dos demais elementos que compõe quimicamente o abacate.

Figura 8 – Espectro de absorvância das soluções de PSE e de PEI (a); Espectro de absorvância da solução de catecol, da solução da enzima tirosinase extraída do abacate e da solução da enzima tirosinase purificada (b).
Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar experimentalmente a atividade da enzima tirosinase purificada, foi adicionado 20 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) em uma cubeta de quartzo com 2 mL da solução da enzima purificada ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), conforme mostra a Figura 9(a), a nova curva formada apresenta duas bandas, uma em 270 nm e outra em 390 nm que é originada da reação entre a enzima purificada e o catecol, ou seja a formação da o-quinona. Também pode-se verificar a reação entre a enzima extraída do abacate (extrato bruto) e o catecol, onde foi observada a formação de uma banda em aproximadamente 400 nm, correspondente a banda típica da o-quinona. Em seguida, foi adicionada essa mesma alíquota de catecol em uma cubeta com a solução da tirosinase e durante 20 min foi realizada diversas varreduras como ilustrado na Figura 9b, a reação entre o catecol e tirosinase gera a formação da o-quinona (banda 400 nm), porém essa reação se satura após os 20 min de varredura, devido a diminuição da atividade enzimática durante o experimento.

Figura 9 – Espectro de absorvância da solução com a enzima tirosinase purificada, a reação da enzima purificada com 20 μL de catecol e a reação da solução da enzima extraída com 20 μL de catecol (a); Reação da enzima tirosinase purificada com 20 μL de catecol em um intervalo de 20 min (b).

Fonte: Elaborada pela autora

4.1.2 Caracterização da deposição dos filmes de PEI/PSE

A espectroscopia de absorção UV-Vis também foi usada para monitorar o crescimento das multicamadas dos filmes PEI/PSE. Para tal, o espectro de absorbância utilizando-se um substrato de quartzo foi coletado após a deposição de cada bicamada, desde a primeira até a décima, seguida de uma camada da enzima tirosinase (1 min de imobilização) sobre a décima bicamada. Como ilustrado na Figura 10(a), um forte espalhamento de luz é observado, que pode ser analisado através do gráfico mostrado na Figura 10(b), onde a absorbância a 270 nm em função do número de bicamadas depositadas dos filmes é apresentada, esse comprimento de onda foi escolhido, pois no espectro de absorbância da solução do PSE foi observado uma banda em aproximadamente 270 nm.

Figura 10 – Espectro de absorbância de dez bicamadas de PEI/PSE, seguida de uma camada da enzima tirosinase imobilizada por 1 min (a); Absorbância a 270 nm em função do número de bicamadas depositadas dos filmes PEI/PSE (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 11 mostra o espectro de absorvância em escala logarítmica de um filme de $(PEI/PSE)_3$ sem enzima tirosinase (linha preta), o espectro do mesmo filme com a enzima imobilizada sobre o filme durante 15 min (linha azul), e a diferença entre o filme com e sem a enzima imobilizada (em vermelho). A diferença mostra uma pequena banda em aproximadamente 260 nm, cujo ajuste (linha verde) demonstra que a enzima está adsorvida sobre o filme.

Figura 11 – Espectro de absorvância da plataforma de $(PEI/PSE)_3$ sem a tirosinase e com a tirosinase imobilizada durante 15 min e a diferença entre as curvas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Caracterização morfológica e estrutural das plataformas

4.2.1 Microscopia óptica das plataformas de PEI/PSE

Imagens de microscopia óptica da superfície dos filmes de PEI/PSE foram obtidas para avaliar a morfologia dos filmes, em duas etapas de deposição, com três e cinco bicamadas, preparados nas mesmas condições experimentais. As imagens mostraram superfícies com a presença de estruturas fibrilares, provavelmente causadas pelo acúmulo do PSE, como ilustram as Figuras 12(a), 12(b) e 12(c), respectivamente.

Figura 12 – Micrografias ópticas dos filmes: (PEI/PSE)₃ (a); (PEI/PSE)₅ (b); (PEI/PSE)₅ (ampliada) (c).
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 - Microscopia Confocal de Varredura a laser

Imagens de microscopia confocal de varredura a laser da superfície dos filmes com 1 monocamada de PEI e 1, 3, 5 e 10 bicamadas PEI/PSE (Figuras 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, respectivamente) depositadas sobre o eletrodo de Cr/Au foram feitas para investigar a morfologia dos filmes. A Figura 13f mostra detalhe de uma ampliação da imagem do filme de 5 bicamadas. A mesma área de observação foi utilizada para as medidas de microscopia para uma melhor visualização do processo de deposição. Os filmes de PEI/PSE foram depositados em sequência na mesma amostra e, portanto, nas mesmas condições experimentais. As imagens mostraram superfícies contendo estruturas fibrilares do PSE que possui uma autofluorescência no amarelo, como ilustra a Figura 13. A emissão em verde corresponde à fluorescência do PTHT presente no PEI. Pode-se ver que a emissão do PTHT e do PSE é amplificada sobre a superfície do metal (em verde na Figura 13a e em amarelo nas outras figuras). É interessante observar que a deposição das fibras de PSE aumenta com o número de bicamadas e que 3 bicamadas é suficiente para cobrir por completo a superfície.

Figura 13 – Imagem de microscopia confocal: 1 monocamada PEI (a); (PEI/PSE) (b); (PEI/PSE)₃ (c); (PEI/PSE)₅(d); (PEI/PSE)₁₀ (e); (PEI/PSE)₅ (ampliada) (f).
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 AFM das plataformas de PEI/PSE

A técnica de AFM foi empregada para analisar a morfologia e a rugosidade dos filmes PEI/PSE, uma vez que a rugosidade é um fator que pode aumentar a sensibilidade. As imagens de AFM dos filmes com 3 bicamadas apresentaram uma superfície com agregação de PSE com rugosidade de 18,4 nm (obtidas através do software NanoScope Analysis), logo é menos rugoso do que filmes de 5 bicamadas que apresentaram uma superfície com agregação de PSE com rugosidade de 29,9 nm, como mostram as Figuras 14(a) e 14(b).

Figura 14 – Imagens obtidas por AFM dos filmes: (PEI/PSE)₃ (a) e (PEI/PSE)₅ (b).
Fonte: Elaborada pela autora.

As morfologias dos filmes PEI/PSE também foram estudadas por camadas e como pode ser observado nas imagens, algumas regiões mais escuras correspondem a “vales” e quanto mais clara for a região, maior é a altura do ponto observado, que corresponde ao máximo do eixo Z.

A Figura 15 apresenta as micrografias dos eletrodos: Cr/Au (a), PEI (b), (PEI/PSE) (c), (PEI/PSE)₃ (d), (PEI/PSE)₅ (e) (PEI/PSE)₁₀ (f).

Figura 15 – Micrografias dos eletrodos: Cr/Au (a); 1 monocamada PEI (b); (PEI/PSE) (c); (PEI/PSE)₃ (d); (PEI/PSE)₅ (e); (PEI/PSE)₁₀ (f);
Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores da rugosidade média quadrática (RMS) dos eletrodos: Cr/Au, 1PEI, (PEI/PSE), 3PEI_2PSE, (PEI/PSE)₃, 5PEI_4PSE, (PEI/PSE)₅, 10PEI_9PSE, (PEI/PSE)₁₀ estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Valores de rugosidade dos filmes de (PEI/PSE).
Fonte: Elaborada pela autora.

Através dos dados da Figura 16 notamos que a rugosidade dos filmes aumentava conforme o número de camadas depositadas, diminuindo a partir da décima bicamada, porém, esse valor depende muito da área analisada. Até a quinta bicamada os filmes apresentaram um padrão superficial, todavia, após a décima camada a estrutura superficial dos filmes variaram muito, logo, para os testes de detecção foram escolhidos os filmes com 5 bicamadas.

4.2.4 PM-IRRAS das plataformas PEI/PSE

A espectroscopia PM IRRAS foi utilizada para caracterizar a formação dos filmes PEI/PSE, inferir sobre a orientação e a organização molecular dos dipolos característicos e investigar as mudanças devido à interação entre PEI/PSE, no intervalo de frequência entre 900 e 1800 cm^{-1} . No espectro do filme de PEI observam-se bandas características em 1017 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, a estiramento da ligação C-N, deformação da ligação C-H, e deformação da ligação N-H^{79,80}.

Quando o PSE é adsorvido ao filme, ocorre o surgimento de bandas largas, características de proteínas e polissacarídeos⁶. Essas bandas são centradas entre 1076-1079 cm^{-1} , que correspondem a vibração do grupo C-O-C dos polissacarídeos^{6,81,82}; 1256 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação C-N de amina alifática⁸³; 1410-1415 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento da ligação C-C do anel aromático e 1596-1640 cm^{-1} , que são atribuídos ao estiramento da ligação N-H da amida I⁸³. Nas regiões de amida I, do estiramento da ligação C-C e da região de amina alifática, as áreas das bandas aumentam com a quantidade de bicamadas formadas, representando um aumento das densidades dos respectivos dipolos. Contudo, na região da ligação C-O-C tal comportamento não é observado devido a uma possível mudança na orientação do dipolo C-O-C, levando a um decréscimo na área da banda e na sua intensidade, a partir da formação da quinta bicamada, conforme mostra a Figura 17.

Figura 17 – Análise PM IRRAS do filme com apenas uma camada de PEI e 1, 3 e 5 bicamadas de PEI/PSE.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5 Raios-X das plataformas de ZnO

A estrutura cristalina foi analisada por difração de raios X (XRD) onde foi observada excelente cristalinidade sem a necessidade de tratamento térmico e a presença apenas da fase hexagonal. O background é devido ao substrato de vidro (amorfo), como ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Difração de raios X das estruturas de ZnO.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6 FEG-SEM das plataformas de ZnO

A microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG-SEM) revelaram estruturas em forma de plaquetas com dimensões médias de 70 nm, obtidas pelo ajuste das condições de crescimento variando os potenciais de redução e oxidação e sem a presença de aditivos. No escopo deste trabalho foram produzidas plataformas com 5 e 10 ciclos de oxirredução, onde cada ciclo corresponde a aplicação de um potencial de redução seguido de um potencial de oxidação, a Figura 19 mostra as morfologias obtidas com variação do número de ciclos (5 e 10 ciclos).

Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FEG) de filmes de ZnO: (a) e (b) 5 ciclos (50 μm e 10 μm); (c) e (d) 10 ciclos (50 μm e 10 μm).

Fonte: Elaborada pela autora.

As morfologias obtidas nos filmes podem ser explicadas devido à alteração na concentração do grupo OH^- na superfície do eletrodo, durante o crescimento dos filmes de ZnO. A alternância dos potenciais entre os valores de redução (-1,1 V) e oxidação (+0,9V) no eletrodo modifica efetivamente a concentração do grupo OH^- na superfície do eletrodo, ou seja, modifica o pH local¹⁰.

4.2.7 AFM das plataformas de ZnO

As micrografias obtidas por AFM indicam que a funcionalização com APTES e a imobilização enzimática são outros fatores que alteram a morfologia e a rugosidade das plataformas, conforme ilustram as Figuras 20 e 21.

ZnO – 5 Ciclos

ZnO – 5 Ciclos - APTES

ZnO – 5 Ciclos – APTES–Tirosinase

Figura 20 – Micrografias obtidas por AFM dos filmes de ZnO_5Ciclos, ZnO_5Ciclos_APTES e ZnO_5Ciclos_APTES_Enzima Tirosinase.

Fonte: Elaborada pela autora.

ZnO – 10 Ciclos

ZnO – 10 Ciclos - APTES

ZnO – 10 Ciclos – APTES - Tirosinase

Figura 21 – Imagens obtidas por AFM dos filmes de ZnO_10Ciclos, ZnO_10Ciclos_APTES e ZnO_10Ciclos_APTES_Enzima Tirosinase.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nessas imagens podem-se ver regiões mais escuras correspondentes aos “vales”, e regiões mais claras que representam os “picos íngremes” onde a altura do ponto observado é maior, ou seja, corresponde ao máximo do eixo Z.

Os valores de rugosidade média quadrática (RMS) dos filmes ZnO com 5 ciclos de oxirredução; filmes com 5 ciclos funcionalizado com APTES; filmes com 5 ciclos funcionalizado com APTES e com a enzima tirosinase imobilizada sobre o mesmo; filmes com 10 ciclos; filmes com 10 ciclos funcionalizados com APTES e por fim filme com 10 ciclos funcionalizados com APTES e com a enzima tirosinase imobilizada sobre o mesmo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de rugosidade dos filmes de ZnO.

FILMES	RUGOSIDADE (nm)
ZnO_5Ciclos	299
ZnO_APTES_5Ciclos	262
ZnO_APTES_Enzima_5Ciclos	239
ZnO_10Ciclos	95
ZnO_APTES_10Ciclos	95.2
ZnO_APTES_Enzima_10Ciclos	179

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da Tabela 2 nota-se que os filmes com 5 ciclos são mais rugosos comparados aos filmes de 10 ciclos, por este motivo os filmes de 5 ciclos foram escolhidos para serem testados como biossensores na detecção do catecol e do pesticida carbaril. Na presença da enzima, essa rugosidade superficial dos filmes com 5 ciclos decresce, causando mudanças na superfície característica dos filmes pela formação de contornos dos aglomerados em torno da amostra, equivalentes ao extrato da tirosinase na forma líquida, indicando que a enzima foi adsorvida no filme, ou seja, o líquido conserva-se nos vales por capilaridade, onde há maior adesão em relação à superfície.

4.3 Caracterização das plataformas como biossensores

4.3.1 Resposta do sistema a diferentes concentrações de tampão PBS

A resposta do sistema para diferentes concentrações de tampão PBS, está ilustrada na Figura 22, onde foi observado que quanto maior a concentração do tampão menor a densidade de corrente com as seguintes adições de catecol em μM : 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100. Para o tampão 1X PBS a variação da densidade de corrente medida foi muito pequena, devido à sua elevada força iônica e para melhorar as condições de medidas foi testado inicialmente o tampão diluído 10 vezes (0,1X PBS) e por fim o tampão diluído 100 vezes (0,01X PBS) de força iônica consideravelmente baixa. A melhor variação da densidade de corrente e sensibilidade do detector se deve a diminuição da força iônica para a solução mais diluída. Forças iônicas altas mudam as cargas superficiais da superfície do metal, o que altera a sensibilidade, e também a altura da barreira do potencial de interface metal/eletrólito. Assim, o valor dessa barreira de potencial altera profundamente o regime de correntes elétricas nesses dispositivos.

Figura 22 – Medidas com o filme (PEI/PSE)₅/Tirosinase em diferentes concentrações de tampão PBS com adições de catecol.

Fonte: Elaborada pela autora.

O tampão 0,01X PBS apresentou uma densidade de corrente com a variação do catecol muito superior ao tampão 1X PBS e ao tampão 0,1X PBS. Essa resposta do sistema a diferentes concentrações de tampão foi importante, pois, a partir desse resultado todas as medidas para caracterização das plataformas como biossensores foram efetuadas com o tampão 0,01X PBS. Portanto, o melhor resultado para o tampão mais diluído se deve a diminuição da força iônica da solução.

4.3.2 (PEI/PSE)₅/Tirosinase: Biossensor de catecol

Os resultados obtidos pela técnica de cronoamperometria tiveram como objetivos investigar as respostas das plataformas (PEI/PSE)₅/Tirosinase utilizando o catecol como analito, aplicando-se um potencial constante de 0,2Vvs. Ag/AgCl para acompanhar a quantidade de substrato consumido ou de *o*-quinona produzida durante a reação enzimática. A detecção amperométrica ocorre pela mudança de corrente em função da concentração do catecol, provocada pela reação entre o sítio ativo da enzima PFO e o catecol.

Para analisar e avaliar as plataformas sensíveis de (PEI/PSE)₅/Tirosinase como biossensor de catecol foi aplicado o seguinte sistema de medida: após a estabilização da corrente, adicionou-se 50 µL de catecol a 5,0 mmol.L⁻¹ em 10 mL de solução tampão 0,01X PBS na célula eletroquímica. Analisando o gráfico é possível observar uma variação da densidade de corrente de aproximadamente 1,56 µA.cm⁻² (eletrodo com área de 0,28 cm²) em função da concentração de catecol adicionada ao sistema. O sinal característico do sistema é ilustrado na Figura 23.

Figura 23 – Sinal do biossensor $(\text{PEI/PSE})_5/\text{Tirosinase}$ para detectar 25 μM de catecol.

Fonte: Elaborada pela autora.

As Figuras 24(a) e 24(b), respectivamente, apresentam a resposta do sistema para diferentes concentrações de catecol para filmes de $(\text{PEI/PSE})_5/\text{Tirosinase}$ e a sua curva de calibração. Inicialmente, esperou-se que a corrente se estabilizasse, em seguida adicionou-se uma alíquota de catecol em 10 mL de solução tampão na célula eletroquímica. Esperava-se novamente a estabilização da corrente e uma nova alíquota de catecol era adicionada na solução de medida. A corrente em função do tempo foi analisada para as seguintes concentrações de catecol em μM : 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 e 50.

Figura 24 – Medidas com filme (PEI/PSE)₅/Tirosinase com adições de diferentes alíquotas de catecol (a); Curva de calibração com filme (PEI/PSE)₅/Tirosinase (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

O limite de detecção (LOD) para as plataformas (PEI/PSE)₅/Tirosinase foi de $(0,207 \pm 0,017) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, determinada pela região linear da curva de calibração (2 a 50 μM) de acordo com a seguinte equação (2) ^{5,84}:

$$LOD = \frac{3Sb}{m} \quad (2)$$

onde Sb é o desvio padrão (sinal em branco sem adição de catecol) obtida a partir de 10 medidas e m é a inclinação da reta ou a sensibilidade analítica, calculada aqui como $(0,117 \pm 0,004) \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.3.3 (PEI/PSE)₅: Biossensor de catecol

Com o objetivo de investigar exclusivamente a resposta da plataforma (PEI/PSE)₅, na qual a enzima Tirosinase ainda não tivesse sido imobilizada, foram efetuadas medidas de cronoamperometria tendo o catecol como substrato. Após a estabilização da corrente elétrica, adicionou-se 50 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) em 10 mL de solução tampão 0,01X PBS na célula eletroquímica. A intensidade de corrente elétrica observada foi de aproximadamente $1,37 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ (eletrodo com área de $0,28 \text{ cm}^2$). O sinal característico do sistema é ilustrado na Figura 25.

Figura 25 – Sinal da plataforma (PEI/PSE)₅ sem a enzima tirosinase a fim de detectar 25 μM de catecol.
Fonte: Elaborada pela autora.

As Figuras 26(a) e 26(b), respectivamente, apresentam a resposta do sistema e sua curva de calibração para diferentes concentrações de catecol. A densidade de corrente em função do tempo foi analisada para as seguintes concentrações de catecol em μM : 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 e 50.

Figura 26 – Medidas com adições de diferentes alíquotas de catecol em filme $(\text{PEI/PSE})_5$ sem a enzima Tirosinase (a); Curva de calibração com filme $(\text{PEI/PSE})_5$ sem a enzima Tirosinase (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

A sensibilidade analítica e o limite de detecção (LOD) das plataformas de (PEI/PSE)₅ sem a enzima tirosinase foram de $(0,090 \pm 0,005) \mu\text{A.cm}^{-2}/\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $(0,135 \pm 0,014) \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Analisando os resultados da sensibilidade do sistema para plataformas de (PEI/PSE)₅ com e sem a imobilização da enzima tirosinase foi possível inferir que mesmo sem a enzima imobilizada sobre a superfície das plataformas ocorreram reações entre a superfície do eletrodo e o catecol, ainda que a reação entre o polissacarídeo PSE e o catecol não forme nenhum produto, conforme dados de medidas de espectroscopia na região do UV-Vis (Figura 27), onde de maneira experimental fica demonstrado que a reação entre 100, 200, 300 e 400 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) com a solução de PSE não forma nenhum produto, visto que, na região analisada apenas a banda do catecol em aproximadamente 270 nm é formada.

Figura 27– Espectro de absorvância da solução PSE, e a reação entre 100, 200, 300 e 400 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) e a solução de PSE.

Fonte: Elaborada pela autora

4.3.4 ZnO: Biossensor de catecol

Para investigar, analisar e avaliar as plataformas sensíveis de ZnO como biossensor de catecol, foi utilizada a técnica de cronoamperometria, tendo o catecol como substrato. As medidas foram realizadas aplicando-se um potencial de (0,2Vvs. Ag/AgCl), adicionando-se 50 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) após a estabilização da corrente elétrica em 10 mL de solução tampão 0,01X PBS na célula eletroquímica. Foi gerado um aumento da intensidade da corrente elétrica em virtude da reação enzimática descrita na seção 3.3.2, de aproximadamente $1,55 \mu\text{A.cm}^{-2}$ (eletrodo com área de $0,28 \text{ cm}^2$). O sinal característico do sistema é ilustrado na Figura 28.

Figura 28 – Sinal do biossensor de ZnO a fim de detectar $25 \mu\text{M}$ de catecol.
Fonte: Elaborada pela autora.

As Figuras 29(a) e 29(b), apresentam a resposta do sistema para diferentes concentrações de catecol para filmes de ZnO com 5 ciclos (escolhidos pela sua maior rugosidade) e a sua curva de calibração. No sistema de medida após a corrente se estabilizar, adicionou-se uma alíquota de catecol em 10 mL de solução tampão na célula eletroquímica e em seguida após nova estabilização da corrente, uma nova alíquota de catecol foi adicionada

na solução de medida. A corrente em função do tempo foi analisada para as seguintes concentrações de catecol em μM : 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 e 50.

Figura 29 – Medidas com adições de diferentes alíquotas de catecol em filme de ZnO_5ciclos com enzima tirosinase (a); Curva de calibração com o filme de ZnO_5Ciclos com enzima tirosinase (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

As plataformas de ZnO podem ser úteis como biossensores de catecol, pois conseguiram detectar alterações do catecol sobre os eletrodos modificados enzimaticamente. A sensibilidade analítica e o limite de detecção (LOD) dessas plataformas foram $(0,101 \pm 0,006) \mu\text{A.cm}^{-2}/\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $(0,134 \pm 0,015) \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os valores da sensibilidade analítica (m), do limite de detecção (LOD) e da variação da densidade de corrente ($j-j_0$) das três plataformas estudadas como biossensores na detecção do catecol.

Tabela 3 – Sensibilidade analítica, limite de detecção e variação da densidade de corrente dos filmes (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e ZnO.

	$m (\mu\text{A.cm}^{-2}/\mu\text{mol.L}^{-1})$	LOD ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$(j-j_0) \mu\text{A.cm}^{-2}$
(PEI/PSE)₅/Tirosinase	$0,117 \pm 0,004$	$0,207 \pm 0,017$	1,56
(PEI/PSE)₅	$0,092 \pm 0,004$	$0,135 \pm 0,014$	1,37
ZnO	$0,101 \pm 0,006$	$0,134 \pm 0,015$	1,55

Fonte: Elaborada pela autora

Comparando as três plataformas, vemos que a plataforma de (PEI/PSE)₅/Tirosinase apresentou sensibilidade analítica, limite de detecção e variação da densidade de corrente, superior às outras duas plataformas estudadas. E considerando que os valores para limites de detecções encontrados na literatura^{85,86,87} estão próximo aos valores detectados pelas plataformas aqui desenvolvidas, pode-se julgar que elas podem ser usadas como biossensores para a detecção do catecol.

4.3.5 (PEI/PSE)₅/Tirosinase: Biossensor de pesticida

Com a finalidade de obter um biossensor amperométrico para detecção do pesticida carbaril foram utilizadas as plataformas sensíveis de (PEI/PSE)₅ como suporte para imobilização da enzima tirosinase, as quais também podem ser empregadas para detectar outros pesticidas das classes dos carbamatos.

Utilizando um potenciostato autolab, aguardava-se a estabilização da corrente elétrica para então iniciar as medidas, adicionando-se 50 μL de catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) na solução, o que provocava uma alteração no sinal elétrico, notado pelo aumento da corrente elétrica, devido à reação entre a enzima tirosinase e o catecol. Esse sinal elétrico detectado está ilustrado na Figura 30 (linha em preto). Em seguida, o eletrodo modificado foi retirado do sistema e incubado (exposto ao pesticida) por 30 minutos em uma solução contendo uma concentração conhecida do pesticida carbaril. Uma nova medida foi então realizada para a mesma alíquota de catecol e devido à inibição causada pelo carbaril, um decaimento no sinal foi observado, como indica a Figura 30 (linha em vermelho).

Figura 30 – Sinal característico do eletrodo $(\text{PEI/PSE})_5/\text{Tirosinase}$ para determinação de $25 \mu\text{mol/mL}$ de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril (linha em vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado o sinal inicial da corrente elétrica devido à adição de catecol na solução foi alterado após o eletrodo ficar incubado no pesticida. Portanto, verificou-se que o sistema quantifica de maneira indireta, porém, eficiente a concentração do pesticida carbaril em amostras padrões.

A enzima tirosinase teve sua ação inibida quando exposta ao inseticida carbamato carbaril. Pois o carbaril se ligou ao sítio ativo da tirosinase, diminuindo a atividade da mesma para seu analito, no caso o catecol. Essa inibição é um parâmetro quantificador da concentração de pesticida, observada como uma diminuição no sinal do biossensor.

A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte equação (3)⁵:

$$\%I = \frac{\Delta I_0 - \Delta I_1}{\Delta I_0} \times 100 \quad (3)$$

onde ΔI_0 e ΔI_1 representa, respectivamente, a resposta do biossensor antes e após o procedimento de incubação.

Desta maneira, a plataforma (PEI/PSE)₅/Tirosinase aqui desenvolvida está baseada na capacidade que o inseticida carbaril têm de inibir a reação catalítica produzida pela enzima PFO.

Assim, baseando-se nos resultados alcançados pode-se concluir que a ação do inseticida carbaril sobre a enzima tirosinase provocava a diminuição do sinal gerado pela reação enzimática entre a plataforma (PEI/PSE)₅/Tirosinase e o catecol.

A primeira medida foi realizada antes da incubação do eletrodo no pesticida, ou seja, esperava-se que a corrente ficasse estável e adicionava-se 50 µL de catecol na solução o que provocava uma alteração do sinal elétrico, observado pelo aumento da densidade de corrente. Imediatamente, a plataforma era retirada do sistema e colocada em uma solução tampão, porém, sem pesticida, por um período de 30 minutos. Após esse tempo uma nova medida era executada seguindo os passos acima e a diferença entre a variação da densidade de corrente da última medida pela primeira é chamada de ponto zero, como está ilustrado na Figura 31.

Em seguida, as inibições foram analisadas após o eletrodo ser imerso por 30 minutos em soluções contendo as seguintes concentrações do pesticida carbaril (padrão analítico): 100, 500 e 1000 nM. O resultado se encontra no gráfico construído em porcentagem de inibição que quantifica a concentração do inseticida carbaril, como ilustra a Figura 31.

Figura 31 – Curva analítica para determinação do pesticida carbaril expressa em porcentagem de inibição enzimática da plataforma (PEI/PSE)₅/Tiosinase.

Fonte: Elaborada pela autora.

A enzima tiosinase imobilizada sobre o eletrodo (PEI/PSE)₅ teve sua ação inibida na presença de diferentes concentrações do inseticida carbaril até 1000 nM. Acima de 1000 nM a inibição decresce até não mais detectar. Acreditamos que os sítios ativos da enzima podem ter sido preenchidos ou ocupados, por isso, não haveria mais sítio ativo para o carbaril se ligar à enzima, estabilizando o sinal.

Como a plataforma (PEI/PSE)₅/Tiosinase conseguiu detectar o carbaril em uma faixa de concentração abaixo de 1000 nM e considerando que a concentração encontrada em artigos^{14,88} está nesta faixa, pode-se julgar que essa plataforma produzida através da técnica spin-coating é promissora para ser usada como biossensor para detecção de pesticidas, nesse caso, o carbaril.

4.3.6 (PEI/PSE)₅: Biossensor de pesticida

As plataformas sensíveis de (PEI/PSE)₅ foram investigadas sem a imobilização da enzima tirosinase, a fim de saber se as mesmas poderiam ser usadas como biossensor amperométrico para detecção do pesticida carbaril. Do mesmo modo que o sistema de medida descrito na seção anterior, a Figura 32 (linha em preto) mostra o aumento da corrente elétrica após a adição de 50 μL catecol ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). Logo após essa medida o eletrodo modificado de (PEI/PSE)₅ foi retirado do sistema e incubado (mergulhado em uma solução do pesticida carbaril) por 30 minutos. Uma nova medida foi então realizada para a mesma alíquota de catecol e devido à inibição causada pelo carbaril, um decaimento no sinal foi observado, como indica a Figura 32 (linha em vermelho).

Figura 32 – Sinal característico do eletrodo (PEI/PSE)₅ para determinação de uma concentração conhecida de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril (linha em vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na segunda parte da medida após o eletrodo ficar incubado no pesticida foi observado à diminuição do sinal inicial da densidade de corrente e a concentração do pesticida carbaril pode ser detectada mesmo que de maneira indireta, através dessa diferença que foi usada como fator quantificador da concentração do pesticida.

As medidas foram analisadas antes e após a incubação do eletrodo no pesticida, exceto a primeira medida (ponto zero), onde o eletrodo não foi colocado em uma solução com pesticida, mas em uma solução contendo somente o tampão por um período de 30 minutos, conforme ilustra a Figura 33.

Em seguida, todas as outras medidas foram analisadas após o eletrodo ser imerso por 30 minutos em soluções contendo as seguintes concentrações do pesticida carbaril (padrão analítico): 100, 500, 1000 e 10000 nM. A Figura 33 mostra o resultado da porcentagem de inibição em função da concentração do inseticida carbaril.

Figura 33 – Curva analítica para determinação do pesticida carbaril expressa em porcentagem de inibição da plataforma (PEI/PSE)₅.

Fonte: Elaborada pela autora.

A reação de aumento da densidade de corrente quando o catecol é adicionado, ocorre devido a alterações de carga na superfície do eletrodo, pois essa plataforma é composta pelo polissacarídeo PSE que em sua estrutura tem proteínas⁸⁹ que podem estar reagindo com o catecol e com o pesticida carbaril.

A plataforma (PEI/PSE)₅ conseguiu detectar o inseticida carbaril em concentrações abaixo de 10000 nM, porém acima desse valor a inibição decresce, provavelmente essa diminuição é causada pelo acúmulo do inseticida na superfície do eletrodo que bloqueia a passagem de elétrons para a sua superfície, deixando-o mais isolante.

Comparando os resultados das plataformas de (PEI/PSE)₅/Tirosinase (com a enzima) e (PEI/PSE)₅ (sem a enzima), foi observado que o carbaril pode estar se ligando diretamente na plataforma sem a enzima e que na plataforma com a enzima imobilizada, parte do pesticida se liga a tirosinase e a outra parte se liga ao PSE, uma vez que pelos resultados obtidos vemos que a plataforma sem a enzima consegue inibir maiores concentrações do carbaril, do que a plataforma com a enzima.

4.3.7 ZnO: Biossensor de pesticida

As plataformas sensíveis de ZnO também foram utilizadas como suporte para imobilização da enzima tirosinase, a fim de obter um biossensor amperométrico para detecção do pesticida carbaril.

O sistema de medida usado foi descrito nas seções 4.3.5 e 4.3.6, após a adição de uma alíquota de catecol, ocorreu uma alteração no sinal elétrico registrado pelo aumento da densidade corrente elétrica, devido à reação enzimática da tirosinase e o catecol, conforme mostra a Figura 34 (linha em preto). Em seguida, o eletrodo modificado de ZnO foi retirado do sistema e incubado (exposto ao pesticida) em uma solução por 30 minutos. Uma nova medida foi então realizada para a mesma alíquota de catecol e devido à inibição causada pelo carbaril, foi observado que o sinal da densidade de corrente diminuiu como indica a Figura 34 (linha em vermelho).

Figura 34 – Sinal característico do eletrodo de ZnO para a determinação de uma concentração conhecida de catecol (linha em preto) e o sinal medido para a mesma concentração de catecol após incubação do eletrodo em solução contendo uma concentração conhecida do inseticida carbaril (linha em vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, foi possível constatar que o sistema quantifica de maneira indireta à concentração do pesticida carbaril em amostras padrões, uma vez que o carbaril possui a capacidade de inibir a reação catalítica produzida pela enzima tirosinase. A Figura 35 mostra a curva analítica para determinação do carbaril expressa em porcentagem de inibição enzimática para as concentrações do pesticida carbaril em nM: 100, 1000, 5000 e 10000.

Figura 35 – Curva analítica para determinação do carbaril expressa em porcentagem de inibição enzimática da plataforma de ZnO.

Fonte: Elaborada pela autora.

A porcentagem de inibição da enzima tirosinase foi obtida para concentrações acima de 5000 nM, e para concentrações menores que 1000 nM, o eletrodo modificado de ZnO não conseguiu detectar nenhuma inibição.

4.3.8 Comparação das plataformas

Comparando os resultados de detecção do inseticida carbaril para as três plataformas pode-se concluir que a plataforma (PEI/PSE)₅/Tirosinase conseguiu detectar o carbaril para concentrações abaixo de 1000 nM, a plataforma (PEI/PSE)₅ detectou carbaril para concentrações abaixo de 10000nM e a plataforma de ZnO foi capaz de detectar concentrações de carbaril acima de 5000 nM, conforme ilustra a Tabela 4.

Se comparada com as plataformas (PEI/PSE)₅, pode-se inferir que a plataforma de ZnO apresenta uma menor sensibilidade para ser usada como biossensor de carbaril.

Tabela 4 – Comparação da porcentagem de inibição entre as plataformas (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e ZnO

Plataformas	[Carbaril]/nM
PEI/PSE/Tirosinase	< 1000
PEI/PSE	< 10000
ZnO	> 5000

Fonte: Elaborada pela autora.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões

Neste trabalho as plataformas PEI/PSE e ZnO produzidas respectivamente, através das técnicas “spin-coating” e eletrodeposição se mostraram adequadas como membranas quimicamente sensíveis em dispositivos amperométricos.

A espectroscopia na região do UV-Vis foi utilizada para caracterizar as soluções de PEI, PSE, catecol e da enzima tirosinase, assim como monitorar o crescimento das multicamadas das plataformas PEI/PSE. A microscopia óptica e a microscopia confocal de varredura a laser serviram para investigar a superfície dessas plataformas, na qual as imagens obtidas mostraram superfícies com a presença de estruturas fibrilares, provavelmente causadas pelo acúmulo do PSE. A AFM mostrou a eficiência da técnica spin-coating na construção desses filmes com rugosidade abaixo de 100 nm. E nos dados obtidos pela espectroscopia PM IRRAS destaca-se que quando o PSE é adsorvido ao filme, ocorre o surgimento de bandas largas, características de proteínas e polissacarídeos.

As plataformas de ZnO tiveram sua estrutura cristalina analisada por meio da difração de raios X (XRD) onde foi observada excelente cristalinidade. A estrutura em forma de plaquetas foi revelada através da microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG-SEM). As micrografias dos filmes de ZnO obtidas por AFM mostraram que a funcionalização com APTES e a imobilização enzimática da tirosinase, alteram a morfologia e a rugosidade dos filmes.

A resposta do sistema para diferentes concentrações de tampão PBS revelou que quanto maior a concentração do tampão, menor a densidade de corrente com a variação do analito.

Os métodos eletroquímicos utilizados demonstraram-se eficientes nos testes de detecção do catecol e do pesticida carbaril. Os limites de detecções para os biossensores de catecol (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e ZnO foram de $(0,207 \pm 0,017) \text{ mol.L}^{-1}$, $(0,135 \pm 0,014) \text{ mol.L}^{-1}$ e $(0,134 \pm 0,015) \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. E o sistema conseguiu quantificar de maneira indireta, porém, eficiente à concentração do pesticida carbaril em amostras padrões, onde as plataformas (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e de ZnO

conseguiram detectar o carbaril para concentrações abaixo de 1000 nM, abaixo de 10000 nM e acima de 5000 nM, respectivamente.

Logo, com o desenvolvimento dessa pesquisa, que é norteada por vários princípios da física, química, matemática, biologia, medicina e ciência e engenharia de materiais, visamos contribuir para o avanço científico e tecnológico do Brasil, uma vez que o processamento desses biossensores como dispositivos compactos, práticos, de baixo custo e de alta sensibilidade na detecção de pesticidas presentes no meio ambiente, pode ser utilizado na realização de pesquisas futuras e até em escala comercial.

5.2 Perspectivas Futuras

Em futuros trabalhos, algumas etapas quanto ao desenvolvimento de biossensores para a detecção de pesticidas necessitam ser estudadas e analisadas mais profundamente, como por exemplo, a construção e a miniaturização do sistema de medida, a flexibilidade da montagem das plataformas em superfícies suportes diferentes, o estudo para a determinação do tempo de incubação do pesticida, a caracterização eletroquímica do biossensor através do tempo de vida do eletrodo, do efeito do pH e da temperatura. Também seria importante a realização de medidas em amostras reais, ou seja, em águas de rios, poços, chuvas contaminadas e do mesmo modo em extratos de alimentos contaminados.

O método utilizado de análise para as duas plataformas se mostrou adequado para a detecção do inseticida carbaril, porém, como a enzima tirosinase pode ser inibida por pesticidas da classe dos carbamatos, seria interessante a realização de medidas de detecção com outros pesticidas dessa classe que estivessem sendo usados nas áreas agrícolas do Brasil.

O polissacarídeo algal (PSE) utilizado nesse trabalho ainda precisa ser mais bem caracterizado, portanto, é de fundamental importância realizar medidas de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e Espectroscopia de Massa, para a elucidação do composto da molécula que o compõe. Como as microalgas fornecem vários tipos de superfícies com propriedades adsorventes, estudar se as plataformas PEI/PSE podem adsorver pesticidas é um dos próximos passos dessa pesquisa.

Por fim, examinar a viabilidade como biossensores para a detecção de pesticidas, os filmes nanoestruturados de (óxido de estanho dopado com flúor) FTO e Au obtidos por litografia de nanoesferas⁹⁰ (pesquisa em andamento).

REFERÊNCIAS

- ¹ DONG, T. et al. Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food samples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 7, p. 1106–1112, 2010.
- ² SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 42, n. 3, p.584-590, set. 2008. doi:10.1590/S0080-62342008000300024. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342008000300024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 jan. 2016.
- ³ STOYTCHIEVA, M. Enzyme vs. bacterial electrochemical sensors for organophosphorus pesticides quantification. In: SOMERSET, V. S. (Ed.). **Intelligent and biosensors**. 2010. p. 217-230. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/6807.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- ⁴ JORSARAEI, S. G. A. et al. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 3, p.838-844, 2014.
- ⁵ CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S. Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 129, n. 1, p. 40-46, 2008.
- ⁶ AZADBAKHT, A. et. al. A label-free aptasensor based on polyethyleneimine wrapped carbon nanotubes in situ formed gold nanoparticles as signal probe for highly sensitive detection of dopamine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 585-593, 2016.
- ⁷ ŞENOL, A. M.; ONGANER, Y.; MERAL, K. An unusual “off-on” fluorescence sensor for iron(III) detection based on fluorescein–reduced graphene oxide functionalized with polyethyleneimine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 343-351, 2017.
- ⁸ BRITO, A. K.; CASELI L.; NORDI, C. S. F. Interaction of algal polysaccharide with lipid Langmuir monolayers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 8, p. 1857-1860, 2011.
- ⁹ MOKARIAN-TABARI, P. et al. Quantitative evaluation of evaporation rate during spin-coating of polymer blend-films: control of film structure through defined-atmosphere solvent-casting. **European Physical Journal E**, v. 33, n. 4, p. 283-289, 2010.
- ¹⁰ MANZANO, C. V. et. al. ZnO morphology control by pulsed electrodeposition. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n.3, p.1502–1508, 2013.
- ¹¹ BRAMHACHARI, P.V.; REDDY D.R.S.; KOTRESHA, D., Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 36-44, 2016.

-
- ¹² ZHAO G., et al. A System for Pesticide Residues Detection and Agricultural Products Traceability Based on Acetylcholinesterase Biosensor and Internet of Things. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 3387-3399, 2015.
- ¹³ TOSCANO, I. A. S. et al. Determinação de carbaril utilizando testes ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e CLAE com detecção por arranjo de diodos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 466-471, 2000.
- ¹⁴ LIU, B.; XIAO, B.; CUI, L. Electrochemical analysis of carbaryl in fruit samples on graphene oxide-ionic liquid composite modified electrode. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, n. 1, p. 14-18, 2015.
- ¹⁵ SÁNCHEZ-BARRAGÁN, I. et al. A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 798-804, 2007.
- ¹⁶ ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, FAPESP, 2002.
- ¹⁷ SCHÖNING, M. J. et al. A capacitive field-effect sensor for the direct determination of organophosphorus pesticides. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 91, n.1-3, p. 92-97, 2003.
- ¹⁸ MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- ¹⁹ HULANICKI, A.; GŁAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p.1247-1250, 1991.
- ²⁰ THEVENOT, D.R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
- ²¹ DESHPANDET, M. V.; AMALNERKAR, D. P. Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers. **Progress in Polymer Science**, v.18, n. 4, p. 623-649, 1993.
- ²² CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.
- ²³ CÖPEL, W. Biossensores: biosensors: theory and applications. **Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium**, v. 41, n. 10, p. 1156-1157, 1983. doi: 10.1002/nadc.19930411023. Disponível em: < <http://onlinelibrary-wiley-com.ez67.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/nadc.19930411023/pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- ²⁴ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 526-549, 2002.
- ²⁵ SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da**

urease em filmes de polipirrol. 2011. 125 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

²⁶ THEÂVENOT, D. R. et. al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p. 2333, 1999.

²⁷ STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.14, n. 2, p.159-173, 2003.

²⁸ FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Revisão biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

²⁹ LEHNINGER, A. L: **Princípios da bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

³⁰ ROSATTO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

³¹ LEHNINGERR, A. L. **Bioquímica 1**. São Paulo: Edgar Blücher, 1976.

³² FISCHER, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzym. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

³³ KOSHLAND, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1958.

³⁴ NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. **Adosorption of invertase**. Journal of the America Chemical Society, v. 38, n. 35, p.1109-1115, 1916.

³⁵ GERARD, M.; MALHOTRA, B.D. Application of polyaniline as enzyme based biosensor. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 2, p.174-177, 2005.

³⁶ KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p.126-139, 2004.

³⁷ KRAJEWSKA, B. Review ureases. II. properties and their customizing by enzyme immobilizations. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.59, n. 1-3, p. 22–40, 2009.

³⁸ SINGH; M. et al. Urea biosensors. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 134, n. 1, p. 345–351, 2008.

³⁹ MASSAFERA. M. P.; TORRESI, S. C. Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: comparing enzyme immobilization methods. **Sensors and actuators B: chemical**, v.137, n. 2, p. 476-482, 2009.

⁴⁰ EFTEKHARI, A. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synthetic Metals**, n. 145, n. 2-3, p.

211-216, 2004.

⁴¹ SUZUKI, H.; KUMAGAI, A. A disposable biosensor employing a glucose-sensitive biochemomechanical gel. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 10, p.1289-1297, 2003.

⁴² YING, L.; KANG, E.T.; NEOH, K.G. Covalent immobilization of glucose oxidase on microporous membranes prepared from poly (vinylidene fluoride) with grafted poly (acrylic acid) side chains. **Journal of Membrane Science**, v. 208, n. 1-2, p. 361-374, 2002.

⁴³ ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 7, p. 699-766, 2004.

⁴⁴ LUPETTI, K. O., RAMOS, L. A., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 197-201, 2003.

⁴⁵ VICENTINI, F.C. et al. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 17-23, 2016.

⁴⁶ GAYATRIDEVI, S. Constitutive and induced polyphenol oxidases of chickpea infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*: Purification and their physiological significance, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 86, p. 73-80, 2014.

⁴⁷ BRAVO, K.; OSORIO, E. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. **Food Chemistry**, v. 197, Part A, p. 185-190, 2016.

⁴⁸ GEORGE, H.L.; CHRISTOFFERSEN, R. E. Differential latency toward (–)-epicatechin and catechol mediated by avocado mesocarp polyphenol oxidase (PPO), **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 31-38, 2016.

⁴⁹ WU, J. et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *agaricus bisporus*. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 7, p. 1483–1493, 2013.

⁵⁰ MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: a review. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2318–2331, 2006.

⁵¹ DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

⁵² OUERTANI, R.; ATRACHE, L. L. E.; HAMIDA, N. B. Chemometrically assisted optimization and validation of reversed phase liquid chromatography method for the analysis of carbamates pesticides. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 154, p. 38-44, 2016. doi:10.1016/j.chemolab.2016.03.016.

⁵³ STENERSEN, J. **Chemical pesticides: mode of action and toxicology**. New York: CRC Press, 2004.

-
- ⁵⁴ MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- ⁵⁵ BACHMANN, T.T. et al. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 3-4, p. 193-201, 2000.
- ⁵⁶ YOUNG NO, H. et al. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of Organophosphate and carbamate pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 1, p. 37-43, 2007.
- ⁵⁷ BESOMBES J.L. et al. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, n. 3, p. 255-263, 1995.
- ⁵⁸ NOTSU, H.; TATSUMA, T. Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, n. 2, p. 379-384, 2004.
- ⁵⁹ DRAGUNSKI, J. C. **Desenvolvimento e aplicações de eletrodos modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas em matrizes de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-14052007-115238/>>. Acesso em: 30 maio 2016.
- ⁶⁰ NI, Y.; CAO, D.; KOKOT, S. Simultaneous enzymatic kinetic determination of pesticides, carbaryl and phoxim, with the aid of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, n. 1, p. 131-139, 2007.
- ⁶¹ BRITO, A. K.; CASELI, L.; NORDI C. S. F. Algal polysaccharides on lipid Langmuir–Blodgett films and molecular effects upon metal ion contact. **Thin Solid Films**, v. 534, p. 312-315, 2013. doi:10.1016/j.tsf.2013.02.009.
- ⁶² ARYA, S. K. et al. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: review. **Analytica Chimica Acta**, v. 737, p. 1-21, 2012. doi:10.1016/j.aca.2012.05.048.
- ⁶³ CHOI, A. et al. ZnO nanowire biosensors for detection of biomolecular interactions in enhancement mode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 148, n. 2, p. 577-582, 2010.
- ⁶⁴ BENSMAINE, S. et al. The effects of the deposition parameters of ZnO thin films on their structural properties. **Journal of Electron Devices**, v. 5, p. 104-109, 2007.
- ⁶⁵ SELEGÅRD, L. et al. Biotinylation of ZnO nanoparticles and thin films: a two-step surface functionalization study. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 7, p. 2128-2135, 2010.

-
- ⁶⁶ WATER, W. et al. Effect of growth temperature on photoluminescence and piezoelectric characteristics of ZnO nanowires. **Materials Science and Engineering B**, v. 158, p. 75-78, 2009.
- ⁶⁷ FISCHER, L. M. et al. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, n. 4, p. 1282-1285, 2009.
- ⁶⁸ STERN, E. **Label-free sensing with semiconducting nanowires**. London: Yale University Press, 2007.
- ⁶⁹ BARIOTO, V. C. R. **Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores**. 2014. 121 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- ⁷⁰ GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl. **Analytica Chimica Acta**, v. 347, n. 1-2, p. 199-205, 1997.
- ⁷¹ TSUTAE, F. M. **Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos de sistemas moleculares, biológicos e celulares**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- ⁷² NORDI, C. S. F.; VIEIRA, A. A. H.; NASCIMENTO, O. R. The metal binding capacity of Anabaena spiroides extracellular polysaccharide: an EPR study. **Process Biochemistry**, v.40, p. 2215-2225, 2005.
- ⁷³ ARAÚJO, F. L. **Estudo das propriedades ópticas e estruturais de polifluorenos por meio de espectroscopia de filmes ultrafinos e de moléculas isoladas**. 2014. 89 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- ⁷⁴ ZERAIK, A.E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.
- ⁷⁵ FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
- ⁷⁶ LIU, Xi. et al. Enzyme-coated single ZnO nanowire FET biosensor for detection of uric acid. **Sensors and Actuators B: chemical**, v.176, p. 22-27, 2013. doi:10.1016/j.snb.2012.08.043.
- ⁷⁷ WILLIAMS, E. H. et al. Immobilization of streptavidin on 4H-SiC for biosensor development. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 16, p. 6056-6063, 2012.
- ⁷⁸ HSIAO, V. et al. Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-functionalized nanoporous polymeric gratings: fabrication and application in biosensing. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, n. 46, p. 4896-4901, 2007.

-
- ⁷⁹ SHAN, C. et al. Polyethyleneimine-functionalized graphene and its layer-by-layer assembly with Prussian blue. **Thin Solid Films**, v. 534, p. 572-576, 2013. doi:10.1016/j.tsf.2013.02.011.
- ⁸⁰ LAKARD, S. et al. Theoretical study of the vibrational spectra of polyethylenimine and polypropylenimine. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 685, n. 1-3, p. 83-87, 2004.
- ⁸¹ BREMER, P. J.; GEESEY, G. G. An evaluation of biofilms development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Biofouling**, v. 3, n. 2, p. 89-100, 1991.
- ⁸² BRAMHCHARI, P. V.; DUBEY, S. K. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 571-577, 2006.
- ⁸³ MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3382-3386, 2009.
- ⁸⁴ ARRUDA, I.G. et al. Self-assembly of SiO₂ nanoparticles for the potentiometric detection of neurotransmitter acetylcholine and its inhibitor. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6658-6661, 2014.
- ⁸⁵ SINGH, S.; JAIN, D. V. S.; SINGLA, M. L. Sol-gel based composite of gold nanoparticles as matrix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 161-169, 2013. doi:10.1016/j.snb.2013.02.111
- ⁸⁶ TANG, L. et al. A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon-Au/l-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. **The Analyst** v. 138, n.12, p. 3552, 2013.
- ⁸⁷ FOSCHINI, M. et al. Electrochemically prepared polypyrrole-2-carboxylic acid films: synthesis protocols and studies on biosensors. **Electroanalysis**, v. 25, n. 3, p. 741-749, 2013.
- ⁸⁸ WANG, M. et al. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 151, p. 191-197, 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.046
- ⁸⁹ GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 7, p. 695-705, 2005.
- ⁹⁰ SPADA, E. R, et al. Homogeneous growth of antidot structures electrodeposited on Si by nanosphere lithography. **Journal of Applied Physics**, v.103, n. 11, p.114306-1 - 114306-5, 2008.