

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

IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA

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

**São Carlos
2016**

IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA

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

Versão Corrigida

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

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

Orientador: Francisco Eduardo Gontijo
Guimarães

**São Carlos
2016**

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

ARRUDA, Izabela Gutierrez de.

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

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

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

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **IZABELA GUTIERREZ DE ARRUDA**

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

Data da defesa: 27/07/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovada

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

Aprovada

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

APROVADA

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

Aprovada

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

APROVADA

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

2) Filmes nanoestruturados de ZnO fabricados por eletrodeposição pulsada¹⁰, técnica que possibilita produzir plataformas de baixo custo e aplicáveis como ensaios de alta capacidade para detecção sensível e em tempo real de uma ampla gama de espécies biológicas. Os filmes de ZnO foram crescidos sobre substratos revestidos de Cr/Au, entre um potencial de redução e um de oxidação usando uma solução eletrolítica à base de $Zn(NO_3)_2$.

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

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

Os métodos eletroquímicos utilizados demonstraram-se eficientes nos testes de detecção do catecol e do pesticida carbaril. Os limites de detecções para os biossensores de catecol (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e ZnO foram de $(0,207 \pm 0,017)$ mol.L⁻¹, $(0,135 \pm 0,014)$ mol.L⁻¹ e $(0,134 \pm 0,015)$ mol.L⁻¹, respectivamente. E o sistema conseguiu quantificar de maneira indireta, porém, eficiente à concentração do pesticida carbaril em amostras padrões, onde as plataformas (PEI/PSE)₅/Tirosinase, (PEI/PSE)₅ e de ZnO conseguiram detectar o carbaril para concentrações abaixo de 1000 nM, abaixo de 10000 nM e acima de 5000 nM, respectivamente.

Logo, com o desenvolvimento dessa pesquisa, que é norteada por vários princípios da física, química, matemática, biologia, medicina e ciência e engenharia de

materiais, visamos contribuir para o avanço científico e tecnológico do Brasil, uma vez que o processamento desses biossensores como dispositivos compactos, práticos, de baixo custo e de alta sensibilidade na detecção de pesticidas presentes no meio ambiente, pode ser utilizado na realização de pesquisas futuras e até em escala comercial.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

211-216, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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