Claudia do Amaral Razzino

Desenvolvimento, caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para
a determinação de carbaril

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos
2007

Dedico,

Aos meus pais José e Maria, em especial à minha mãe.

Ao meu irmão Carlos e à Vívian.

Depois de um tempo você...

Aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai ferí-lo de vez em
quando e você precisa perdoá-la por isso.

Descobre que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você
tem na vida e que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não
significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas
que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso...

William Shakespeare

Dedico também, com toda admiração e saudade,

À querida amiga Karina Nascimento.

Depois de um tempo você...

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, por mais uma etapa cumprida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado pela oportunidade em desenvolver este trabalho, pelos exemplos de paciência, dedicação e profissionalismo, pelas discussões e pela compreensão neste período de convivência.

Ao Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz pelo acolhimento na EMBRAPA/CNPDIA no início deste mestrado e pela solicitude sempre demonstrada.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Avaca e ao Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo.

Ao Sr. João Tiengo pelo profissionalismo, respeito, dedicação e imensurável ajuda prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Marcelo Calegaro pela convivência agradável.

À Dra. Josiane Caetano pela dedicação e ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Djenaine de Souza, por acreditar no meu trabalho, e por estar do meu lado trabalhando num dos momentos mais difíceis.

A todos os amigos e colegas do GMEME, aos que já não são mais do GMEME, aos que estão no coração, aos que torcem por mim, aos que muito ajudaram e ajudam e aos que atrapalharam também, meus sinceros agradecimentos: Alexandra, Andréa, Andressa, Claudia, Eliana, Fabiano, Fernando, Giancarlo, Gustavo, Inês, Juliana, Katlin, Kely, Leandro, Lívia, Maurão, Michele, Milena, Murilo, Osmair, Rafael, Raquel, Renata, Robson, Solange, Soninha e Thiago.

Às amigas Aninha Fornazari e Laís Tereza.

À Helena Racy do Laboratório de Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCAR pela atenção, solicitude e profissionalismo.

Ao Dr. Yves Robert Pierre Maniette do Laboratório de TEM do Instituto de Química da Unesp – Araraquara pela atenção, solicitude, profissionalismo e sugestões de trabalho.

A todos os funcionários e funcionárias do IQSC/USP que colaboram para o bom funcionamento do Instituto, fornecendo toda a infra-estrutura para nossa formação e pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

“Já se disse que as grandes idéias vêm ao mundo mansamente, como pombas. Talvez, então, se ouvirmos com atenção, escutaremos, em meio ao estrépito de impérios e nações, um discreto bater de asas, o suave acordar da vida e da esperança. Alguns dirão que tal esperança jaz numa nação; outros, num homem. Eu creio, ao contrário, que ela é despertada, revivificada, alimentada por milhões de indivíduos solitários, cujos atos e trabalho, diariamente, negam as fronteiras e as implicações mais cruas da história. Como resultado, brilha por um breve momento a verdade sempre ameaçada de que cada e todo homem, sobre a base dos seus próprios sofrimentos e alegrias, constrói para todos...”

Albert Camus

Resumo

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono, tem sido grande o interesse em explorar suas aplicações, e uma delas é a modificação de eletrodos. Muitos trabalhos ilustram as vantagens da aplicação de eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono e enzimas. Estes sistemas apresentam resposta amperométrica elevada, com diminuição nos potenciais de oxidação ou redução do substrato ou produto enzimático, eliminando a resposta de interferentes. Apresentam bons limites de detecção, melhoras na sensibilidade e estabilidade à medida que oferecem um microambiente favorável à atividade da enzima. Todas estas vantagens tornam interessante o emprego de tais biossensores no monitoramento de pesticidas. Diante da escassez de trabalhos que descrevem esta aplicação, neste trabalho, objetivou-se explorá-la, com ganho em sensibilidade pelo uso dos nanotubos de carbono e em seletividade pelo uso das enzimas. Neste trabalho foi desenvolvido um nanobiossensor para a determinação de carbaril em amostras de tomate. Para isto, os nanotubos de carbono utilizados foram tratados quimicamente e em seguida caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão. O eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono foi caracterizado eletroquimicamente e por microscopia eletrônica de varredura. A enzima acetilcolinesterase utilizada teve sua atividade catalítica enzimática determinada pelo método espectrofotométrico. O nanobiossensor teve seus parâmetros de operação otimizados e foi utilizado na determinação de carbaril em amostras de tomate. A avaliação de reprodutibilidade de preparação do nanobiossensor apresentou desvio padrão relativo de 4,02%. Os desvios padrão relativos para a repetibilidade e reprodutibilidade de medidas são, respectivamente, 1,18 e 3,27%. Duas amostras de tomate foram dopadas com 0,500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril, e as respectivas recuperações foram de 96,00 e 95,08%. Os limites de detecção e quantificação obtidos com o nanobiossensor foram $\text{LD} = 8,96 \text{ nmol L}^{-1}$ e $\text{LQ} = 29,9 \text{ nmol L}^{-1}$.

Abstract

Since the discovery of carbon nanotubes, a great interest in exploring their applications has raised, being one of those the modification of electrodes. Many works have shown the advantages of applying glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and enzymes. These systems present elevated amperometric response with decreased potentials of oxidation or reduction of either the substrate or the enzymatic product, eliminating the response of interferences as well. Moreover, these systems present good detection limits, as well as sensibility and stability improvements in consequence of a favorable microenvironment for the enzyme action. All these advantages make interesting the employment of such biosensors in pesticides monitoring. Due to the scarcity of works describing this kind of application, the aim of this work is its exploration, focusing on sensibility increasing caused by the use of carbon nanotubes, as well as selectivity increasing caused by the use of enzymes. In this work a nanobiosensor was developed to carbaryl determination in tomato samples. For this, the employed carbon nanotubes were chemically treated before their characterization by transmission electron microscopy. The glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes was characterized both electrochemically and by scan electron microscopy. The employed acetylcholinesterase enzyme had its enzymatic activity measured by spectrophotometric means. The nanobiosensor had its operational parameters optimized and it was employed in the determination of carbaryl in tomato samples. The reproducibility of the nanobiosensor preparation was 4.02%. The relative standard deviation for the repeatability and reproducibility were, respectively, 1.18 and 3.27%. Two tomato samples were spiked with $0.500 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $6.00 \mu\text{mol L}^{-1}$ of carbaryl, and their respective recoveries were 96.00 and 95.08%. The detection and quantitation limits obtained with the developed nanobiosensor were, respectively, 8.96 and 29.9 nmol L^{-1} .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do Carbaril.....	3
Figura 2: Gráfico de V em função de [S], para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten.	11
Figura 3: Mecanismo de hidrólise da ACh pelas ChEs [22].	17
Figura 4: Mecanismo de inibição de ChEs por IOF [22].	18
Figura 5: Mecanismo de inibição de ChEs por IC [22].	19
Figura 6: (A) Estrutura em rede laminar, (B) modelo de um SWCNT e (C) modelo de um MWCNT.....	23
Figura 7: Conformações de um SWCNT. (A) Armchair, (B) Chiral e (C) Zigzag.	23
Figura 8: Imagens de TEM dos MWCNTs (A, C e E) antes do tratamento e (B, D e F) após tratamento.	47
Figura 9: Intensidade das correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função do tempo em que a suspensão de MWCNTs permaneceu sob agitação ultrasônica.	49
Figura 10: Intensidade de correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função da quantidade de MWCNTs aplicadas na superfície do eletrodo.	50
Figura 11: Imagens de SEM – FEG do (A) eletrodo de GC e do (B, C e D) eletrodo de GC modificado com MWCNTs.	52
Figura 12: Perfil voltamétrico do eletrodo de GC (—) e GC/MWCNTs (—) em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	53
Figura 13: Absorbância do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato produzido de acordo com a reação 4, em função do tempo da reação, para um tempo de 2 horas a uma temperatura de 37°C e em comprimento de onda de 412 nm	54
Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada dos eletrodos de (A) GC e (B) GC/MWCNTs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$. Voltamogramas da oxidação do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$ (C) no eletrodo de GC e (D) no eletrodo GC/MWCNTs.	55

Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em função da concentração do substrato ASChI em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, com adições de 0,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ .	56
Figura 16: (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, em função do tempo de reação. (B) Corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do tempo.	57
Figura 17: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, em diferentes potenciais com o (A) nanobiossensor e com o (B) eletrodo GC/MWCNTs. Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado com o (C) nanobiossensor e com o (D) eletrodo GC/MWCNTs.	58
Figura 18: Variação da corrente limite de difusão da tiocolina em função do tempo, em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, no potencial de 300 mV.	59
Figura 19: (A) Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, no potencial de 300 mV, em diferentes temperaturas. Variação da corrente obtida no tempo de 200 s (B) em função da temperatura e (C) em função do pH.	61
Figura 20: Correntes de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, no potencial de 300 mV, para um tempo de 200 s, em função da quantidade de enzima imobilizada no eletrodo GC/MWCNTs.	62
Figura 21: Correntes de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 3,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, no potencial de 300 mV, para um tempo de 200 s, em função da porcentagem de glutaraldeído aplicado sobre o nanobiossensor.	63
Figura 22: Resposta amperométrica do nanobiossensor para adições de 0,5 mM do substrato ASChI em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0, no potencial de 300 mV. Inserção: Respectivas correntes em função do aumento da concentração do substrato ASChI.	65
Figura 23: Efeito do tempo de incubação na resposta do nanobiossensor para 20,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0.	67

Figura 24: (A) Resposta amperométrica do nanobiossensor para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,0 a 6,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0.	68
Figura 25: Resposta amperométrica do nanobiossensor em (—) substrato ASChI 6,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 8,0 (—) após imerso na matriz por 10 min e (—) após imerso na matriz, por 10 min, contaminada com 3,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril.....	70
Figura 26: Curva de recuperação para a amostra de tomate dopada com 0,5x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Culturas que utilizam o inseticida carbaril, seus respectivos LMRs e ISs...	4
Tabela 2. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	35
Tabela 3. LD e LQ obtidos com biossensores amperométricos e por HPLC.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina (*Acetylcholine*)

AChE – Acetilcolinesterase (*Acetylcholinesterase*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASChI – Iodeto de Acetiltiocolina (*Acetylthiocholine Iodide*)

BOD – Bilirrubina Oxidase (*Bilirubin Oxidase*)

ChE – Colinesterase (*Cholinesterase*)

CNT – Nanotubo de Carbono (*Carbon Nanotube*)

CV – Voltametria Cíclica (*Cyclic Voltammetry*)

DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano [1,1,1-tricloro-2-bis(*p*-clorofenila)-etano]

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)

GC – Carbono Vítreo (*Glassy Carbon*)

HOPG – Grafite Pirolítica Altamente Organizada (*Highly Ordered Pyrolytic Graphite*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HRP – Horseradish Peroxidase

IC – Inseticidas Carbamatos

IOF – Inseticidas Organofosforados

IS – Intervalo de Segurança

IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LD – Limite de Detecção

LDH – Lactato Dehidrogenase (*Lactate Dehydrogenase*)

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LQ – Limite de Quantificação

MWCNT – Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas (*Multi-Walled Carbon Nanotube*)

OPH – Organofosforados Hidrolase (*Organophosphorus Hidrolase*)

PAM – 2-Pyridinealdoxime methiodide

PDDA – Cloreto de Poli Dialil Dimetil Amônio (*(Poly Diallyl Dimethyl Ammonium chloride)*)

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy*)

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas

SWCNT – Nanotubo de Carbono de Parede Única (*Single-Walled Carbon Nanotube*)

SWV – Voltametria de Onda Quadrada (*Square Wave Voltammetry*)

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy*)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Carbaril.....	3
1.2. Detecção de pesticidas e seus resíduos	4
1.3. Biossensores.....	6
1.3.1. Enzimas	9
1.3.2. Cinética da reação enzimática.....	10
1.3.3 Imobilização da enzima	15
1.4. Biossensores amperométricos para a determinação de inseticidas carbamatos e organofosforados	16
1.5. Nanotubos de Carbono.....	21
1.6. Síntese Bibliográfica	27
2. Objetivos	34
3. Procedimento Experimental	35
3.1. Reagentes	35
3.2. Soluções	36
3.3. Instrumentação utilizada.....	37
3.4. Modificação do eletrodo de GC com MWCNTs	39
3.4.1. Tratamento para purificação, “quebra” e funcionalização dos MWCNTs.....	39
3.4.2. Preparação da suspensão de MWCNTs	40
3.4.3. Limpeza, condicionamento e recobrimento do eletrodo de GC	40
3.5. Determinação da atividade catalítica enzimática	41
3.6. Imobilização da enzima.....	42
3.7. Otimização dos parâmetros necessários à aplicação do nanobiossensor	43
3.8. Determinação do pesticida carbaril	44
3.8.1. Determinação do tempo de incubação	44
3.8.2. Reativação do eletrodo	44
3.8.3. Construção da curva analítica	45
3.8.4. Recuperação.....	46
4. Resultados e Discussão	47
4.1. Caracterização microscópica dos MWCNTs submetidos a tratamento para purificação, “quebra” e funcionalização.....	47
4.2. Preparação da suspensão de MWCNTs.....	48
4.2.1. Otimização do tempo de ultrassom	48

4.3. Recobrimento do eletrodo de GC.....	50
4.3.1. Otimização da quantidade de MWCNTs.....	50
4.4. Caracterização microscópica do eletrodo de GC modificado com MWCNTs	51
4.5. Caracterização voltamétrica do eletrodo de GC modificado com MWCNTs	52
4.6. Atividade catalítica enzimática.....	53
4.7. Determinação do potencial de trabalho do nanobiossensor	55
4.8. Otimização dos parâmetros necessários à aplicação do biossensor	60
4.8.1. Efeito do pH e temperatura da solução	60
4.8.2. Quantidade da enzima imobilizada no eletrodo modificado	62
4.8.3. Porcentagem de glutaraldeído	63
4.8.4. Concentração do substrato	64
4.8.5. Reprodutibilidade de preparação do nanobiossensor	65
4.8.6. Tempo de vida, repetibilidade e reprodutibilidade de medida do nanobiossensor	66
4.10. Determinação de carbaril.....	67
4.10.1 Tempo de incubação e reativação do eletrodo.....	67
4.10.2. Curva Analítica	68
4.10.3. Recuperação do Carbaril	69
5. Conclusões	72
5.1. Perspectivas futuras	73
6. Referências Bibliográficas	74

1. Introdução

De acordo com a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer peste, incluindo vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou a animais domésticos, espécies indesejáveis de plantas ou animais que possam interferir na produção, processamento, armazenamento, transporte ou estocagem de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos derivados de madeira. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores do crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes e produtos que previnem o amadurecimento prematuro de frutas [1].

Os pesticidas são utilizados pelos seres humanos para prevenir a perda de produtividade em suas atividades agrícolas desde aproximadamente 500 a.C. Basicamente, são utilizados na agricultura com três objetivos: obtenção de grandes produções com altas produtividades, boa qualidade dos produtos e redução do trabalho e gastos com energia [2].

O primeiro pesticida conhecido foi o enxofre, e por volta do século XV começaram a ser utilizados elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio no combate a pragas em colheitas. No século XVII, o sulfato de nicotina foi extraído das folhas de tabaco para ser usado como pesticida. Já no século XIX, houve a introdução de dois novos pesticidas: um derivado do *Chrysanthemum cinerariaefolium* da família asteraceae, e o *rotenone* que é derivado de raízes de legumes tropicais. A era dos modernos pesticidas sintéticos se iniciou em 1939, quando Paul Müller descobriu as propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), o qual se tornou o pesticida mais usado no mundo, até a

descoberta dos danos que ele causa à biodiversidade. Desde a década de 50 o uso de pesticidas dobrou e cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são utilizadas todos os anos. Entretanto, o uso de pesticidas deve ser moderado e feito com alguns cuidados, se não, pode causar a contaminação e desertificação do solo. Pode levar à degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, ocasionando desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação dos lençóis freáticos; sendo muito grande o risco de contaminação dos alimentos. Estudos indicam que a exposição a pesticidas está associada, a longo prazo, com vários problemas de saúde como: dificuldades respiratórias, problemas de memória, de pele, câncer, depressão, etc [3].

É muito grande e crescente o número de formulações de pesticidas lançados no mercado. No Brasil, das centenas de formulações registradas, a grande maioria é utilizada como inseticidas e acaricidas. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG), até outubro de 2006, o número de formulações à base de inseticidas-acaricidas em linha de comercialização no Brasil, era de 280 formulações para cerca de 89 princípios ativos [4].

Os inseticidas-acaricidas podem ser classificados em função de suas características químicas em: organofosforados, derivados do ácido carbâmico (carbamatos), organoclorados, piretróides, formamidinas, dinitrofenóis e inorgânicos. Os carbamatos são substâncias altamente eficientes com ação praguicida e inseticida. Suas principais características são: alta atividade inseticida, baixa ação residual (devido à instabilidade química das moléculas) e baixa toxicidade a longo prazo (se comparada à dos derivados fosforados) [5].

Os principais inseticidas carbamatos utilizados no Brasil são: aldicarb, carbaril, carbofuran, metomil, pirimicarb e propoxur [4].

1.1. Carbaril

As marcas comerciais do carbaril (1-naftil-N-metilcarbamato) são Carbaryl[®], Carbaryl Fersol[®], Ravyon[®] e Sevin[®].

O carbaril é um inseticida de contato com propriedades sistêmicas, da classe toxicológica II (altamente tóxico). É um sólido branco, cristalino, de odor característico, com P.F de 142°C e pressão de vapor de $5,3 \times 10^{-8}$ atm a 25°C. É solúvel em solventes orgânicos e ligeiramente solúvel em água (0,1% a 20°C), hidrolizável em pH alcalino e compatível com outros inseticidas em misturas. Sua fórmula estrutural é apresentada na figura 1.

Figura 1: Fórmula estrutural do Carbaril.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o carbaril é utilizado em 14 culturas, com aplicação foliar. A tabela 1 [6] apresenta as culturas, seus respectivos limites máximos de resíduos (LMRs) permitidos e intervalos de segurança (IS – Intervalo de tempo entre a última aplicação e a colheita).

Tabela 1. Culturas que utilizam o inseticida carbaril, seus respectivos LMRs e ISs.

Cultura	LMR (mg/Kg)	IS (dias)
Abacaxi	0,50	07
Abóbora	0,10	03
Algodão	0,05	15
Alho	0,20	14
Banana	0,20	14
Batata	0,10	30
Cebola	0,10	14
Couve-Flor	0,02	14
Feijão	0,50	03
Maçã	2,00	07
Pastagens	100,00	05
Pepino	0,02	03
Repolho	0,20	14
Tomate	0,10	03

Diante do exposto acima, há a necessidade de um monitoramento freqüente dos pesticidas, de seus derivados e produtos de degradação, a fim de preservar a qualidade de vida dos seres vivos e o meio ambiente.

1.2. Detecção de pesticidas e seus resíduos

As técnicas analíticas padrão para a detecção de pesticidas são as cromatográficas (cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), gasosa e de camada delgada). Tais técnicas quando aplicadas na análise de matrizes complexas como alimentos ou solos, são geralmente executadas em laboratórios especializados e exigem uma rotina complexa de pré-tratamento da amostra. A metodologia de preparação das amostras demanda, muitas vezes, a manipulação de

uma quantidade não desprezível de solventes tóxicos, resultando em grande tempo de análise, alto custo e riscos à saúde humana. Desta forma, as análises cromatográficas são limitadas a laboratórios, tornando inviável seu emprego para determinações rápidas em campo; o que estimula a procura de novos métodos analíticos, simples e sensíveis, com análise em tempo real, produzidos e operados a baixo custo.

Uma alternativa importante é o uso de técnicas eletroanalíticas. Estas relacionam medidas de quantidades elétricas, como corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos; possibilitam, na maioria das vezes, a análise direta da amostra sem a necessidade de pré-tratamentos e podem ser empregadas na análise de materiais coloridos e com partículas dispersas sólidas, como amostras complexas biológicas e ambientais. Mesmo que sejam necessárias separações prévias (pré-tratamento), estas são mais simplificadas, de menor custo e menor tempo, quando comparadas às metodologias de preparação das amostras cromatográficas [7].

Em geral, as técnicas eletroanalíticas são menos seletivas e sensíveis (sensibilidade pode variar de alguns ppb ou mesmo até vários ppm) que as cromatográficas, mas são mais rápidas e baratas. Além disso, permitem estudos dos processos de degradação de pesticidas e a avaliação dos mecanismos de redução e/ou oxidação eletroquímica, permitindo verificar a formação de produtos intermediários tóxicos, ao homem e ao ambiente [2, 7].

O eletrodo de mercúrio é o mais versátil e utilizado para a detecção de pesticidas em diferentes matrizes, mas é limitado à redução (intervalo de potenciais positivos), não é muito seletivo e é um metal de elevada toxicidade.

Uma alternativa à utilização do eletrodo de mercúrio é o emprego de eletrodos quimicamente modificados com enzimas, chamados de biossensores.

Eletrodos quimicamente modificados são obtidos pela imobilização de grupos funcionais, incorporação de catalisadores inorgânicos e biológicos (enzimas e anticorpos), deposição de filmes poliméricos, modificação com sílica e deposição de membranas, a fim de conferir ao eletrodo modificado o comportamento do reagente modificador. Tais alterações da superfície do eletrodo possibilitam controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do eletrodo base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para diferentes aplicações analíticas. As modificações, entre outras vantagens, podem facilitar as reações de transferência de elétrons, tornar a superfície do eletrodo mais estável ou atuar como membranas de permeação seletivas; fazendo do eletrodo quimicamente modificado um eletrodo mais seletivo, sensível e estável [7, 8].

1.3. Biossensores

Sensor químico é um dispositivo que transforma (converte) a informação química, decorrente de uma reação ou propriedade química do sistema investigado, em um sinal analiticamente útil; ou seja, que possa ser lido por um dispositivo digital ou por um microprocessador. De modo geral, um sensor químico contém dois componentes básicos conectados em série: um químico (fase sensora ou sistema de reconhecimento, onde ocorre a interação com o analito) e um físico-químico (transdutor, que converte uma variação ocorrida em um sinal mensurável). Biossensores são sensores químicos onde o sistema de reconhecimento é um

componente biológico e o transdutor converte um sinal biológico em sinal elétrico, térmico ou ótico [9-11]. A importância do componente biológico é que sua interação com o substrato/analito é altamente específica, evitando assim a interferência de outras substâncias. Pode catalisar uma reação que envolva um substrato ou pode ligar-se seletivamente a um substrato [12].

No biossensor o transdutor converte uma variação observada em um sinal mensurável, normalmente um sinal eletrônico cuja magnitude é proporcional à concentração de uma substância química específica ou combinação de substâncias químicas. O biossensor combina a especificidade e sensibilidade dos sistemas biológicos com a versatilidade dos microprocessadores. Sua característica mais importante é a seletividade (habilidade para discriminar entre diferentes substratos), função do componente biológico, embora algumas vezes a operação do transdutor contribua para a seletividade. É impossível generalizar sobre a categoria da substância a ser determinada por um biossensor. Virtualmente qualquer substância que é consumida ou produzida em um processo bioquímico pode em princípio ser analisada por um biossensor se o mesmo puder ser construído [12].

Biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do transdutor em: eletroquímicos (potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e baseados em carga iônica ou efeito de campo), óticos, piezoelétricos, térmicos ou de superfície de ondas acústicas [11, 12].

E podem ser classificados também, de acordo com o analito ou de acordo com as reações que eles monitoram. Deve-se diferenciar claramente entre os de monitoramento direto do analito ou da atividade biológica e os de monitoramento direto de inibidores. A principal aplicação dos biossensores é no monitoramento direto de analitos. No entanto, deve-se estar atento que o mesmo biossensor pode

ser uma ferramenta útil para monitoramento direto da atividade da enzima ou de células vivas, medindo continuamente ou sequencialmente a produção ou consumo de um determinado composto. Alternativamente, biossensores foram desenvolvidos para monitoramento indireto de pesticidas orgânicos ou substâncias inorgânicas (metais pesados, fluoreto, cianeto, etc.) que inibem as propriedades biocatalíticas do biossensor [11].

Os primeiros biossensores eram frequentemente chamados eletrodos enzimáticos e o primeiro foi descrito por Clark e Lyons (1962) para a determinação de glicose. O primeiro biossensor amperométrico foi desenvolvido por Updike e Hicks (1967) para a detecção de glicose usando a enzima glicose oxidase acoplada a um eletrodo para oxigênio de Clark [10, 12].

Biossensores amperométricos são baseados na medida da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas. As medidas são executadas mantendo-se o potencial constante do eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência. A corrente resultante é diretamente proporcional à concentração da espécie eletroativa ou à sua taxa de produção ou consumo dentro da camada biocatalítica adjacente. Como as reações biocatalíticas escolhidas são freqüentemente de primeira ordem, dependem da concentração do analito no seio da solução, as correntes de estado estacionário também são proporcionais à concentração do analito no seio da solução [11].

Nos biossensores amperométricos o acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo pode ser realizado por diferentes mecanismos [13]:

1. Pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração). A desvantagem destes biossensores é a aplicação de altos potenciais onde ocorre as reações de oxidação ou redução do substrato ou produto

enzimático. Em altos potenciais, geralmente, há a influência de interferentes na resposta do biossensor. Esta desvantagem levou ao uso de mediadores que facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo, o que deu origem aos biossensores de segunda geração;

2. Pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração);

3. Pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração).

A sensibilidade necessária de um biossensor é inferior a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em casos especiais pode chegar a $10^{-17} \text{ mol L}^{-1}$ [14, 15]. A exatidão é em torno de $\pm 5\%$. Condições como pH, temperatura e força iônica influenciam no desempenho do biossensor e devem ser consideradas. O tempo de resposta (em torno de 30s) é usualmente muito maior que com sensores químicos. O tempo de recuperação, tempo que leva para que o biossensor esteja pronto para a análise da próxima amostra, é de alguns minutos. E o tempo de vida do biossensor é usualmente determinado pela estabilidade do material biológico, podendo variar de alguns dias a meses [12].

Enzimas são um dos componentes biológicos mais utilizados na elaboração de biossensores, embora microorganismos, organelas celulares, partículas e tecidos de plantas ou animais também sejam usados.

1.3.1. Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam as reações necessárias à manutenção da vida e assim como as outras proteínas, são constituídas de cadeias

de aminoácidos. As enzimas diferem das outras proteínas por apresentarem uma área específica da sua estrutura, conhecida como sítio ativo, o qual ativa a catálise. A molécula sobre a qual a enzima atua é o substrato que se transforma em produto da reação. Na ausência de enzima pouco produto (ou nenhum) é formado. Mas em presença da enzima a reação se processa em alta velocidade. As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima, reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada sítio ativo, é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que se ligam ao substrato por ligações não-covalentes [16, 17].

A efetividade de uma enzima como catalisador é denominada atividade enzimática. Esta está estritamente relacionada com o formato tridimensional da proteína, particularmente do sítio ativo.

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) a classificação das enzimas envolve uma divisão em seis grupos principais de acordo com o tipo de reações que elas catalisam: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

1.3.2. Cinética da reação enzimática

Para muitas enzimas, a velocidade de catálise V varia com a concentração do substrato $[S]$, como mostrado na figura 2.

Figura 2: Gráfico de V em função de [S], para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten.

V é definido como o número de moléculas formadas por segundo. A uma concentração fixa da enzima, V é quase linearmente proporcional a [S], quando [S] é pequena. A uma [S] alta, V é quase independente de [S]. Um modelo proposto por Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913, é o mais simples para explicar as propriedades cinéticas de muitas enzimas. Segundo o modelo,

uma enzima E se combina com S para formar um complexo ES, com uma constante de velocidade k_1 . O complexo pode se dissociar em E e S com constante de velocidade igual a k_2 , ou pode formar o produto P com constante de velocidade igual a k_3 . Em uma reação enzimática típica,

$$v_1 = k_1 \times [E] \times [S] \quad (2)$$

$$v_2 = k_2 \times [ES] \quad (3)$$

$$v_3 = k_3 \times [ES] \quad (4)$$

onde $k_1 > k_2 > k_3$, V é igual a v_3 , etapa mais lenta e limitante do processo. E as taxas de quebra (V_q) e formação (V_f) de ES são dadas por,

$$V_f \text{ de ES} = v_1 = k_1 \times [E] \times [S] \quad (5)$$

$$V_q \text{ de ES} = v_2 + v_3 = (k_2 + k_3) \times [ES] \quad (6)$$

Durante os tempos considerados iniciais da reação, $[ES]$ mantém-se constante, com o estabelecimento de um equilíbrio estacionário. As V_f e V_q de ES são, portanto, iguais ($v_1 = v_2 + v_3$). Então, tem-se,

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_2 + k_3) \times [ES] \quad (7)$$

rearranjando,

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1}} \quad (8)$$

A equação 8 é simplificada definindo-se uma nova constante, k_m , constante de Michaelis,

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (9)$$

E a equação 8 se torna,

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{k_m} \quad (10)$$

[E] será a concentração de enzima livre; ou seja, a diferença entre a concentração adicionada (concentração total = E_T) e a concentração de ES (quantidade de enzima ligada ao substrato). Substituindo esse valor de [E] na equação 10, temos:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \times [S]}{k_m} \quad (11)$$

Resolvendo a equação 11 para [ES], temos que:

$$[ES] = [E_T] \times \frac{[S]}{[S] + k_m} \quad (12)$$

Como $V = v_3$, pela aplicação da equação 12 em 4, obtém-se:

$$V = k_3 \times [E_T] \times \frac{[S]}{[S] + k_m} \quad (13)$$

A velocidade $V_{m\acute{a}x.}$ é obtida quando os centros catalíticos da enzima estão saturados com o substrato, ou seja, quando [S] é muito maior que k_m , de tal forma que $[S] / ([S] + k_m)$ se aproxime de 1. Assim,

$$V_{m\acute{a}x.} = k_3 \times [E_T] \quad (14)$$

Aplicando-se a equação 14 na equação 13, tem-se a equação de Michaelis-Menten.

$$V = V_{\text{máx.}} \times \frac{[S]}{[S] + k_m} \quad (15)$$

Esta equação explica os dados cinéticos da figura 2. Em concentração muito baixa de substrato, quando $[S]$ é muito menor do que k_m , a velocidade é diretamente proporcional à concentração do substrato. Em concentração muito alta do substrato, quando $[S]$ é muito maior do que k_m , a velocidade é máxima, independente da concentração do substrato. k_m é igual à concentração do substrato na qual a velocidade de reação é metade da sua velocidade máxima [18].

Da equação 14 podemos afirmar que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima. Esta proporcionalidade facilita a determinação da atividade de uma enzima [19].

Em um biossensor, a enzima deve ser imobilizada de forma a manter sua atividade. Elas têm sido ligadas covalentemente em suportes sólidos ou têm sido encapsuladas em géis e membranas para tornarem-se reutilizáveis e para reduzir o custo das análises.

Para se obter um biossensor com boa sensibilidade e estabilidade operacional, a enzima deve estar adequadamente ligada ao transdutor para facilitar a transferência de elétrons (no caso de transdutores eletroquímicos). Portanto, a imobilização da enzima sobre o transdutor é uma das etapas mais importantes na preparação de um biossensor [9].

1.3.3 Imobilização da enzima

Componentes biológicos como enzimas, anticorpos, células ou tecidos, com atividade biológica alta, podem ser imobilizado em finas camadas na superfície de um transdutor utilizando-se diferentes procedimentos. Os procedimentos mais usados na construção de biossensores são [9, 10, 20]:

- 1. Encapsulação:** uma solução contendo a enzima é confinada em uma membrana permeável ao analito, um filme fino sobre o detector eletroquímico;
- 2. Adsorção:** a imobilização é por interações de Van der Waals ou ligações de hidrogênio entre o suporte e a enzima. Os adsorventes mais utilizados são o quartzo, vidro, carvão, sílica gel, celulose e resinas de troca iônica, onde a enzima em solução aquosa é colocada em contato com a superfície adsorvente.
- 3. Oclusão:** a imobilização acontece durante o processo de reticulação de um polímero (agar, carragenatos, poliacrilamida, álcool polivinílico). A rede polimérica forma espaços vazios dentro dos quais a enzima fica livre na solução.
- 4. Ligação covalente cruzada:** reagentes bi ou multifuncionais como glutaraldeído, 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno, hexametil-diisocianato, 2,4-biscloroeto sulfonil fenol, etc.; são empregados tanto para imobilizar como para estabilizar enzimas imobilizadas por adsorção ou oclusão.
- 5. Ligação covalente:** envolve a formação de ligação covalente entre grupos funcionais da enzima e o suporte. Por exemplo, glutaraldeído se liga aos grupos NH_2 livres da enzima e de um suporte que também contenha grupos NH_2 (esferas de vidro, membranas de colágeno, etc.).

1.4. Biossensores amperométricos para a determinação de inseticidas carbamatos e organofosforados

A determinação de pesticidas por biossensores enzimáticos é baseada na catálise ou na inibição da atividade da enzima por tais produtos. No caso dos biossensores de inibição, a escolha da enzima é feita com base no mecanismo do efeito tóxico dos pesticidas nos seres vivos. Colinesterases (ChEs) sanguíneas são inibidas por inseticidas organofosforados (IOF) e inseticidas carbamatos (IC). As ChEs promovem a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, conforme a reação [21]:

Os efeitos tóxicos da exposição à IOF e IC se manifestam devido à inibição de ChEs presentes nos sistemas nervosos simpáticos, parassimpáticos e central. Como consequência haverá um acúmulo de ACh nas terminações nervosas, desencadeando uma síndrome com sinais e sintomas gerados pela estimulação excessiva dos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos.

Efeitos musculares: aumento de secreções, broncoconstrição, miose, diarreia, bradicardia, incontinência urinária.

Efeitos nicotínicos: taquicardia, hipertensão, fasciculações musculares, tremores, fraqueza muscular.

Efeitos no sistema nervoso central: inquietação, labilidade emocional, ataxia, letargia, confusão mental, perda de memória, fraqueza generalizada, convulsão, coma, cianose.

Apesar de apresentarem mecanismos de ação semelhantes, IC inibem a enzima reversivelmente, e os IOF inibem irreversivelmente, gerando, assim, um quadro de intoxicação mais grave e de difícil tratamento.

As ChEs possuem dois sítios de ação: um sítio aniônico e um esterásico. O sítio aniônico liga-se ao nitrogênio da ACh, carregado positivamente, enquanto que no sítio esterásico há uma hidroxila de um resíduo do aminoácido serina, que se liga covalentemente à carboxila da ACh. Após a ligação, ocorre a liberação de colina e a inclusão de água, com liberação de ácido acético, figura 3.

Figura 3: Mecanismo de hidrólise da ACh pelas ChEs [22].

Os IOF inibem a enzima ligando-se aos seus sítios esterásicos. Neste caso, o átomo de fósforo do composto liga-se à hidroxila do resíduo do aminoácido serina do referido sítio. Porém, a liberação do sítio pelo grupo derivado do ácido fosfórico é

muito lenta, e o sítio esterásico fica ocupado por muito tempo, não podendo receber ACh, figura 4.

Figura 4: Mecanismo de inibição de ChEs por IOF [22].

Em virtude da ligação covalente entre a enzima e o IOF, podem ocorrer dois outros fenômenos: a etapa Nº 3, com liberação do sítio ativo da enzima (a qual ocorre muito lentamente), ou a etapa Nº 4, que é extremamente rápida e forma um complexo muito estável. Portanto, esta reação é praticamente irreversível.

Na inibição da enzima pelos IC ocorre a ligação entre a hidroxila do resíduo de serina e o carbono do grupo amida da molécula do inseticida, figura 5. Porém a liberação do sítio de ação ocupado é muito mais rápida que no caso dos IOF [23].

Figura 5: Mecanismo de inibição de ChEs por IC [22].

Vários biossensores de inibição e não inibição, baseados na imobilização da enzima acetilcolinesterase (AChE) ou organofosforados hidrolase (OPH) sobre vários transdutores eletroquímicos ou óticos, foram propostos para análise em campo. Embora biossensores baseados na não inibição da OPH forneçam determinação direta (OPH catalisa a hidrólise de IOF, resultando em espécies eletroativas, como o *p*-nitrofenol), a OPH não está comercialmente disponível em quantidades que favoreçam aplicações difundidas [24].

Nos biossensores que usam a AChE, um éster de tiocolina, como a acetiltiocolina, é utilizado como substrato. Acetiltiocolina é hidrolisada enzimaticamente pela AChE em tiocolina, a qual é oxidada a potencial constante, de acordo com as reações:

A corrente resultante da oxidação da tiocolina é proporcional à concentração do inibidor da AChE.

Biossensores baseados na oxidação eletroquímica da tiocolina produzida devido à hidrólise catalisada pela AChE do éster de tiocolina, acetiltiocolina, são preferidos pela simplicidade inerente e robustez do sistema [25]; embora uma variedade de enzimas como a OPH, fosfatase alcalina, ascorbato oxidase, tirosinase e ácido fosfatase sejam empregadas na preparação de biossensores de pesticidas [26].

Ao contrário dos biossensores de substrato, a especificidade das enzimas para inibidores não permite usualmente a determinação de compostos separados. Além da presença de inibidores, a resposta do biossensor depende de outras espécies presentes na amostra que afetam a sensibilidade do biossensor de inibição. Os inibidores de AChE compreendem os IOF e IC, sais de metais pesados, surfactantes não iônicos, fármacos (drogas que contém nitrogênio com atividade anticolinesterase, antagonista), fluoreto, azida- N_3 (sais de ácido hidrazóico) [21].

O método de fabricação de um biossensor ideal deveria empregar condições químicas moderadas, permitir que grandes quantidades de enzima sejam imobilizadas, fornecer um microambiente favorável para manter a atividade da enzima e uma grande área de superfície para o contato enzima-substrato dentro de um volume total pequeno. Barreiras para o transporte de massa do substrato e produtos deveriam ser minimizadas, e um sistema quimicamente e mecanicamente robusto deveria ser alcançado [24]. Sabe-se que compostos contendo tióis sofrem processos de oxidação eletroquímica em eletrodos sólidos, mas a oxidação ocorre a potenciais relativamente altos (0,7 V), o que causa alta corrente de fundo e interferência de outros compostos eletroativos. E que enzimas redox normalmente

têm dificuldade em efetuar a transferência de elétrons direta na superfície dos eletrodos convencionais devido às estruturas tridimensionais e a proteção dos centros ativos redox pela camada de proteína [27]. Para resolver o problema de oxidação da tiocolina em eletrodos convencionais, mediadores como ftalocianina de cobalto (II), azul da Prússia e tetracianoquinodimetano, oxidação do substrato, detecção eletroquímica pulsada, uso de eletrodos de mercúrio, derivatização, entre outros métodos têm sido usados [24]. Além disso, vários artigos publicados têm demonstrado que nanotubos de carbono promovem reações de transferência eletrônica em baixos sobrepotenciais, fornecem microambiente favorável para manter a atividade da enzima e aumentam a área eletroativa do eletrodo [28-30].

1.5. Nanotubos de Carbono

Durante vários séculos, o diamante e a grafite eram os únicos materiais conhecidos formados somente por carbono [31]. Em 1985, os cientistas descobriram que átomos de carbono também podiam se organizar no espaço como bolas – os fulerenos [32].

Seis anos mais tarde apareceram os nanotubos de carbono (CNTs). CNTs de paredes múltiplas (MWCNTs) foram sintetizados pela primeira vez em 1991 pelo microscopista eletrônico japonês Sumio Iijima [33], usando o processo de pirólise de grafite em plasma sob atmosfera controlada de hélio, método este utilizado para produção de fibras de carbono e fulerenos. Em 1993 CNTs de parede única (SWCNTs) foram sintetizados com o uso de catalisadores metálicos no método do arco elétrico [34-36].

Desde então numerosas pesquisas têm sido feitas tentando elucidar o mecanismo de formação dos CNTs. Em 2005, uma equipe de pesquisadores dos Estados Unidos, França e Brasil, formulou uma teoria para explicar o surgimento das estruturas dos CNTs quando criadas pelo método do arco elétrico, o mesmo empregado para produzir os primeiros CNTs em 1991. Os nanocilindros de grafite, estruturas sólidas, são formados a partir de “gotas” de carbono geradas a temperaturas muito altas. A teoria se aplica apenas às fibras de moléculas de carbono produzidas pelo antigo método do arco elétrico [37].

CNTs são estruturas tubulares, fechadas nas extremidades, de diâmetros nanométricos e relativamente compridas, tendo uma razão comprimento/diâmetro elevada [36].

O elemento carbono possui três formas alotrópicas conhecidas: o diamante, a grafite e os fulerenos. Na grafite os átomos de carbono estão organizados em hexágonos; ou seja, ocupam posições como se estivessem sobre os vértices de um hexágono, numa estrutura em rede laminar, com espessura de um átomo, e estas lâminas estão dispostas umas sobre as outras como num maço de folhas de papéis. Nos CNTs a estrutura em rede laminar esta enrolada sobre si mesma, e suas extremidades fechadas. No fulereno, a estrutura em rede laminar tem a forma de uma bola de futebol. CNTs podem ser considerados fulerenos alongados [31, 38] e podem ser de parede única (SWCNTs); ou seja, uma única lâmina enrolada sobre si mesma. Ou de paredes múltiplas (MWCNTs), diversas estruturas laminares concêntricas, espaçadas uma das outras por aproximadamente $3,4 \text{ \AA}$, um valor um pouco maior que o valor do espaçamento na grafite $3,35 \text{ \AA}$, figura 6. Iijima, descobridor dos CNTs, atribui esta diferença à combinação das curvaturas tubulares e às interações de Van der Waals entre os sucessivos cilindros [31, 33].

Figura 6: (A) Estrutura em rede laminar, (B) modelo de um SWCNT e (C) modelo de um MWCNT.

Dependendo de como a estrutura em rede laminar esta enrolada sobre si mesma, têm-se três diferentes tipos de SWCNTs: com geometria “armchair”, “zigzag” ou “chiral”. Na conformação armchair, duas ligações C–C em lados opostos de cada hexágono estão perpendiculares ao eixo do tubo, enquanto que na conformação zigzag estas ligações estão paralelas ao eixo do tubo. Nas conformações quirais, que são conformações intermediárias entre a armchair e a zigzag, os ângulos entre as ligações e o eixo do tubo variam entre valores menores que 90° e maiores que 0° [31], figura 7.

Figura 7: Conformações de um SWCNT. (A) Armchair, (B) Chiral e (C) Zigzag.

SWCNTs e MWCNTs podem ser sintetizados por diferentes métodos, sendo que cada método apresenta vantagens e desvantagens. Estes métodos são: pirólise de eletrodos de grafite em atmosfera controlada de hélio (método utilizado por Sumio Iijima quando da descoberta dos CNTs), síntese catalítica [39] usando metais de

transição sobre suportes de sílica, alumina e também sobre zeólitas Y [40], β [41] e ZSM-5 [42], deposição de vapor químico (CVD) [7], decomposição de monóxido de carbono em altas pressões e altas temperaturas (o chamado processo HiPCO) [43], e erosão a laser [44]. Todos estes métodos apresentam o mesmo problema, a produção de carbono amorfo e a presença inevitável de partículas metálicas oriundas dos catalisadores [45], sendo necessário processos de purificação do CNTs produzidos.

A diferença nos parâmetros estruturais (parede única ou múltiplas, diâmetro, comprimento, geometria, etc.) confere diferentes propriedades aos CNTs. As propriedades eletrônicas dos MWCNTs perfeitos são semelhantes às propriedades dos SWCNTs, por causa do fraco acoplamento entre os cilindros de carbono concêntricos [45]. Cálculos teóricos indicam que CNTs do tipo armchair são metálicos, enquanto que os zigzag e chiral podem ser metálicos ou semicondutores [31, 45].

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é empregada no estudo da morfologia dos CNTs e na detecção de partículas metálicas incorporadas aos CNTs. Para caracterização podem ser usadas as técnicas de caracterização textural, determinação de área superficial (BET), adsorção/dessorção em temperaturas programadas (TPA/TPD) e porosimetria. O comportamento térmico pode ser estudado por técnicas termogravimétricas como TGA e DSC. Dentre as técnicas espectroscópicas empregadas na caracterização, a espectroscopia Raman é das mais valiosas; permite a diferenciação entre nanotubos, grafite e carbono amorfo. Bandas originadas por estruturas ordenadas relacionadas à CNTs perfeitos e bandas originadas por estruturas desordenadas relacionadas a CNTs defeituosos e a carbono não-cristalino são visualizadas. A razão entre estas bandas reflete a

proporção de CNTs perfeitos numa determinada amostra. A ressonância paramagnética eletrônica em onda contínua ou pulsada, é usada na quantificação de defeitos, tanto intrínsecos à estrutura dos CNTs (elétrons localizados) como extrínsecos, relacionados com a presença de carbono não cristalino (elétrons deslocalizados). A espectroscopia de refletância no infravermelho é usada na caracterização dos CNTs em amostras tratadas quimicamente, onde grupos funcionais podem estar ancorados em diferentes sítios, tanto internos como externos dos CNTs. A microscopia eletrônica de varredura (SEM) é comumente usada em análises prévias, na verificação dos arranjos dos CNTs sobre o suporte e, através da técnica de EDX, para o mapeamento dos diferentes componentes metálicos [45].

Como visto anteriormente todos os métodos de síntese dos CNTs apresentam o problema da produção de carbono amorfo e da presença inevitável de partículas metálicas oriundas dos catalisadores [45], sendo necessário o desenvolvimento de métodos adequados para retirar estas impurezas das amostras. Hoje já se produz separadamente SWCNTs e MWCNTs; no entanto, a síntese isolada de CNTs condutores ainda não é possível. Também não é possível ainda separar CNTs que apresentam as mesmas propriedades. Alguns laboratórios nos Estados Unidos começaram a estudar alternativas para viabilizar este tipo de separação, como a IBM que desenvolveu um processo que destrói os CNTs condutores e preserva os CNTs semicondutores que são usados em transistores. Para que os CNTs possam ser utilizados em escala comercial é necessário controlar muito bem o processo de síntese destes materiais e desenvolver uma tecnologia confiável e de baixo custo, com a qual se possa produzir o material em quantidade e segundo especificações pré-determinadas, controlando parâmetros como o comprimento, diâmetro, cristalinidade, etc. [31, 36].

CNTs têm encontrado várias aplicações, entre elas: ponteiros para microscopia de varredura por sonda, como transistores de efeito de campo, retificadores eletrônicos, eletrodos para supercapacitores e como sensores [46].

A primeira aplicação dos CNTs para biossensores foi proposta em 1996 por Britto et al. [47]. Desde então, CNTs vêm sendo usados para preparar diversos biossensores. CNTs podem aumentar a eficiência das interações eletrodo/proteína, resultando em correntes faradaicas muito mais altas.

CNTs têm elevada razão área superficial em relação à massa, alta condutividade elétrica, boa estabilidade química e resistência mecânica e conferem aos eletrodos modificados maior área eletroativa, promovem reações de transferência de elétrons a baixos sobrepotenciais, melhoram a reversibilidade de alguns processos, permitem melhor imobilização da enzima facilitando o acesso ao sítio ativo da mesma e aumentam a razão sinal/ruído.

Como os MWCNTs são compostos de grafite pirolítica altamente organizada (HOPG), a estrutura do corpo do nanotubo (parede) é semelhante ao plano basal da HOPG, e as terminações dos CNTs são semelhantes à extremidade da HOPG. Banks et al. [48] relatou que as extremidades de um eletrodo de HOPG exibem propriedades eletrocatalíticas para compostos contendo tióis, como a homocisteína, N-acetilcisteína, cisteína e glutatona, por conta de suas boas condutividade elétrica e cinética de transferência de elétrons. Então, as extremidades abertas dos CNTs deveriam ter rápida taxa de transferências de elétrons, semelhante à extremidade de um eletrodo de HOPG, enquanto no corpo do nanotubo a taxa de transferência de elétrons é muito mais lenta, como nos eletrodos de carbono vítreo e no plano basal da HOPG [49].

Mais vantagens da aplicação dos CNTs ainda não foram completamente exploradas por causa da dificuldade em se obter CNTs dispersos; embora os CNTs sejam solubilizados por meio da funcionalização de suas paredes [50].

O processo de oxidação usado para purificação dos CNTs, principalmente para remover metais de catalisadores e carbono amorfo, também resulta na oxidação parcial dos átomos de carbono por produzir grupos contendo oxigênio (por exemplo, grupos ácidos carboxílicos), especialmente nas extremidades abertas dos CNTs. Estes grupos produzidos são negativamente carregados em solução aquosa e podem interagir com polieletrólitos carregados positivamente. Além disso, o tratamento ácido encurta os comprimentos dos CNTs, assim os CNTs são imobilizados mais facilmente e ficam mais estáveis na superfície do eletrodo [51].

Após a imobilização dos CNTs sua orientação na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GC) é desordenada, e os CNTs podem interagir fisicamente com o GC por interações de Van der Waals [52].

1.6. Síntese Bibliográfica

Esta revisão apresenta uma visão geral dos trabalhos desenvolvidos com eletrodos de GC modificados com CNTs e enzimas.

Yamamoto et al. [53] desenvolveram biossensores baseados na modificação de eletrodos de GC com MWCNTs e as enzimas “horseradish” peroxidase (HRP), glicose oxidase e lactato oxidase para a detecção de H_2O_2 , glicose e lactato, respectivamente. O eletrodo GC/MWCNTs/HRP exibe excelente resposta da corrente de redução para a determinação de H_2O_2 a um potencial de -300 mV (vs. $E_{Ag/AgCl}$). A corrente de pico aumenta linearmente com o aumento da

concentração de H_2O_2 em uma faixa de $3,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção é de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Operando a -300 mV a interferência de ácido ascórbico, ácido úrico e outras substâncias eletroativas é eliminada. Os biossensores apresentaram excelente estabilidade e reprodutibilidade em um sistema de análise em fluxo, sendo promissores para emprego em análises on line.

Dai e Shiu [54] desenvolveram um biossensor amperométrico para glicose baseado na modificação de eletrodos de GC com MWCNTs. A enzima glicose oxidase foi co-imobilizada na superfície do eletrodo de GC modificado com MWCNTs por deposição eletroquímica de um filme de poli(o-fenilenodiamina). Foi observado um aumento do comportamento de eletroredução catalítica do oxigênio na superfície do eletrodo GC/MWCNTs a um potencial de -400 mV (vs. $E_{\text{Ag/AgCl}}$) em meio neutro. A resposta amperométrica para a glicose foi determinada a um potencial de -300 mV por medidas da redução do oxigênio dissolvido consumido na reação enzimática. Interferentes como ácido ascórbico, 4-acetamidofenol e ácido úrico não apresentaram resposta. A faixa linear para determinação da glicose se estende a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção estimado em $0,03 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Gan et al. [46] realizaram um estudo eletroquímico de SWCNTs como ativadores em reações catalisadas por enzimas. Cronoamperometria baseada no conceito da camada controle de difusão de sistemas convectivos foi usada para analisar a atividade da lactato desidrogenase (LDH) em eletrodos de GC modificados e não modificados com filme de SWCNTs. Foram monitorados os efeitos do íon lantânio, ácido oxálico e nicotina na atividade da LDH. Análise dos resultados experimentais revelam que os SWCNTs podem aumentar a atividade da LDH. A ativação e inibição foram caracterizadas por três variáveis: pela real velocidade inicial da reação (V_0), pela velocidade máxima da reação ($V_{\text{máx.}}$)

catalisada pela enzima e pela constante de Michaelis-Menten (k_m). Imagens de microscopia de força atômica (AFM) no modo contato e espectroscopia Raman demonstraram que SWCNTs podem interagir com a enzima LDH enquanto o eletrodo GC/SWCNTs estiver sob potencial controlado. Neste caso, a ativação dos SWCNTs foi atribuída à interação SWCNTs-enzima.

Wang, Kawde e Jan [55] desenvolveram um biossensor baseado na modificação de eletrodos de GC com MWCNTs e a enzima fosfatase alcalina para aumentar a sensibilidade e estabilidade de bioensaios eletroquímicos de detecção dos produtos fenólicos da hibridização do DNA. Os sinais amplificados refletem a acumulação interfacial dos produtos fenólicos da fosfatase alcalina na camada de MWCNTs. Medidas cronoamperométricas (feitas após curtos períodos de acumulação) oferecem substancial aumento na resposta do α -naftol gerado enzimaticamente. As vantagens desse biossensor são ilustradas pela comparação com o eletrodo de GC não modificado.

Rochette et al. [50] construíram um biossensor para putrescina baseado na modificação de um eletrodo de GC com MWCNTs dispersos em cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA) e a enzima putrescina oxidase. A camada de MWCNTs permite melhor imobilização da enzima com melhor acesso ao sítio ativo da mesma e facilita a transferência de elétrons. Esta permite a detecção da putrescina a potenciais negativos, evitando a interferência dos ácidos úrico e ascórbico endógenos. Comparados com os das espécies interferentes mais comuns, como a espermina, espermidina, cadaverina e histamina, um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e uma resposta 20 vezes maior foram encontrados para a putrescina. Testes executados em protoplasma de ratos cancerosos demonstraram

que a detecção de putrescina pode ser feita muito depressa em protoplasma mamífero sem purificação prévia.

Wang et al. [56] estudaram a eletroquímica da microperoxidase-11 (MP-11) por voltametria cíclica com um eletrodo de GC modificado com MWCNTs. O filme de MWCNTs apresentou boa atividade para a oxidação/redução da MP-11 devido à melhor condutividade. Um par de picos bem definidos foram obtidos para a MP-11 adsorvida no filme de MWCNTs. Este eletrodo modificado pode ser usado em biossensores e células biocombustíveis para estudar a eletroquímica de sistemas biológicos com economia, simplicidade e caracterização conveniente.

Salimi, Noorbakhsh e Ghadermarz [57] investigaram o comportamento eletroquímico da catalase imobilizada sobre um filme de MWCNTs em GC. O eletrodo modificado apresenta voltamogramas cíclicos diretos e quase reversíveis. A constante de velocidade de transferência de elétrons do par redox Fe(III)/Fe(II) foi observada ser muito mais rápida que no eletrodo não modificado. A catalase manteve suas propriedades catalíticas no filme de MWCNTs em uma ampla faixa de pH. O eletrodo pode ser usado como um biossensor para a redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio. A diminuição significativa dos potenciais para a redução do oxigênio e do peróxido de hidrogênio, combinada com a boa estabilidade e tempo de resposta rápido dos filmes, sugere que o eletrodo poderia ser útil para aplicações práticas na construção de biossensores sem qualquer mediador de transferência de elétrons.

Wang, Liu e Lin [58] descrevem um biossensor amperométrico para colina baseado na interação eletrostática entre o arranjo bi-enzima colina oxidase (ChO) e HRP sobre os MWCNTs em um eletrodo de GC. Este biossensor para colina foi fabricado pela imobilização de uma camada catiônica de PDDA sobre o filme de

MWCNTs carregado negativamente e camadas de enzimas sobre o PDDA. Devido ao efeito eletrocatalítico dos CNTs, as medidas de respostas faradaicas resultantes da reação enzimática são realizadas a baixos potenciais com sensibilidade aceitável. O tempo de resposta para esse biossensor é de alguns segundos. A faixa linear de detecção é de $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Tkac, Whittaker e Ruzgas [59] descrevem um biossensor para galactose baseado na imobilização da enzima galactose oxidase sobre um eletrodo de GC modificado com SWCNTs dispersos em quitosana. O biossensor apresenta-se robusto para a detecção de oxigênio a -400 mV e quando aplicado em um sistema de análise em fluxo obteve-se um limite de detecção de $25,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Este biossensor oferece detecção com RSD de 2% e quando aplicado à detecção de galactose em amostras de sangue apresentou recuperação entre 101,2 e 102,7%.

Weigel, Tritscher e Lisdat [60] estudaram as reações de transferência de elétrons direta da bilirubina oxidase (BOD) em um eletrodo de GC modificado com MWCNTs. A redução bioeletrocatalítica do oxigênio foi investigada por voltametria de varredura linear com a BOD em solução, adsorvida e covalentemente ligada aos MWCNTs. O eletrodo GC/MWCNTs aumenta em 26 vezes o sinal da redução do oxigênio comparado ao sinal do eletrodo de GC. A detecção do oxigênio é possível com quantidades muito pequenas da enzima. O eletrodo GC/MWCNTs/BOD com a enzima ligada covalentemente resulta em robustez, alta reprodutibilidade e atividade comparadas com a enzima em solução.

Apesar de várias aplicações empregando eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono e enzimas estarem disponíveis, no caso da

determinação de pesticidas com tais biossensores, apenas três exemplos encontram-se disponíveis.

Liu e Lin [24] descrevem a alta sensibilidade em um sistema de análise em fluxo de um biossensor amperométrico para pesticidas organofosforados baseado na imobilização da AChE sobre a superfície de um eletrodo de GC modificado com CNTs. A AChE é imobilizada na superfície carregada negativamente do CNTs pela alternância entre camadas de PDDA e AChE. A estrutura (PDDA/AChE/PDDA) provê um microambiente favorável à bioatividade da AChE. A atividade eletrocatalítica dos CNTs melhora a detecção eletroquímica do produto tiocolina enzimaticamente gerado, em um baixo sobrepotencial (150 mV), com alta sensibilidade e estabilidade. O biossensor foi utilizado para detectar paraoxon a concentrações de $0,4 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ com tempo de inibição de 6 min., com boa precisão, reprodutibilidade e estabilidade.

Deo et al. [61] empregaram a enzima OPH imobilizada sobre WMCNTs como biossensor para a determinação de pesticidas organofosforados. O transdutor, neste caso, detectava a presença do *p*-nitrofenol gerado pela ação da enzima. Os autores propuseram que, sob condições otimizadas, o biossensor mediu $0,15 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de paraoxon e $0,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de paration metílico, com sensibilidades de 25 e 6 nA/μM, respectivamente.

Liu et al. [49] usaram um eletrodo de GC modificado com MWCNTs para aumentar a sensibilidade das medidas eletroquímicas da tiocolina enzimaticamente gerada. Voltametria cíclica e características cronoamperométricas dos eletrodos de GC/MWCNTs, GC, pasta de carbono e outro foram comparadas. A camada de MWCNTs aumenta a detecção anódica da tiocolina a um baixo sobrepotencial de 150 mV com alta sensibilidade. O eletrodo GC/MWCNTs apresentou um limite de

detecção de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Este é aumentado em 16 vezes se a análise for realizada com injeção em fluxo ao invés de agitação da solução. A alta sensibilidade na detecção da tiocolina fornece base para a preparação de biossensores baseados em MWCNTs e na enzima AChE para a determinação de pesticidas organofosforados.

A revisão bibliográfica ilustra as vantagens da aplicação dos eletrodos de GC modificados com CNTs e enzimas. Estes sistemas apresentam resposta amperométrica elevada, com diminuição nos potenciais de oxidação ou redução do substrato ou produto enzimático, eliminando a resposta de interferentes. Apresentam bons limites de detecção, melhora na sensibilidade e estabilidade à medida que oferecem um microambiente favorável à atividade da enzima. Todas estas vantagens tornam interessante o emprego de tais biossensores no monitoramento de pesticidas. Diante da escassez de trabalhos que descrevem esta aplicação, faz-se necessário explorá-la, com ganho em sensibilidade pelo uso dos CNTs e em seletividade pelo uso das enzimas.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é desenvolver um nanobiossensor enzimático, mais sensível pelo uso de CNTs e seletivo pelo uso da enzima AChE, para a determinação de carbaril. O eletrodo de CG modificado com CNTs e a enzima AChE será caracterizado por técnicas eletroquímicas e microscópicas. A atividade da enzima será avaliada por UV-Vis. O nanobiossensor, depois de caracterizado e com os parâmetros de aplicação otimizados, será utilizado na determinação de carbaril em amostra de tomate. Os resultados serão comparados com os já obtidos com um biossensor de pasta de carbono e com HPLC [62].

3. Procedimento Experimental

3.1. Reagentes

Tabela 2. Procedência e pureza dos reagentes utilizados

Material	Procedência	Pureza (%)
Acetilcolinesterase de eritrócitos bovino (0,26 U mg ⁻¹ do sólido liofilizado)	Sigma	*****
Iodeto de Acetilcolina	Sigma	98,00
Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas	Aldrich	95,00
Ácido Clorídrico	J. T. Baker	37,2
Ácido Sulfúrico	Mallinckrodt	97,99
Ácido Nítrico	Qhemis	65,00
Dimetilformamida (DMF)	J. T. Baker	99,90
Hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado	Merk	99,00
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro	J. T. Baker	99,60
Fosfato de Sódio Monobásico	Mallinckrodt	98,00
Carbaril	Bayer	99,30
Glutaraldeído 25%	Sigma	*****
Acetonitrila	J. T. Baker	99,90
Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB)	Aldrich	99,00
Álcool Etílico Absoluto Anidro (Etanol)	J. T. Baker	99,90
Bicarbonato de Sódio	Merk	99,50
Alumina	Buehler [®]	*****
1 µm, 0,3 µm e 0,05 µm	Micropolish [®]	*****

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

Todo o material de vidro e Teflon[®] utilizado no desenvolvimento do trabalho foi lavado com água e detergente, enxaguado exaustivamente, fervido e armazenado em solução de ácido nítrico 10% por no mínimo 30 min. Antes de ser utilizado era novamente enxaguado com água ultrapura.

Soluções de HCl 6,0 mol L⁻¹ e sulfonítrica (3:1, v/v) foram utilizadas nas etapas de purificação, “quebra” e funcionalização dos MWCNTs.

No polimento dos eletrodos de GC utilizou-se suspensão de alumina 1 μm, 0,3 μm e 0,05 μm. Medidas de voltametria cíclica (CV) para assegurar a limpeza da superfície dos eletrodos de GC foram feitas em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Para recobrimento dos eletrodos de GC utilizou-se uma suspensão de 1 mg de MWCNTs tratados em 1mL de DMF. Medidas de CV para caracterização voltamétrica do eletrodo de GC modificado com MWCNTs (GC/MWCNTs) foram feitas em solução de hexacianoferrato (II) de potássio 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹.

Foram preparadas soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ nos diferentes pHs 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0.

Solução de DTNB 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol·L⁻¹, pH=7,0 com a adição de 7,5 mg de bicarbonato de sódio, solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ASChI) 1,7x10⁻² mol L⁻¹ e solução da enzima AChE 4,5 mg mL⁻¹ preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH=8,0 foram utilizadas nas análises de UV-Vis para avaliar a atividade da enzima.

Para imobilização da enzima utilizou-se soluções preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,0$ nas concentrações de $0,04$ e $0,07 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$.

Soluções de glutaraldeído $0,05$; $0,1$; $0,5$ e 1% foram empregadas para avaliar qual a melhor porcentagem a ser utilizada.

Soluções do substrato ASChI utilizadas nas medidas eletroquímicas foram preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,0$. Utilizou-se solução estoque de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ nas medidas de variações de concentração. Soluções de $3,0$ e $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diretamente na célula eletroquímica em 20 mL do tampão.

As soluções de substrato e a solução da enzima para recobrimento do eletrodo não foram armazenadas, sendo preparadas na hora de serem utilizadas.

Soluções estoque de carbaril $0,05$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em acetonitrila. Estudos preliminares feitos por Dragunski [62] demonstram que a quantidade de acetonitrila utilizada nas células de incubação deve ser inferior a 15% do volume total, a fim de não interferir na resposta do biossensor. A solução do pesticida carbaril utilizada na concentração de $20,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,0$ foi preparada a partir da solução estoque $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções de carbaril nas concentrações de $0,5$ a $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,0$ foram preparadas a partir da solução estoque $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Instrumentação utilizada

Foram utilizadas micropipetas de volume variável Eppendorf Research® com ponteiros esterilizáveis.

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204.

As soluções tiveram seus valores de pH ajustados em um pH-metro Qualxtron modelo 8010.

A oxidação dos MWCNTs foi feita em um forno da EDG Equipamentos modelo FV-2 com controlador EDGCON 3P.

Para tratamento dos MWCNTs e preparo da suspensão foram utilizados os equipamentos Ultrasom Chubby e Ultrasom MaxiClean 1450 da Unique, frequência de 25KHz.

As imagens de TEM foram feitas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM200 no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão do Instituto de Química da Unesp, Araraquara – SP.

Os eletrodos de GC foram polidos em politriz Panambra Struers modelo DPU-10 a 600 rpm com feltro Buehler®.

As imagens de SEM foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura XL Series Philips modelo XL 30 FEG no Laboratório de Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos – SP.

As análises de UV-Vis foram feitas em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G da Varian, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, no Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12/30 da Autolab®. Para medidas CV utilizou-se uma célula convencional de vidro Pyrex®, com compartimento único de 25 mL, com

tampa de Teflon[®] contendo orifícios de encaixe para três eletrodos e para a entrada e saída de N₂ para desaeração. Medidas de voltametria de onda quadrada (SWV) e de cronoamperometria foram feitas utilizando-se uma célula com camisa, para controle da temperatura, com os mesmos parâmetros da especificada acima. Para o controle da temperatura utilizou-se um banho ultratermostato da Nova Ética, modelo 521/2D.

Os eletrodos consistem de um eletrodo de GC (4,5 mm de diâmetro) embutido em Teflon[®] utilizado como eletrodo de trabalho, um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como referência e um eletrodo de platina como auxiliar.

As amostras foram centrifugadas em uma Centrífuga de Bancada Excelsa[®] II Modelo 206 BL da FANEM[®].

3.4. Modificação do eletrodo de GC com MWCNTs

3.4.1. Tratamento para purificação, “quebra” e funcionalização dos MWCNTs

Em um cadinho de porcelana adicionou-se 100 mg de MWCNTs. Os MWCNTs foram oxidados, em forno sob fluxo de O₂, a 400 °C por 30 min para remover partículas de carbono amorfo.

Em temperatura ambiente, em um béquer de 200 mL, os MWCNTs oxidados foram dispersos em 60 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹ e submetidos à agitação ultrasônica por 4 horas para eliminar óxidos dos catalisadores do processo de síntese. Em seguida, foram filtrados em membrana de 45 µm e enxaguados com água ultrapura até o pH da solução se tornar neutro [63].

Em temperatura ambiente, em um béquer de 200 mL, os MWCNTs purificados foram dispersos em uma mistura de 10 mL de HNO_3 concentrado e 30 mL de H_2SO_4 concentrado e submetidos à agitação ultrasônica por 6 horas para serem “cortados” e funcionalizados. Em seguida, foram filtrados em membrana de 45 μm e enxaguados com água ultrapura até o pH da solução se tornar neutro. Os MWCNTs foram guardados em dessecador por 12 horas [64].

Os MWCNTs assim tratados foram caracterizados por TEM.

3.4.2. Preparação da suspensão de MWCNTs

Em um microtubo safe-lock Eppendorf® de 2 ml contendo 1 mg de MWCNTs tratados foi adicionado 1 mL de DMF. Esta mistura foi submetida à agitação ultrasônica para se obter uma suspensão. Otimizou-se este tempo de ultrasom variando-se de 15 min a 2 horas e verificou-se não ser necessário a aplicação de um tempo superior a 15 min.

3.4.3. Limpeza, condicionamento e recobrimento do eletrodo de GC

O eletrodo de GC foi polido em politriz com alumina 1 μm , 0,3 μm e 0,05 μm . Em seguida, para remover partículas de alumina, foi submetido à agitação ultrasônica por 5 min em água purificada, 5 min em etanol e mais 5 min em água purificada. Para assegurar a limpeza da superfície do eletrodo, o eletrodo foi submetido à aplicação de -2 V por 30 s, ciclado 10 vezes entre 0 e 1 V a 1 V s^{-1} e 2 vezes a 50 mV s^{-1} em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Como o perfil voltamétrico apresentou-se satisfatório, sem a presença de impurezas, o eletrodo foi ciclado 10 vezes entre os

Em duas cubetas adicionou-se 3 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH=8,0, 20 µL de solução do substrato ASChI e 100 µL de DTNB. Na cubeta do compartimento da amostra adicionou-se 25 µL de solução da enzima e obteve-se a curva de absorbância em função do tempo, para um tempo de 2 horas a uma temperatura de 37°C.

A atividade catalítica enzimática foi calculada utilizando-se a equação 16 [67] juntamente com os dados de absorbância e tempo obtidos da curva mencionada acima:

$$Z/m = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t \times v \times \rho} \quad (16)$$

onde Z/m é a atividade catalítica enzimática expressa em U g⁻¹ do sólido liofilizado; ΔA a variação da absorbância; V o volume do ensaio (L); ε o coeficiente de absorção do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (1,36 mmol⁻¹ mm⁻¹); d o caminho ótico (mm); Δt a variação do tempo (min.); v o volume da amostra utilizado no ensaio (L) e ρ a concentração da amostra utilizada no ensaio (g L⁻¹).

Uma unidade de enzima (U) hidrolisa 1 µmol de substrato por minuto.

3.6. Imobilização da enzima

Preparou-se uma solução com 20 mg de enzima em 280 µL de tampão fosfato 0,1 mol·L⁻¹, pH = 8,0. Aplicou-se 20 µL dessa solução sobre o eletrodo GC/MWCNTs e aguardou-se secar por cerca de 30 min. Aplicou-se 10 µL de solução de glutaraldeído 0,1% sobre a enzima e aguardou-se mais 30 min. O eletrodo seco foi armazenado por 12 horas em congelador, enxaguado e utilizado.

3.7. Otimização dos parâmetros necessários à aplicação do nanobiossensor

A determinação dos potenciais de oxidação do substrato ASChI e da tiocolina foi feita por SWV. Os parâmetros utilizados na SWV foram: amplitude de pulso (a) de 50 mV, incremento (ΔE_s) de 2 mV e frequência (f) de 50 s⁻¹.

Inicialmente determinou-se o potencial de oxidação do substrato ASChI em uma solução 3,0x10⁻³ mol L⁻¹ utilizando-se o eletrodo GC/MWCNTs (sem enzima).

O potencial de trabalho do nanobiossensor (potencial de oxidação da tiocolina), foi determinado em solução do substrato ASChI com concentração inicial de 0,5x10⁻³ mol L⁻¹.

Avaliou-se a oxidação da tiocolina em função do tempo com o nanobiossensor enzimático em solução do substrato ASChI 3,0x10⁻³ mol L⁻¹. Após 540 min de reação, medidas de cronoamperometria com o nanobiossensor foram feitas em diferentes potenciais e comparadas às feitas com o eletrodo GC/MWCNTs (sem enzima).

Determinado o potencial de trabalho, por medidas de cronoamperometria, com tempo de análise de 240 s, em solução do substrato ASChI 3,0x10⁻³ mol L⁻¹, observou-se a variação na corrente limite de difusão de oxidação da tiocolina e o efeito do pH e da temperatura no desempenho do nanobiossensor. O pH foi variado de 7,0 a 9,0. Em todos os pHs variou-se a temperatura de 20 a 45 °C.

Por medidas de cronoamperometria, com tempo de análise de 240 s, em solução do substrato ASChI 3,0x10⁻³ mol L⁻¹, pH=8,0 e temperatura de 37 °C, a quantidade de enzima foi variada de 0,01 a 0,06 U e a porcentagem de glutaraldeído de 0,05 a 1%.

Otimizados todos os parâmetros, avaliou-se a melhor concentração do substrato a ser utilizada a partir de uma concentração inicial de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Foram avaliados os parâmetros tempo de vida, repetibilidade e reprodutibilidade do nanobiossensor.

3.8. Determinação do pesticida carbaril

As medidas cronoamperométricas, com tempo de análise de 240 s, no potencial de 300 mV, foram realizadas a 37 °C, em 20 mL de solução do substrato ASChI $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH=8,0.

3.8.1. Determinação do tempo de incubação

Inicialmente determinou-se o tempo de incubação do nanobiossensor, tempo que o nanobiossensor deve ficar imerso na solução do pesticida antes das medidas cronoamperométricas. O nanobiossensor foi imerso em 10 mL de solução de carbaril $20,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ por diferentes tempos, de 5 a 30 min. Após imerso na solução do pesticida, foi enxaguado e inserido na célula eletroquímica para as medidas cronoamperométricas.

3.8.2. Reativação do eletrodo

Regeneração é uma das chaves no desenvolvimento de biossensores de inibição. Diferentes métodos de reativação têm sido utilizados, como a simples lavagem do biossensor com tampão, incubação em reagentes de regeneração como

a pralidoxima (PAM) e a imersão em altas concentrações do substrato. Neste trabalho a regeneração foi obtida pela permanência do eletrodo, após cada medida, por 5 min na célula eletroquímica com o substrato.

3.8.3. Construção da curva analítica

Determinado o tempo de incubação, construiu-se a curva analítica para a determinação do carbaril, variando-se a concentração do mesmo de 1,0 a $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Depois de imerso por 10 min em diferentes concentrações do pesticida, o nanobiossensor foi enxaguado e inserido na célula eletroquímica para medidas cronoamperométricas. O eletrodo foi regenerado a cada medida.

Construiu-se a curva analítica da porcentagem de inibição (%I) em função da concentração do pesticida. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando-se a equação 17 juntamente com as correntes dos amperogramas obtidas no tempo de 200 s:

$$\%I = \frac{i_0 - i_1}{i_0} \times 100 \quad (17)$$

onde i_0 e i_1 são as respectivas correntes medidas antes e após a inibição.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se a equação 18:

$$LD = \frac{3 \times S_B}{b} \quad (18)$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes de 10 brancos, obtidas de cronoamperogramas feitos a 300 mV, e b o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando-se a equação 19:

$$LQ = \frac{10 \times S_B}{b} \quad (19)$$

3.8.4. Recuperação

A recuperação do carbaril para o tomate utilizando-se o nanobiossensor foi realizada após uma extração simples. Triturou-se um tomate, dividiu-se a amostra em duas partes e uma das partes foi centrifugada por 15 min a 3600 rpm. Após a obtenção do sobrenadante, o nanobiossensor foi imerso nesta solução por 10 min, enxaguado e inserido na célula eletroquímica para a obtenção do cronoamperograma a fim de avaliar a influência da matriz na determinação do carbaril nesta amostra.

A outra parte da amostra foi novamente dividida em duas e fortificadas com $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril, que é o LMR do carbaril para o tomate, e $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A cada parte adicionou-se 625 μL de acetonitrila, misturou-se bem e deixou-se em repouso por 20 min. As misturas foram centrifugadas por 15 min a 3600 rpm. Após a obtenção do sobrenadante, o nanobiossensor foi imerso nestas soluções por 10 min, separadamente, enxaguado e inserido na célula eletroquímica para a obtenção dos cronoamperogramas.

As curvas de recuperação foram feitas em triplicata pelo método das adições padrão.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização microscópica dos MWCNTs submetidos a tratamento para purificação, “quebra” e funcionalização

Pelas imagens da figura 8 podemos observar o efeito do tratamento nos MWCNTs.

Figura 8: Imagens de TEM dos MWCNTs (A, C e E) antes do tratamento e (B, D e F) após tratamento.

Os MWCNTs tiveram seus comprimentos reduzidos, o que facilita a disposição da suspensão de MWCNTs sobre a superfície do eletrodo durante a modificação, produzindo um filme mais homogêneo e mais estável.

Pesquisas demonstraram que a extremidade da HOPG tem excelente atividade eletrocatalítica para compostos contendo tióis [48, 68]. MWCNTs são compostos de HOPG, a parede do CNT é similar ao plano basal da HOPG e a extremidade aberta do CNT é similar à extremidade da HOPG. Assim, a “quebra”, abertura das extremidades e a inserção de defeitos nas paredes dos MWCNTs aumentam a taxa de transferência de elétrons dos CNTs, o que confere ao eletrodo modificado com CNTs maior sensibilidade.

O tratamento também resulta na oxidação parcial dos átomos de carbono, produzindo grupos (por exemplo, ácidos carboxílicos) carregados negativamente que aumentam a interação dos CNTs com o solvente. A suspensão preparada com MWCNTs tratados permanece estável por meses, enquanto que na suspensão preparada com MWCNTs não tratados, os mesmos se aglutinam tão logo cesse a agitação.

4.2. Preparação da suspensão de MWCNTs

4.2.1. Otimização do tempo de ultrassom

De acordo com a literatura, o tempo que os MWCNTs são submetidos à agitação ultrasônica para formação da suspensão é muito variável. No intuito de avaliar se esse tempo influencia na resposta do eletrodo modificado, variou-se o tempo de 15 min a 2 horas.

A figura 9 mostra a intensidade das correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função do tempo em que a suspensão de MWCNTs permaneceu sob agitação ultrasônica.

Figura 9: Intensidade das correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função do tempo em que a suspensão de MWCNTs permaneceu sob agitação ultrasônica.

Pode-se observar que houve uma variação aleatória na intensidade de resposta do eletrodo modificado quando se aumenta o tempo de ultrasom. Um aparente aumento de corrente de $2,1 \mu\text{A}$ não justifica o emprego de um tempo de agitação de 60 min. Desta forma, concluiu-se ser desnecessário aplicar um tempo de agitação superior a 15 min.

4.3. Recobrimento do eletrodo de GC

4.3.1. Otimização da quantidade de MWCNTs

Também de acordo com a literatura, a quantidade de MWCNTs aplicados na superfície do eletrodo para modificação é variável. Desta forma procurou-se avaliar se um aumento de MWCNTs imobilizados na superfície do eletrodo iria influenciar na resposta do eletrodo modificado e variou-se esta quantidade de 0 a 60 μg , sendo 60 μg a quantidade máxima possível de ser aplicada na superfície do eletrodo, limitada pela área do eletrodo.

A figura 10 mostra a intensidade das correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função da quantidade de MWCNTs aplicadas na superfície do eletrodo.

Figura 10: Intensidade de correntes de pico obtidas por CV referentes à oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em função da quantidade de MWCNTs aplicadas na superfície do eletrodo.

Observa-se que a variação de corrente é discreta a partir de 15 μg de MWCNTs. Soma-se a isto, a inviabilidade ao desenvolvimento do biossensor da confecção de um filme espesso para ser aplicado como suporte da enzima. Neste caso, um filme denso pode aumentar muito a resistência do eletrodo, além de ser mecanicamente instável. Assim, trabalhou-se com a quantidade de 15 μg de MWCNTs.

4.4. Caracterização microscópica do eletrodo de GC modificado com MWCNTs

Nas imagens da figura 11 pode-se observar o filme de MWCNTs sobre a superfície do eletrodo de GC. Em (A) tem-se a superfície do eletrodo de GC limpa, com algumas imperfeições (pequenos buracos). Em (B) é possível observar umas das imperfeições preenchida com MWCNTs.

A orientação dos CNTs na superfície do eletrodo de GC é desordenada, e podem interagir fisicamente com o GC por interações de Van der Waals [52]. O filme apresenta boa estabilidade se manuseado cuidadosamente.

As imperfeições do eletrodo de GC preenchidas com CNTs e a própria estrutura do filme de CNTs fornecem um microambiente favorável à imobilização da enzima e à manutenção da sua atividade. A enzima tende a se estabilizar tridimensionalmente sobre o filme de CNTs facilitando o acesso ao sítio ativo da mesma.

Figura 11: Imagens de SEM – FEG do (A) eletrodo de GC e do (B, C e D) eletrodo de GC modificado com MWCNTs.

4.5. Caracterização voltamétrica do eletrodo de GC modificado com MWCNTs

A figura 12 apresenta o perfil voltamétrico dos eletrodos de GC e GC/MWCNTs em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Figura 12: Perfil voltamétrico do eletrodo de GC (—) e GC/MWCNTs (—) em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Pode-se observar que o eletrodo GC/MWCNTs apresenta um aumento de corrente de 40% em relação ao eletrodo de GC não modificado e um $\Delta E_p = 83 \text{ mV}$, próximo do valor teórico de 60 mV por elétron, esperada para processos eletródicos reversíveis como o de Fe(II)/Fe(III) , e melhor que a resposta apresentada pelo eletrodo não modificado, $\Delta E_p = 120 \text{ mV}$. Assim o eletrodo GC/MWCNTs pode ser utilizado como suporte para imobilização da enzima.

4.6. Atividade catalítica enzimática

Para o cálculo da atividade catalítica enzimática utilizou-se a equação 16 juntamente com os dados de absorbância e tempo obtidos da curva de absorbância do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato em função do tempo (Figura 13), para um tempo de 2 horas a uma temperatura de 37°C e em comprimento de onda de 412 nm .

Figura 13: Absorbância do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato produzido de acordo com a reação 4, em função do tempo da reação, para um tempo de 2 horas a uma temperatura de 37 °C e em comprimento de onda de 412 nm.

Os dados de $\Delta A/\Delta t$ são fornecidos pela tangente da curva de absorção em função do tempo para um tempo de 30 min. que é onde a absorbância se encontra dentro dos parâmetros da Lei de Beer e há linearidade entre absorbância e tempo.

Os dados utilizados na equação 16 foram:

$\Delta A/\Delta t = b = 0,02003$; $V = 3,145 \times 10^{-3}$ L; $\epsilon = 1,36 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$; $d = 10 \text{ mm}$; $v = 25,0 \times 10^{-6}$ L e $\rho = 4,5 \text{ g L}^{-1}$.

Obteve-se um valor de Z/m igual a $0,041 \text{ U mg}^{-1}$; ou seja, a enzima apresenta 16% da atividade especificada pelo fabricante que é de $0,26 \text{ U mg}^{-1}$. A perda considerável da atividade pode ser atribuída às dificuldades e intempéries no processo de importação e ao longo tempo de estocagem no laboratório onde é constantemente manipulada.

4.7. Determinação do potencial de trabalho do nanobiossensor

Inicialmente investigou-se o comportamento voltamétrico dos eletrodos de GC e GC/MWCNTs (sem enzima) em solução de ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para se observar o pico de oxidação do substrato ASChI, figura 14.

Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada dos eletrodos de (A) GC e (B) GC/MWCNTs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$. Voltamogramas da oxidação do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$ (C) no eletrodo de GC e (D) no eletrodo GC/MWCNTs.

Na figura 14-C observa-se que o eletrodo de GC não apresenta qualquer processo na região de -300 a 400 mV; quando, a partir de 400 mV inicia-se a oxidação do substrato ASChI. O eletrodo GC/MWCNTs apresenta um pico em -150 mV, o mesmo observado em tampão fosfato (figura 14-B). A oxidação do substrato

no eletrodo GC/MWCNTs inicia-se em 350 mV, com diferença de 50 mV e um aumento de corrente de 60 μA em relação ao eletrodo de GC.

Determinada a região de oxidação do substrato inseriu-se o nanobiossensor na célula eletroquímica e um pico em aproximadamente -45 mV foi observado. Para confirmar que o pico era referente ao processo de oxidação do produto enzimaticamente gerado, tiocolina, foram feitos voltamogramas variando-se a concentração do substrato ASChI, figura 15.

Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em função da concentração do substrato ASChI em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$, com adições de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Observou-se um aumento de corrente em função do aumento da concentração do substrato a partir de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A diferença entre as correntes diminui com o aumento da concentração do substrato até $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ quando ocorre uma aparente saturação e o aumento de corrente é discreto.

Também foram feitos voltamogramas de oxidação da tiocolina em função do tempo de reação, figura 16-A, em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Observou-se um aumento de corrente em função do tempo. Na figura 16-B pode-se observar o gráfico de I em função de t semelhante ao gráfico de Michaelis-Menten para processos enzimáticos.

Figura 16: (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, em função do tempo de reação. (B) Corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada em função do tempo.

Sabe-se que compostos contendo tióis sofrem oxidação eletroquímica em eletrodos sólidos, mas estas oxidações ocorrem a potenciais relativamente altos o que causa alta corrente de fundo e a interferência de outros compostos eletroativos. Diferentes mediadores são utilizados para reduzir a sobrepotencial de oxidação e aumentar a sensibilidade da detecção. Neste trabalho, a oxidação da tiocolina é observada em -45 mV, um baixo sobrepotencial que é atribuído à imobilização dos MWCNTS na superfície do eletrodo de GC.

O pico de oxidação da tiocolina ocorre em um potencial distante de 395 mV do pico de oxidação do substrato ASChI. Desta forma, tem-se uma faixa abrangente onde pode-se escolher o melhor potencial de trabalho para o nanobiossensor. A fim de obter este potencial, após 540 min de reação, medidas de cronoamperometria

com o nanobiossensor foram feitas em diferentes potências (figura 17-A) e comparadas às feitas com o eletrodo GC/MWCNTs (sem enzima – figura 17-B).

Figura 17: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, em diferentes potências com o (A) nanobiossensor e com o (B) eletrodo GC/MWCNTs. Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado com o (C) nanobiossensor e com o (D) eletrodo GC/MWCNTs.

Pode-se observar que o eletrodo sem enzima não apresenta corrente de resposta em potenciais inferiores a 400 mV. Uma corrente atribuída à oxidação do substrato ASChI é observada em potenciais acima de 450 mV. Enquanto que com o nanobiossensor observa-se correntes significativas a partir de 20 mV e a partir de 400 mV há interferência da corrente de oxidação do ASChI. Desta forma, escolheu-se o potencial de 300 mV para o potencial de trabalho do nanobiossensor.

Por cronoamperometria observou-se a variação na corrente limite de difusão de oxidação da tiocolina no potencial de 300 mV, figura 18.

Figura 18: Variação da corrente limite de difusão da tiocolina em função do tempo, em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, no potencial de 300 mV.

Observa-se que a corrente é praticamente constante em função do tempo. Assim, todas as medidas com o nanobiossensor são iniciadas após o mesmo ficar imerso na solução do substrato ASChI por 5 min. Apesar da enzima ter uma baixa atividade, não requer um longo tempo de incubação para o seu funcionamento com máximo rendimento.

4.8. Otimização dos parâmetros necessários à aplicação do biossensor

4.8.1. Efeito do pH e temperatura da solução

De acordo com Mídio e Silva [5] o pH ótimo de atividade enzimática para a enzima AChE livre em solução está na faixa de 7,5 a 8,0. No cálculo da atividade catalítica enzimática utilizou-se pH = 8,0 e temperatura de 37°C que são as condições ótimas relatadas pelo fabricante para uma atividade de 0,26 U mg⁻¹ para a enzima em solução. No intuito de avaliar se estas seriam as melhores condições para a enzima imobilizada, variou-se a temperatura de 20° a 45°C nos pHs de 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Os resultados estão apresentados na figura 19.

Figura 19: (A) Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, no potencial de 300 mV, em diferentes temperaturas. Variação da corrente obtida no tempo de 200 s (B) em função da temperatura e (C) em função do pH.

Observou-se que a atividade aumenta com o aumento da temperatura em todos os pHs estudados e que a atividade é maior em pH = 8,0. A enzima imobilizada tem sua atividade mantida mesmo em temperaturas mais altas que sua temperatura ótima. Neste trabalho utilizou-se pH = 8,0 e temperatura de 37°C, as mesmas condições ótimas para a enzima livre em solução, a fim de evitar que a exposição da enzima por longo tempo em temperaturas maiores pudesse desnaturá-la.

4.8.2. Quantidade da enzima imobilizada no eletrodo modificado

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima. No intuito de avaliar a melhor quantidade da enzima a ser imobilizada na superfície do eletrodo GC/MWCNTs foram feitos cronoamperogramas em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes quantidades da enzima imobilizadas no eletrodo e suas respectivas correntes, para um tempo de 200 s, foram plotadas em função do número de unidades da enzima (U), como mostrado na figura 20.

Figura 20: Correntes de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, no potencial de 300 mV, para um tempo de 200 s, em função da quantidade de enzima imobilizada no eletrodo GC/MWCNTs.

Observou-se que a corrente aumenta com o aumento da quantidade de enzima imobilizada. Desta forma escolheu-se 0,06 U que é a maior quantidade possível de se imobilizar na superfície do eletrodo GC/MWCNTs, limitada pela área do eletrodo.

4.8.3. Porcentagem de glutaraldeído

O glutaraldeído é aplicado sobre o nanobiossensor a fim de aumentar sua estabilidade impedindo o desprendimento da enzima. Par avaliar qual a melhor porcentagem a ser aplicada foram feitos cronoamperogramas com o nanobiossensor em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As correntes, para um tempo de 200 s, foram plotadas em função da porcentagem de glutaraldeído aplicada, figura 21.

Figura 21: Correntes de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0, no potencial de 300 mV, para um tempo de 200 s, em função da porcentagem de glutaraldeído aplicado sobre o nanobiossensor.

Observou-se que o eletrodo sem a camada de glutaraldeído não apresenta resposta satisfatória, com um sinal muito pequeno em relação ao eletrodo recoberto com glutaraldeído preparado sobre as mesmas condições. A camada de glutaraldeído pode prevenir efetivamente o desprendimento da camada de enzima, provê boa reprodutibilidade e estabilidade de operação. Acima de 0,1 % de

glutaraldeído há uma queda considerável na corrente de resposta do nanobiossensor, pois ocorre a formação de um filme espesso de glutaraldeído sobre a camada de enzima, prejudicando sua atividade e/ou apresentando resistência à passagem de corrente. Desta forma, neste trabalho utilizou-se 10 μL de uma solução de glutaraldeído 0,1 %.

4.8.4. Concentração do substrato

Biossensores de inibição requerem uma calibração inicial utilizando-se o substrato. Para assegurar que o biossensor está trabalhando sobre condições cinéticas de controle, a concentração do substrato usada deve estar próxima ao limite superior do sistema e dentro de uma faixa linear de resposta. A corrente de resposta gerada pelo produto da reação catalítica enzimática corresponde à velocidade da reação enzimática e, de acordo com a equação de Michaelis-Menten, é proporcional à atividade da enzima que é imobilizada na superfície do eletrodo GC/MWCNTs. Na figura 22 tem-se o cronoamperograma do nanobiossensor para diferentes concentrações do substrato e na inserção da figura observa-se a variação de corrente em função do aumento da concentração do substrato.

Figura 22: Resposta amperométrica do nanobiossensor para adições de 0,5 mM do substrato ASChI em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 8,0, no potencial de 300 mV. Inserção: Respectivas correntes em função do aumento da concentração do substrato ASChI.

Observou-se que nas primeiras adições do substrato ASChI o aumento de corrente é mais pronunciado. Quando a concentração alcança 4,0 mM ou mais, a corrente de resposta tende a aumentar mais lentamente, indicando que a velocidade da reação passou a ser controlada pela sua cinética e não mais pelo transporte de substrato para a superfície do nanobiossensor. De acordo com o exposto acima, neste trabalho escolheu-se a concentração de 6,0 mM do substrato ASChI.

4.8.5. Reprodutibilidade de preparação do nanobiossensor

A reprodutibilidade de preparação do nanobiossensor foi avaliada utilizando-se 6 eletrodos diferentes (n=6) preparados sobre as mesmas condições. As medidas foram feitas em solução do substrato ASChI $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Para os cálculos

obteve-se a corrente de resposta do nanobiossensor no tempo de 200 s, calculou-se a média e o desvio padrão. O desvio padrão relativo obtido foi 4,02%.

4.8.6. Tempo de vida, repetibilidade e reprodutibilidade de medida do nanobiossensor

Para as medidas de repetibilidade e reprodutibilidade do nanobiossensor foram realizados 6 ensaios ($n=6$). As medidas de repetibilidade foram feitas de maneira consecutiva na mesma solução do substrato ASChI $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas de reprodutibilidade foram feitas em dias diferentes, e a cada dia montava-se novamente o sistema eletroquímico e novas soluções eram preparadas. Para os cálculos obteve-se a corrente de resposta do nanobiossensor no tempo de 200 s, calculou-se a média e o desvio padrão. Os desvios padrão relativos para a repetibilidade e reprodutibilidade são, respectivamente, 1,18 e 3,27%.

O nanobiossensor pode ser armazenado por até 30 dias sendo realizada uma medida ao dia. Quando utilizado para determinações, é utilizado no levantamento da curva analítica e em mais 3 ou 4 medidas. A manipulação do nanobiossensor e a inserção em diferentes soluções provocam grande instabilidade na corrente de resposta do nanobiossensor após 10 ou 11 medidas sucessivas.

4.10. Determinação de carbaril

4.10.1 Tempo de incubação e reativação do eletrodo

O tempo de incubação e a reativação são parâmetros chaves na aplicação do nanobiossensor. A figura 23 apresenta as correntes de resposta do nanobiossensor, para um tempo de 200 s, em função do tempo que o mesmo ficou imerso na solução de carbaril.

Figura 23: Efeito do tempo de incubação na resposta do nanobiossensor para $20,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,0$.

A corrente tende a estabilizar com um tempo de incubação de 20 min. No entanto, a recuperação da atividade do nanobiossensor é influenciada pelo tempo de exposição (tempo de incubação) do nanobiossensor na solução de carbaril. Com um tempo de incubação maior que 20 min não é possível obter novamente uma corrente superior a 90% da corrente inicial. Considerando o tempo analítico e a sensibilidade das medidas amperométricas, 10 min de incubação foi escolhido como a melhor combinação entre sinal e tempo de incubação.

4.10.2. Curva Analítica

A figura 24 apresenta os cronoamperogramas obtidos para o nanobiossensor em diferentes concentrações de carbaril e a curva analítica da porcentagem de inibição em função da concentração do pesticida.

Figura 24: (A) Resposta amperométrica do nanobiossensor para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 8,0. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,0 a 6,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 8,0.

Observou-se que a porcentagem de inibição aumenta linearmente com o aumento da concentração de carbaril com um coeficiente de linearidade de 0,996.

O desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos é $S_B = 7,65 \times 10^{-3} \mu\text{A}$ e o parâmetro B obtido da curva analítica tem valor 2,56106.

Os limites de detecção e quantificação calculados são, respectivamente, $LD = 8,96 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 2,99 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Como discutido anteriormente, o nanobiossensor só é utilizado no levantamento de uma curva analítica; a fim de avaliar a reprodutibilidade do nanobiossensor para determinações de carbaril, outras duas curvas foram feitas com outros 2 nanobiossensores.

A tabela 3 apresenta os LD e LQ obtidos com o nanobiossensor, com um biossensor de pasta de carbono e com HPLC [62].

Tabela 3. LD e LQ obtidos com biossensores amperométricos e por HPLC.

	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹
Nanobiossensor	8,96x10 ⁻⁹	29,9x10 ⁻⁹
	8,46x10 ⁻⁹	28,2x10 ⁻⁹
	9,03x10 ⁻⁹	30,1x10 ⁻⁹
Biossensor de	2,00x10 ⁻⁶	6,70x10 ⁻⁶
Pasta de Carbono		
HPLC	15,8x ⁻⁹	52,7x10 ⁻⁹

Comparado com o biossensor de pasta de carbono e com a técnica de HPLC, o nanobiossensor apresentou um desempenho muito superior para a determinação de carbaril, com excelente limite de detecção em relação LMR de carbaril para o tomate exigido pela legislação que é de $0,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

4.10.3. Recuperação do Carbaril

Para testar a potencialidade de aplicação do nanobiossensor realizou-se medidas de recuperação do carbaril em amostra de tomate adquirida no comércio local.

Inicialmente avaliou-se a influência da matriz na determinação do carbaril na amostra de tomate liquefeita. A figura 25 apresenta os cronoamperogramas, no potencial de 300 mV, em solução do substrato ASChI $6,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹, pH = 8,0.

Figura 25: Resposta amperométrica do nanobiossensor em (—) substrato ASChI $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,0 (—) após imerso na matriz por 10 min e (—) após imerso na matriz, por 10 min, contaminada com $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

Observou-se que não há diferença entre a resposta amperométrica do biossensor apenas em solução do substrato ASChI e depois de imerso na matriz. Concluiu-se que o nanobiossensor é insensível à composição da amostra.

A seguir, o nanobiossensor foi imerso na mesma matriz contaminada com $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril durante 10 min, removido, enxaguado e inserido na célula eletroquímica. Uma grande inibição da corrente de oxidação da tiocolina foi observada, relacionada com o envenenamento dos sítios ativos da enzima pela adsorção do carbaril. Entretanto, esta adsorção é reversível e a inibição inicial tende a desaparecer com o tempo, como observado na figura 25 (—).

A figura 26 apresenta uma curva de recuperação para $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

Figura 26: Curva de recuperação para a amostra de tomate dopada com $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

Para $0,50$ e $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril obteve-se as respectivas recuperações, $0,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, recuperação de 96,00% e $5,70 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, recuperação de 95,08%.

O nanobiossensor apresentou boa recuperação para as duas concentrações utilizadas mostrando-se adequado para a determinação de carbaril em amostras de tomate.

5. Conclusões

Foi desenvolvido um nanobiossensor de alta sensibilidade para carbaril baseado na modificação de um eletrodo de GC com MWCNTs e a enzima AChE. A camada de MWCNTs provê um microambiente favorável à manutenção da bioatividade da AChE e a camada de glutaraldeído sobre a enzima previne seu desprendimento.

A atividade eletrocatalítica dos CNTs promove um aumento na detecção eletroquímica do produto tiocolina enzimaticamente gerado, incluindo um baixo sobrepotencial de oxidação (-45 mV). O nanobiossensor preparado mostrou boa precisão e reprodutibilidade.

A estabilidade do nanobiossensor deixa a desejar; pois o mesmo é utilizado no levantamento da curva e em mais 3 ou 4 medidas. A manipulação e a inserção do mesmo repetidas vezes nas soluções provocam o desprendimento da camada modificadora. Tal problema pode ser solucionado pelo emprego de um suporte mais rugoso que o GC, de uma camada de enzima menos espessa ou de polímeros condutores que permitam boa fixação da enzima sem prejudicar sua atividade e sem apresentar resistência considerável à passagem de corrente. Uma camada de enzima menos espessa, neste caso, só seria possível trabalhando com uma enzima com maior atividade.

Embora o nanobiossensor tenha sido utilizado na detecção de carbaril, sua aplicação pode ser estendida à detecção de outros inibidores da enzima AChE.

5.1. Perspectivas futuras

As perspectivas futuras para continuação deste trabalho se concentram em explorar sua aplicação analítica. Em vista da dificuldade em desenvolver este nanobiossensor, por questões de cronograma, o trabalho ficou focado mais no desenvolvimento deixando a desejar na parte analítica.

Para explorar sua aplicação analítica é necessário primeiramente torná-lo robusto. O problema da instabilidade do nanobiossensor após 10 medidas sucessivas poderá ser resolvido pela aplicação de um suporte mais rugoso como ouro, grafite pirolítica ou pela imobilização abrasiva dos CNTs em grafite pirolítica ou GC aquecido. Tais procedimentos podem aumentar a fixação dos CNTs e aumentar o tempo de vida do filme sobre o eletrodo. A aplicação de polímeros condutores que permitam boa fixação da enzima sem prejudicar sua atividade e sem apresentar resistência considerável à passagem de corrente também pode ser explorada.

A camada de enzima liofilizada sobre o eletrodo GC/MWCNTs forma um filme relativamente espesso, pois sua baixa atividade requer grande o emprego de grande quantidade. Enzimas com maior atividade podem melhorar consideravelmente a aplicabilidade do nanobiossensor, pois um filme fino tende a ser mecanicamente mais estável.

6. Referências Bibliográficas

1. STEPHENSON, G. R.; FERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG, M. Glossary of terms relating to pesticides. **International Union of Pure and Applied Chemistry. Chemistry and the Environment Division**, p. 1-72, 2005.
2. VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Análise de pesticidas por técnicas eletroanalíticas. **Comunicado Técnico - EMBRAPA/CNPDI**, n. 7, p. 1-12, 1996.
3. PESTICIDA. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pesticida>>. Acesso em: 13 mar. 2007.
4. DADOS. **Produtos em linha de comercialização**. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/>>. Acesso em: 14 jul. 2007.
5. MIDIO, A. F.; SILVA, E. S. **Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos**. São Paulo: Roca, 1995. 84 p.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 15, de 13 de março de 2006**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 14 jul. 2007.
7. GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
8. WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: Wiley, 2001. 209 p.
9. CASTILHO, TÂNIA. J. **Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores**. 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
10. ROSSATO, SIMONE S. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol à base de peroxidase e sílica modificada**. 2000. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

11. THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
12. EGGINS, B. **Biosensors**: an introduction. New York: Wiley-Teubner, 1996. 212 p.
13. FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
14. LAW, K. A.; HIGSON, S. P. J. Sonochemically fabricated acetylcholinesterase micro-electrode arrays within a flow injection analyser for the determination of organophosphate pesticides. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 10, p. 1914-1924, 2005.
15. PRITCHARD, J.; LAW, K.; VAKUROV, A.; MILLNER, P.; HIGSON, S. P. J. Sonochemically fabricated enzyme microelectrode arrays for the environmental monitoring of pesticides. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 4, p. 765-772, 2004.
16. BIOQUÍMICA. Disponível em:
<http://www.laboratorioautolab.com/infomed/fulltext/bioq_index.htm>. Acesso em: 20 jul. 2007.
17. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. 999 p.
18. STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.
19. MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999. 360 p.
20. NETO, G.O.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Química Nova**, v. 11, n. 4, p. 432-435, 1988.
21. EVTUGYN, G.A.; BUDNIKOV, H. C.; NIKOLSKAYA, E. B. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination. **Talanta**, v. 46, n. 4, p. 465-484, 1998.

22. SILVA, ERASMO S. **Determinação da atividade de colinesterases sanguíneas por três métodos - Correspondência entre unidades.** 1996. 103 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.
23. SILVA, E. S.; MIDIO, A. F. Colinesterases sangüíneas : características gerais e inibição por inseticidas organofosforados e inseticidas carbamatos. **SOS-Saúde Ocupacional, Segurança e Meio Ambiente São Paulo**, v. 32, n. 194, p. 42-43, 1997.
24. LIU, G.; LIN, Y. Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 835-843, 2006.
25. JOSHI, K.A.; TANG, J.; HADDON, R.; WANG, J.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. A Disposable Biosensor for Organophosphorus Nerve Agents Based on Carbon Nanotubes Modified Thick Film Strip Electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 54-58, 2005.
26. TROJANOWICZ, M. Determination of Pesticides Using Electrochemical Enzymatic Biosensors. **Electroanalysis**, v. 14, n. 19-20, 1311-1328, 2002.
27. LUO, X.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R. Reagentless Glucose Biosensor Based on the Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Carbon Nanotube-Modified Electrodes. **Electroanalysis**, v. 18, n. 11, p. 1131-1134, 2006.
28. GAO, M.; DAI, L.; WALLACE, G. G. Glucose sensors based on glucose-oxidase-containing polypyrrole/aligned carbon nanotube coaxial nanowire electrodes. **Synthetic Metals**, v. 137, p. 1393-1394, 2003.
29. LAWRENCE, N.S.; DEO, R. P.; WANG, J. Comparison of the Electrochemical Reactivity of Electrodes Modified with Carbon Nanotubes from Different Sources. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 65-72, 2005.
30. MUSAMEH, M.; WANG, J.; MERKOCI, A.; LIN, Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, p. 743-746, 2002.
31. TERRONES, M. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and others emerging applications. **International Materials Reviews**, v. 49, n. 6, p. 325-377, 2004.

32. KROTO, H.W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 14, p. 162-163, 1985.

33. IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 7, p. 56-58, 1991.

34. DAY, L.; MAU, A. W. H. Controlled Synthesis and Modification of Carbon Nanotubes and C60: Carbon Nanostructures for Advanced Polymeric Composite Materials. **Advanced Materials**, v. 13, n. 12-13, p. 899-913, 2001.

35. IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, v. 363, n. 17, p. 603-605, 1993.

36. POPOV, V.N. Carbon nanotubes: properties and application. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 43, n. 3, p. 61-102, 2004.

37. HEER, W. A.; PONCHARAL, P.; BERGER, C.; GEZO, J.; SONG, Z.; BETTINI, J.; UGARTE, D. Liquid Carbon, Carbon-Glass Beads, and the Crystallization of Carbon Nanotubes. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 907-910, 2005.

38. ENDO, M.; KROTO, H. W. Formation of carbon nanofibers. **Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 17, p. 6941-6944, 1992.

39. IVANOV, V.; NAGY, J. B.; LAMBIN, PH.; LUCAS, A.; ZHANG, X. B.; ZHANG, X. F.; BERNAERTS, D.; TENDELOO, G. V.; AMELINCKX, S.; LANDUYT, J. V. The study of carbon nanotubules produced by catalytic method. **Chemical Physics Letters**, v. 223, n. 4, p. 329-335, 1994.

40. HERNADI, K.; FONSECA, A.; NAGY, J. B.; BERNAERTS, D.; FUDALA, A.; LUCAS, A. A. Catalytic synthesis of carbon nanotubes using zeolite support. **Zeolites**, v. 17, n. 5-6, p. 416-423, 1996.

41. KAMALAKAR, G.; HWANG, D. W.; HWANG, L-P. Synthesis and characterization of multiwalled carbon nanotubes produced using zeolite Co-beta. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 1819-1832, 2002.

42. PIEDIGROSSO, P.; KONYA, Z.; COLOMER, J-F.; FONSECA, A.; TENDELOO, G. V.; NAGY, J. B. Production of differently shaped multi-wall carbon nanotubes using various cobalt supported catalysts. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2000. v. 2, n. 1, p. 163, 2000.

43. CHIANG, I.W.; BRINSON, B. E.; HUANG, A. Y.; WILLIS, P. A.; BRONIKOWSKI, M. J.; MARGRAVE, J. L.; SMALLEY, R. E.; HAUGE, R. H. Purification and characterization of Single-Wall Carbon Nanotubes (SWNTs) obtained from the gas-phase decomposition of CO (HiPco Process). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, . 35, p. 8297-8301, 2001.

44. THESS, A.; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C.; LEE, Y .H.; KIM, S. G.; RINZLER, A. G.; COLBERT, D. T.; SCUSERIA, G. E.; TOMÁNEK, D.; FISCHER, J. E.; SMALLEY, R. E. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. **Science**, v. 273, n. 5274, p. 483-487, 1996.

45. HERBST, M.H.; MACEDO, M.I.F.; ROCCO, A.M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

46. GAN, Z-H.; ZHAO, Q.; GU, Z-N.; ZHUANG, Q-K. Electrochemical studies of single-wall carbon nanotubes as nanometer-sized activators in enzyme-catalyzed reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 2, p. 239-247, 2004.

47. BRITTO, P.J.; SANTHANAM, K.S.V.; AJAYAN, P.M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 1, p. 121-125, 1996.

48. BANKS, C.E.; DAVIES, T. J.; WILDGOOSE. G. G.; COMPTON, R. G. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites. **Chemical Communications**, p. 829-841, 2005.

49. LIU, G.; RIECHERS, S. L.; MELLEN, M. C.; LIN, Y. Sensitive electrochemical detection of enzymatically generated thiocholine at carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 1163-1169, 2005.

50. ROCHETTE, J-F.;SACHER, E.; MEUNIER, M.; LUONG, J.H.T. A mediatorless biosensor for putrescine using multiwalled carbon nanotubes. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p. 305-311, 2005.

51. QU, F.; YANG, M.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. Amperometric biosensor for choline based on layer-by-layer assembled functionalized carbon nanotube and polyaniline multilayer WIm. **Analytical Biochemistry**, v. 344, p. 108-114, 2005.

52. YIN, Y.; LÜ, Y.; WU, P.; CAI, C. Direct Electrochemistry of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotubes. **Sensors**, v. 5, n. 4-5, p. 220-234, 2005.
53. YAMAMOTO, K.; SHI, G.; ZHOU, T.; XU, F.; XU, J.; KATO, T.; JIN, J-Y.; JIN, L. Study of carbon nanotubes–HRP modified electrode and its application for novel on-line biosensors. **Analyst**, v. 128, p. 249-254, 2003.
54. DAI, Y-Q.; SHIU, K-K. Glucose Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 16, n. 20, p. 1697-1703, 2003.
55. WANG, J.; KAWDE, A-N.; JAN, M. R. Carbon-nanotube-modified electrodes for amplified enzyme-based electrical detection of DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 995-1000, 2004.
56. WANG, M.; SHEN, Y.; LIU, Y.; WANG, T.; ZHAO, F.; LIU, B.; DONG, S. Direct electrochemistry of microperoxidase 11 using carbon nanotube modified electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 578, p. 121-127, 2005.
57. SALIMI, A.; NOORBAKHSH, A.; GHADERMARZ, M. Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase incorporated onto multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 344, p. 16-24, 2005.
58. WANG, J.; LIU, G.; LIN, Y. Amperometric choline biosensor fabricated through electrostatic assembly of bienzyme/polyelectrolyte hybrid layers on carbon nanotubes. **Analyst**, v. 131, p. 477-483, 2006.
59. TKAC, J.; WHITTAKER, J. W. RUZGAS, T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, p. 1820-1824, 2007.
60. WEIGEL, M. C.; TRITSCHER, E.; LISDAT, F. Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 689-639, 2007.
61. DEO, R. P.; WANG, J.; BLOCK, I.; MULCHANDANI, A.; JOSHI, K. A.; TROJANOWICZ, M.; SCHOLZ, F.; CHEN, W.; LIN, Y. Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 185-189, 2005.

62. DRAGUNSKI, JOSIANE, C. **Desenvolvimento e aplicações de eletrodos modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas em alimentos**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.
63. YANG, M.; JIANG, J.; YANG, Y.; CHEN, X.; SHEN, G.; YU, R. Carbon nanotube/cobalt hexacyanoferrate nanoparticle-biopolymer system for the fabrication of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 9, p. 1791-1797, 2005.
64. LIU, G.; LIN, Y. Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 251-256, 2006.
65. RIVAS, G. A.; MISCORIA, S. A.; DESBRIERES, J.; BARRERA, G. D. New biosensing platforms based on the layer-by-layer self-assembling of polyelectrolytes on Nafion/carbon nanotubes-coated glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 270-275, 2007.
66. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
67. BERGMEYER, H.U.; GRABL, M. Evaluation of experimental data. In: BERGMEYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v. 2, p. 442-459.
68. MOORE, R.R.; BANKS, C. E.; COMPTON, R. G. Electrocatalytic detection of thiols using an edge plane pyrolytic graphite electrode. **Analyst**, v. 129, p. 755-758, 2004.