

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE NANOCOMPÓSITOS DE
POLIPIRROL E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÃO EM
BIOSSENSORES DE PESTICIDA METIL PARATION**

**Jordana Borges Griep
Dissertação de Mestrado**

Porto Alegre, março de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JORDANA BORGES GRIEP

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE NANOCOMPÓSITOS DE
POLIPIRROL E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÃO EM
BIOSSENSORES DE PESTICIDA METIL PARATION**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos
Orientadora

Prof. Dr. Gustavo F. S. Andrade
Coorientador

Dedico esse trabalho aos meus pais, Rui e Márcia, e ao meu irmão Gustavo, pelo amor inesgotável, apoio e incentivo constantes e por serem meus maiores ídolos e heróis.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a. Dr.^a. Jacqueline, pela confiança, paciência, apoio e dedicação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Andrade pela coorientação

Ao Prof. Dr. Marcos pela disposição e ajuda.

Ao grupo LAMAI, pela ajuda, amizade e convívio.

Ao pessoal do K121, Anderson, Arthur, Eduardo e em especial a Lara e o Pedro, pela paciência, aprendizado e toda a ajuda durante esse trabalho e, principalmente, pela amizade, conversas, risadas e café.

A todos professores que contribuíram para minha formação.

À minha família todo meu amor e gratidão, por constantemente apoiarem as minhas ideias, por mais desafiadoras que sejam e por crescerem e aprenderem junto comigo à cada nova etapa da minha vida.

À minha prima Carolina, por compreender como ninguém minhas loucuras e sonhos, pelo incessante apoio, e a nossa frase de efeito e incentivo, “calma, respira fundo e foco”.

Aos meus amigos, pelo carinho e compreensão, mesmo à distância, especialmente a Priscila, Alessandra e Fabiele, por serem minha válvula de escape diária e me aguentarem não só nos meus melhores momentos, mas principalmente nos piores, muito obrigada.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq.

Ao CME e CNANO pelas análises realizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela assistência.

E todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. POLÍMEROS.....	17
2.2. POLÍMEROS CONDUTORES.....	17
2.2.1. Polipirrol.....	22
2.2.2. Nanocompósitos de Polímeros Condutores.....	25
2.3. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS ELETROQUÍMICOS	27
2.3.1. Enzimas	28
2.3.2. Biossensores para pesticida baseados na inibição da Acetilcolinesterase.....	31
2.3.3. Pesticidas	37
3. METODOLOGIA	39
3.1. LIMPEZA DOS ELETRODOS DE TRABALHO	39
3.2. DEPOSIÇÃO DE PLATINA	39
3.3. SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE POLIPIRROL.....	39
3.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	40
3.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	41
3.6. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	41
3.7. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA	41
3.8. IMOBILIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE.....	41
3.9. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR.....	42
3.10. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE PESTICIDAS	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	43
4.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	46
4.3. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	48
4.4. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA	51
4.4.1. Filmes de nanopartículas de ouro.....	51
4.4.2. Filmes de Polipirrol.....	52
4.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO BIOSSENSOR.....	55
4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO BIOSSENSOR	57
4.7. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR.....	58

4.7.1.	Comportamento eletroquímico na presença do substrato ATCl	58
4.7.2.	Caracterização dos processos redox na interface eletrodo/solução.....	64
4.7.3.	Comportamento eletroquímico na presença do par redox ferrocianeto / ferrocianato de potássio	70
4.8.	APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NA DETECÇÃO DE METIL PARATION	76
5.	CONCLUSÃO	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de uma cadeia polimérica conjugada. ¹⁵	18
Figura 2. Mudanças estruturais associadas com a oxidação do politiofeno resultando na formação de polaron e bipolaron (a), teoria de banda de um polímero condutor (b). ²⁵	19
Figura 3. Comparação da condutividade de alguns (PICs) com outros materiais. PA = Poliacetileno, PANI = Polianilina, PPP = Poli (p-fenileno), PPI = Polipirrol. ¹⁶	21
Figura 4. Mecanismo da síntese eletroquímica do Polipirrol. ²⁴	23
Figura 5. Representação dos possíveis defeitos estruturais encontrados no polipirrol.	24
Figura 6. Esquema da evolução da estrutura de bandas para o polipirrol. ⁵⁴	25
Figura 7. Representação esquemática de um biossensor. ⁷⁹	28
Figura 8. Estrutura 3D da enzima Acetilcolinesterase E.C.3.1.1.7. ⁸⁷	30
Figura 9. A) Reações eletroquímicas envolvidas na resposta de biossensores baseados em AChE. B) Estratégia para a medição da inibição da AChE imobilizada. ⁸⁷	33
Figura 10. Técnicas de imobilização utilizadas no desenvolvimento de biossensores baseados em AChE. ⁸⁷	34
Figura 11. Estrutura de pesticidas organofosforados. ¹¹⁵	38
Figura 12. Esquema ilustrando a síntese dos materiais poliméricos sintetizados.	40
Figura 13. Espectros de FTIR-ATR para os filmes de PPI-IC-DS, PPI-IC-DS-NPAu e PPI-IC-NPAu, índigo-carmim (IC) e dodecilsulfato (DS) (<i>inset</i>).	43
Figura 14. Espectros Raman para os filmes PPI-IC (a), PPI-IC-NPAu (b) e PPI-IC-DS-NPAu (c).	45
Figura 15. Imagens obtidas por MEV dos filmes de nanocompósitos sintetizados em diferentes temperaturas: a) PPI-IC-NPAu (10°C), b) PPI-IC-NPAu (25°C), c) PPI-IC-DS-NPAu (10°C) e d) PPI-IC-DS-NPAu (25°C).	46
Figura 16. Imagem ilustrativa bidimensional exemplificando a interação entre as moléculas dos dopantes com as cadeias poliméricas de PPI e estruturas químicas do a) DS e b) IC. ³³	47
Figura 17. Mapeamento EDS dos filmes sintetizados em diferentes temperaturas: (a-d) PPI-IC-NPAu (10°C), (e-h) PPI-IC-NPAu (25°C), (i-m) PPI-IC-DS-NPAu (10°C), e (n-q) PPI-IC-DS-NPAu (25°C). Elementos: (a, e, i, n) oxigênio, (b, f, j, o) enxofre, (c, g, l, p) ouro, e (d, h, m, q) nitrogênio.	48
Figura 18. Quinto ciclo dos voltamogramas dos filmes de PPI-IC e PPI-IC-NPAu sintetizados em diferentes temperaturas. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ em solução 0,1 mol L ⁻¹ de LiClO ₄	49

Figura 19. Voltamogramas dos filmes sintetizados à 25 °C. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ em solução 0,1 mol L ⁻¹ de LiClO ₄ . Quinto ciclo.	50
Figura 20. Espectros de extinção dos filmes de NPAu sintetizados a 10 e 25 °C.....	52
Figura 21. Espectros de absorção óptica de polipirrol dopado com ClO ₄ ⁻ para diferentes concentrações do dopante. ²⁶	53
Figura 22. Espectro de absorção UV-VIS-NIR dos materiais sintetizados.....	54
Figura 23. Espectros Raman dos filmes sintetizados a 10 °C: PPI-IC (a) filmes PPI-IC-NPAu (b) e PPI-IC-DS-NPAu (c) sem (i) e com (ii) AChE imobilizada.....	56
Figura 24. Imagens obtidas por MEV dos filmes PPI-IC (a), PPI-IC-AChE (b), PPI-IC-NPAu-AChE (c) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (d).	57
Figura 25. Voltamogramas do filme PPI-IC e PPI-IC-AChE na ausência (a e b respectivamente) e na presença de 0,5 mM ATCl em PBS (c e d). Velocidade de varredura de 5 mV s ⁻¹	59
Figura 26. Mecanismo de reação entre acetiltiocolina e AChE. ¹³⁶	60
Figura 27. Voltamogramas dos filmes PPI-IC-NPAu em PBS (a) e em 0,5 mM ATCl em PBS (c) PPI-IC-NPAu-AChE em PBS (b) e em 0,5 mM ATCl em PBS (d). Velocidade de varredura de 5 mV s ⁻¹	61
Figura 28. Voltamograma dos filmes PPI-IC-DS-NPAu (a) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) em PBS; PPI-IC-DS-NPAu (c) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (d) em 0,5 mM ATCl em PBS. Velocidade de varredura de 5 mV s ⁻¹	62
Figura 29. Voltamogramas dos filmes PPI-IC-NPAu-AChE (a), PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) e PPI-IC-AChE (c) em 0,5 mM ATCl em PBS. <i>inset</i> : PPI-IC-AChE. Velocidade de varredura de 5 mV s ⁻¹	64
Figura 30. Voltamograma do filme PPI-IC-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s ⁻¹ (j). <i>Inset</i> : voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.....	65
Figura 31. log <i>i</i> _p vs. log velocidade de varredura (<i>v</i>) do filme PPI-IC-AChE.....	66
Figura 32. Voltamogramas do filme PPI-IC-NPAu-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s ⁻¹ (j). <i>Inset</i> : voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.....	67
Figura 33. log <i>i</i> _p vs. log velocidade de varredura (<i>v</i>) do filme PPI-IC-NPAu-AChE.	68
Figura 34. Voltamograma do filme PPI-IC-DS-NPAu-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s ⁻¹ (j). <i>Inset</i> : voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.....	69
Figura 35. log <i>i</i> _p vs. log velocidade de varredura do filme (<i>v</i>) PPI-IC-DS-NPAu-AChE.....	69

Figura 36. Esquema do mecanismo de transferência de elétrons do metil paration. ¹⁴⁴	71
Figura 37. Voltamograma do filme (a) PPI-IC e (b) PPI-IC-AChE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. <i>Inset</i> : PPI-IC (A) e PPI-IC-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.	72
Figura 38. Voltamograma do filme PPI-IC-NPAu (a) e PPI-IC-NPAu-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. <i>Inset</i> : PPI-IC-NPAu (A) e PPI-IC-NPAu-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.	73
Figura 39. Voltamograma do filme PPI-IC-DS-NPAu (a) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. <i>Inset</i> : PPI-IC-DS-NPAu (A) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.	74
Figura 40. Voltamograma do filme PPI-IC-NPAu-AChE (a) e PPI-IC-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. <i>inset</i> : PPI-IC-NPAu-AChE (A) e PPI-IC-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.	75
Figura 41. Voltamograma do PPI-IC-AChE em 0,5mM de ATCl em PBS (a) e depois da inibição em $1,152 \times 10^{-7}$ (b), $5,67 \times 10^{-7}$ (c), $3,84 \times 10^{-6}$ (d), 5×10^{-6} (e), $7,68 \times 10^{-6}$ (f), 1×10^{-5} (g), $2,99 \times 10^{-5}$ (h), 5×10^{-5} (i), $7,48 \times 10^{-5}$ (j), 1×10^{-4} (k), $2,99 \times 10^{-4}$ (l) e 5×10^{-4} (m) mol L ⁻¹ de MP, respectivamente. Velocidade de varredura de 5 mV s ⁻¹	76
Figura 42. Mecanismo de fosforilação da AChE. ¹⁴⁷	77
Figura 43. Curva de calibração do PPI-IC-AChE para a determinação de MP. <i>inset</i> : Relação linear entre inibição (%) e concentração de MP.	79
Figura 44. Voltamograma do PPI-IC-NPAu-AChE em 0,5mM de ATCl em PBS (a) e depois da inibição em $1,152 \times 10^{-7}$ (b), $5,67 \times 10^{-7}$ (c), $3,84 \times 10^{-6}$ (d), 5×10^{-6} (e), $7,68 \times 10^{-6}$ (f), 1×10^{-5} (g), $2,99 \times 10^{-5}$ (h), 5×10^{-5} (i), $7,48 \times 10^{-5}$ (j), 1×10^{-4} (k), $2,99 \times 10^{-4}$ (l) e 5×10^{-4} (m), $6,24 \times 10^{-4}$ (n) e 1×10^{-3} (o) mol L ⁻¹ de MP, respectivamente. Velocidade e varredura de 5 mV s ⁻¹	80
Figura 45. Curva de calibração do PPI-IC-NPAu-AChE para a determinação de MP. <i>Inset</i> : Relação linear entre inibição (%) e concentração de MP.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.	29
Tabela II. Biossensores para pesticida baseados em AChE imobilizada em polímeros condutores.	32
Tabela III. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC dos filmes de polipirrol sintetizados à 25 °C.	50
Tabela IV. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes de PPI-IC sintetizados à 10 °C.	60
Tabela V. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes do nanocompósito PPI-IC-NPAu sintetizados à 10 °C.	61
Tabela VI. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes do nanocompósito PPI-IC-DS-NPAu sintetizados à 10 °C.	63
Tabela VII. Comparação de biossensores imobilizados com AChE em polímeros condutores para detecção de pesticidas.	82

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AChE	acetilcolinesterase	K_m	constante de Michaelis-Menten
ATCI	cloreto de acetiltiocolina	LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> , orbital molecular desocupado de menor energia
BC	banda de condução	MEV	microscopia eletrônica de varredura
BChE	butirilcolinesterase	M-NPS	nanoprticulas metálicas
BV	banda de valência	MP	metil paration
CMC	concentração micelar crítica	n	concentração dos portadores livres
DS	dodecilsulfato	NPAu	nanoprticulas de ouro
e	unidade de carga eletrônica	OPs	pesticidas organofosforados
E	enzima	P	produto
EDS	espectroscopia de energia dispersiva	PA	poliacetileno
E_g	energia do <i>band gap</i>	PANI	polianilina
ES	complexo enzima-substrato	PBS	solução tampão fosfato
E_{ox}	potencial de oxidação	Pi	pirrol
E_{pa}	pico anódico	PICs	polímeros intrinsecamente condutores
E_{pc}	pico catódico	PPi	polipirrol
E^0_{redox}	potencial redox padrão	PPP	poli(p-fenileno)
FTIR-ATR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância atenuada	PVC	policloreto de vinila
FTO	filme fino de óxido de estanho dopado com flúor	S	substrato
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> , orbital molecular ocupado de maior energia	SEIRA	<i>Surface Enhanced Infrared Absorption</i> (Absorção de radiação infravermelho intensificado pela superfície)
I	corrente	UV-VIS-NIR	espectroscopia de absorção na região do ultravioleta, visível e infravermelho próximo
IC	ndigo carmin	VC	voltametria cíclica
I_0	atividade enzimática antes da inibição	σ	condutividade elétrica do bulk
I_1	atividade enzimática depois da inibição		
μ	mobilidade relativa		
j	densidade de corrente		
j_a	densidade de corrente anódica		
j_c	densidade de corrente catódica		

RESUMO

Título: Síntese e caracterização de filmes de nanocompósitos de polipirrol e nanopartículas de ouro para aplicação em biossensores de pesticida metil paration

Autora: Jordana Borges Griep

Orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo F. S. Andrade

Palavras Chave: polipirrol, nanocompósito, biossensor enzimático, metil paration.

Este trabalho teve como objetivo estudar e caracterizar filmes de nanocompósitos de polipirrol dopado com índigo carmim e dodecilsulfato combinados com nanopartículas de ouro para aplicação como biossensores eletroquímicos de pesticida. Primeiramente sintetizou-se três filmes a 10 e 25 °C por voltametria cíclica: polipirrol dopado com índigo carmim (PPi-IC), polipirrol dopado com índigo carmim contendo nanopartículas de ouro (PPi-IC-NPAu) e polipirrol dopado com índigo carmim e dodecilsulfato de sódio, contendo nanopartículas de ouro (PPi-IC-DS-NPAu). Nesses filmes foram realizadas caracterizações estruturais, morfológicas, ópticas e eletroquímicas, utilizando espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia UV-VIS-NIR e voltametria cíclica. Os filmes sintetizados a 10 °C foram modificados com a enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo posteriormente caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia Raman e voltametria cíclica. Os resultados obtidos mostraram que a interação da enzima com os filmes de polipirrol é dependente de sua composição. A presença de DS não favoreceu a sua imobilização, sendo assim, os filmes de PPi-IC e PPi-IC-NPAu foram os materiais mais adequados para a imobilização física da AChE, sendo capazes de detectar o pesticida metil paration (MP) através da porcentagem de pesticida inibido pela ação da AChE em relação ao cloreto de acetiltiocolina (ATCI). Essa detecção foi realizada por voltametria cíclica, onde a resposta do biossensor é medida a partir da diminuição da corrente produzida. Isso ocorre porque o MP se encontra em contato com a AChE e inibe a ação da mesma, impedindo a hidrólise da ATCI, o que faz diminuir a corrente, pois não há produção de tiocolina, que é produto da hidrólise e uma espécie eletroativa. Os filmes apresentaram sensibilidades (% de inibição por mmol L⁻¹ de pesticida) de $1,9 \times 10^6$ (R² 0,976) e $2,7 \times 10^6$ (R² 0,964) e limites de detecção de 4,15 e 14,8 ng L⁻¹, para PPi-IC-AChE e PPi-IC-NPAu-AChE respectivamente.

ABSTRACT

Title: Synthesis and characterization of nanocomposites films of polypyrrole and gold nanoparticles for application in biosensors for methyl parathion pesticide

Author: Jordana Borges Griep

Supervisor: Prof. PhD. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Co-supervisor: Prof. PhD. Gustavo F. S. Andrade

Keywords: polypyrrole, nanocomposite, biosensor, methyl parathion

The goal of this work was to study and characterize nanocomposite films of gold nanoparticles with indigo carmine and dodecylsulfate doped polypyrrole for application as electrochemical biosensor for pesticide. Initially, three films were synthesized by cyclic voltammetry at 10 and 25 °C: polypyrrole doped with indigo carmine (PPy-IC), polypyrrole doped with indigo carmine containing gold nanoparticles (PPy-IC-AuNP) and polypyrrole doped with indigo carmine and sodium dodecylsulfate containing gold nanoparticles (PPy-IC-DS-AuNP). These films were studied by structural, morphological, optical and electrochemical characterization, using infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, scanning electron microscopy, UV-VIS-NIR spectroscopy and cyclic voltammetry. The films synthesized at 10 °C were modified with acetylcholinesterase (AChE) enzyme; followed by characterization with scanning electron microscopy, Raman spectroscopy and cyclic voltammetry. The results showed a preferential immobilization of the enzymes on films without DS, therefore, PPy-IC and PPy-IC-AuNP were the most suitable materials for the physical immobilization of AChE and for detection of methyl parathion (MP) pesticide through the percentage of pesticide inhibited by the action of AChE on acetylthiocholine chloride (ATCl). This detection was carried out by cyclic voltammetry, where the biosensor response is measured as a decrease of the produced current. The decrease in current occurs because MP reaches the AChE, inhibiting the action of the enzyme, avoiding the hydrolysis of ATCl, leading to the decrease of current as no thiocholine (an electroactive specie, product of the hydrolysis) is produced. The films presented sensitivities (inhibition percentage per mmol L^{-1}) of 1.9×10^6 (R^2 0.976) and 2.7×10^6 (R^2 0.964) and detection limits of 4.15 and 14.8 ng L^{-1} for PPy-IC-AChE and PPy-IC-AuNP-AChE respectively.

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas são classificados de acordo com sua finalidade (bactericida, fungicida, inseticida, por exemplo) e foram inicialmente explorados na década de 1940 para controlar doenças como de Chagas, Malária e Febre Amarela, além do combate às pragas nas atividades agrícolas e pecuárias. Estes pesticidas continuam tendo papel fundamental no controle não somente destas doenças, mas também de outras doenças que surgiram ao longo dos anos, como as transmitidas pelo mosquito *Aedes Aegypti*. Em termos da aplicação na agricultura, dados da Organização das Nações Unidas (ONU) mostram que cerca de 40% do que é produzido de alimentos seria perdido na ausência destes compostos químicos, resultando no aumento do seu custo de produção. No entanto, o uso descontrolado destes pesticidas resultou em contaminação ambiental e problemas de saúde na sociedade, que têm persistido mesmo após quatro décadas do aparecimento dos primeiros casos.¹ Isto se agrava ainda mais com os novos problemas de saúde que têm sido atribuídos ao uso de pesticidas, como a má formação cerebral detectada em bebês que vivem em áreas onde o inseticida-larvicida piriproxifeno (ativo no combate de larvas do mosquito *Aedes Aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e mosca doméstica) é utilizado. Esta hipótese foi levantada por pesquisadores argentinos, mas o Ministério da Saúde brasileiro atualmente associa a microcefalia em bebês apenas com a infecção pelo Zika vírus durante a gestação, uma vez que não há estudos científicos que comprovem a relação da doença congênita ao uso do pesticida. Ainda assim, a suspeita e preocupação levou o governo do Rio Grande do Sul a suspender a utilização deste larvicida no Estado.²

O controle do uso adequado dos produtos com potenciais nocivos ao meio ambiente e saúde humana é de fundamental importância, principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que 99% dos casos de envenenamento letal por pesticida ocorrem nestes países.³ Neste âmbito, destaca-se o Brasil, que está entre os maiores consumidores de pesticidas, já tendo permanecido como o maior consumidor do mundo por alguns anos. Este consumo se resume não somente a produtos regulamentados, mas também a produtos ilícitos amplamente disseminados nas áreas rurais.⁴ Apesar de ser um reflexo do crescimento dos agronegócios brasileiros, medidas precisam ser tomadas para regulamentar a utilização destes agrotóxicos, uma vez que em sua maioria são altamente tóxicos.

A toxicidade destes agrotóxicos pode causar danos à saúde de uma forma direta ou indireta. O não consumo dos produtos com agrotóxicos não garante a não contaminação, uma vez que os resíduos tóxicos podem persistir no ar, água e solo devido à forma de aplicação e ao seu tempo de vida no ambiente. De fato, estudos realizados pela Universidade Federal de Mato

Grosso do Sul revelaram a presença de pesticidas no ar e em amostras de água da chuva, coletados em cidades que se destacam pela produção de grãos.⁵

O desenvolvimento de biossensores para pesticidas é de extrema importância, uma vez que ocorre a utilização de alguns pesticidas extremamente tóxicos no Brasil, muitas vezes importados ilegalmente por produtores. Esta utilização descontrolada dos pesticidas nos torna reféns de um aumento constante e indiscriminado da poluição de afluentes de rios e aquíferos subterrâneos, afetando diretamente a vida animal e vegetal, gerando um grande custo na área da saúde. Como consequência, a preocupação com a saúde pública e poluição do meio ambiente exige a crucial detecção, controle e monitoramento dos pesticidas, uma vez que de acordo com as estimativas⁶, menos de 0,1% dos pesticidas efetivamente aplicados, alcançam as pragas. Isto significa que 99,9% têm potencial para se espalhar pelo meio ambiente. Assim, a determinação de pesticidas em amostras ambientais (águas superficiais e subterrâneas, solo, ar, plantas e alimentos) é o ponto de partida para avaliar o risco potencial destes compostos para o ambiente e saúde humana.⁷ Devido a estes tipos de contaminações, organizações internacionais (Organizações das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) regulam o nível máximo de pesticidas em alimentos e produtos agrícolas. Regulamentações e limites também foram designados para níveis de resíduos de pesticidas permitidos em água potável.⁸

Como a legislação nacional e internacional vem se tornando cada vez mais restritiva em relação às quantidades máximas permitidas de pesticidas nas amostras, um dos desafios para a detecção e quantificação dessas substâncias é a necessidade de métodos de análise simples, eficientes, rápidos, sensíveis, confiáveis, com custo acessível e de fácil utilização. Em vista disso, atualmente tem-se uma necessidade no desenvolvimento de materiais capazes de detectar pesticidas em amostras reais e que possam ser usados com facilidade. Com o objetivo de contribuir para este fim, nesta dissertação serão abordados os estudos de biossensores enzimáticos baseados em nanocompósitos de polímeros condutores e nanopartículas metálicas. Estes materiais serão explorados no desenvolvimento de um dispositivo capaz de detectar pequenas quantidades de contaminantes.

Os polímeros condutores entram em destaque para esse tipo de aplicação por serem fáceis de sintetizar, possuem baixo custo e apresentarem propriedades elétricas diferenciadas, devidas às suas cadeias com ligações simples e duplas alternadas, ou seja, apresentam um sistema π -conjugado que permite o fluxo de elétrons.^{16,17} Dentre esses polímeros, o polipirrol (PPi) se sobressai por ter alta condutividade, boa estabilidade química, além de ter suas propriedades eletroquímicas controladas através das condições de síntese.⁹ O aumento na condutividade do PPi se dá pelo processo de dopagem, onde acontece a remoção ou adição de

elétrons na cadeia polimérica e isto pode ocorrer através da oxidação ou redução da mesma pelo uso de agentes de transferência de carga, os dopantes, como o corante índigo-5-5'-ácido dissulfônico (índigo carmim, IC) e o surfactante dodecilsulfato de sódio (DS). A dopagem pode ser feita pela polimerização química ou eletroquímica, sendo a última ideal para o controle do nível de dopagem, bem como a espessura de filmes depositados em eletrodos.^{16,22}

Algumas propriedades dos polímeros condutores, como óptica e elétrica, podem ser melhoradas ao se combinar estes materiais com nanopartículas metálicas.¹⁰ Nanopartículas de ouro (NPAu) surgem como uma das mais exploradas no desenvolvimento de biossensores, devido sua grande área superficial que proporciona uma imobilização estável de biomoléculas, como as enzimas. A presença dessas nanopartículas na matriz polimérica fornece uma melhor atividade e condutividade eletroquímica e ao mesmo tempo evita o desprendimento das enzimas, mantendo assim sua bioatividade.^{11,56}

Este trabalho teve como objetivo estudar e caracterizar filmes de nanocompósitos de polipirrol dopado com índigo carmim e dodecilsulfato de sódio combinados com nanopartículas de ouro para aplicação como biossensores eletroquímicos de pesticida. Para isto, utilizou-se como biorreceptor a enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE é ideal para a detecção de pesticidas organofosforados (OPs), pois o mecanismo de detecção se baseia na redução do sinal elétrico medido que resulta da inibição da enzima na presença do pesticida. Para representar esta classe de pesticidas, realizou-se os testes de detecção do paration metílico (MP), no entanto, enfatizamos que poderia ser utilizado qualquer outro com a ação de inibição da enzima AChE. Esse tipo de biossensor é extremamente importante, visto que os OPs são altamente tóxicos e no organismo humano agem na inibição irreversível do centro ativo da enzima, que por consequência, impedem a transmissão dos impulsos nervosos, o que pode levar a danos irreparáveis em funções nervosas.^{45,76,108}

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLÍMEROS

Os polímeros representam uma classe particular de macromoléculas, ou seja, são moléculas de alto peso molecular, constituídas por grandes cadeias de átomos, cujas propriedades decorrem principalmente de interações entre segmentos de uma mesma macromolécula (interações intramoleculares) ou de outras (interações intermoleculares). Eles se caracterizam pela repetição de um ou mais grupos atômicos (os monômeros) que se ligam através de uma reação de polimerização.¹²

Até o final do século XIX, a industrialização dos polímeros era caracterizada pela modificação de polímeros naturais, sendo que a síntese de polímeros sintéticos teve início somente no início do século XX. Uma das principais conquistas industriais da química foi a fabricação em grande escala de polímeros sintéticos. Com eles foram criados materiais fundamentais para o desenvolvimento tecnológico. Eles podem ser classificados com base nas suas propriedades físico-químicas, como por exemplo os termoplásticos (exemplo: policloreto de vinila, PVC) que se tornam maleáveis ou fundem-se quando aquecidos e os termorrígidos (ex. resinas tipo epóxi) que são infusíveis e ainda os elastômeros (ex. borrachas) que apresentam deformação elástica.¹³

Uma das propriedades mais importantes dos polímeros convencionais está relacionada com sua capacidade de se comportar como isolante elétrico. No entanto, por volta dos anos 1970, uma nova classe de polímeros passou a ser estudada, sendo explorada a possibilidade de conduzirem eletricidade. Essa nova classe passou a ser chamada de metais sintéticos, nomeação dada inicialmente aos polímeros intrinsecamente condutores de elétrons (PICs) devido às suas propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e ópticas inerentes de metais e semicondutores.¹⁴

2.2. POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros condutores também são conhecidos por “polímeros conjugados” ou “polímeros intrinsecamente condutores (PICs)”, pois é característica destes materiais apresentar um sistema π -conjugado, ou seja, apresentam cadeias com ligações simples e duplas alternadas, conforme ilustrado na Figura 1. Essa conjugação permite que seja criado um fluxo de elétrons, pois ambas as ligações, simples e duplas, contém ligações σ que são quimicamente fortes, e ao

mesmo tempo contêm ligações duplas, do tipo ligações- π que são mais fracas. Os orbitais p nas ligações- π se sobrepõem, permitindo que os elétrons sejam deslocalizados e que possam se mover mais facilmente entre os átomos e, por consequência, isso confere a esses polímeros propriedades elétricas diferenciadas.¹⁵⁻¹⁷ Os principais polímeros pertencentes a essa classe são o poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno.^{18,19}

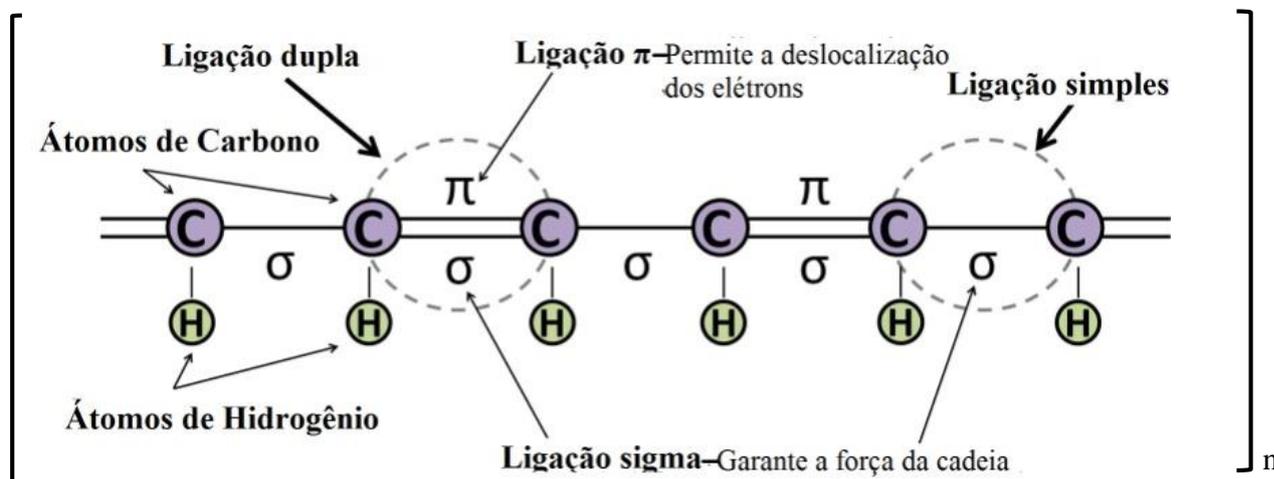


Figura 1. Esquema simplificado de uma cadeia polimérica conjugada.¹⁵

A descoberta destes materiais ocorreu quando Shirakawa e Ikeda,²⁰ demonstraram a possibilidade de preparar filmes de poliacetileno a partir da polimerização direta do acetileno, e mais tarde MacDiarmid *et al.*,²¹ trataram o poliacetileno com um ácido ou uma base de Lewis e observaram um aumento em sua condutividade em até 13 ordens de grandeza. Esse processo passou a ser chamado de “dopagem”, em analogia com o processo de dopagem em materiais semicondutores,^{22,23} onde há a remoção ou adição de elétrons à cadeia polimérica, fazendo esses materiais passarem de isolantes a condutores e vice-versa, através da oxidação (dopagem do tipo p) ou redução (dopagem do tipo n).¹⁶ A oxidação ou redução da cadeia polimérica é feita por agentes de transferência de cargas, os “dopantes”. Esses dopantes são introduzidos nas vizinhanças da cadeia polimérica durante a síntese, e são geralmente pequenos e móveis, o que ocasionará uma deformação da mesma, resultando na formação de bandas eletrônicas desocupadas na região entre a banda de valência e a banda de condução do polímero, permitindo que haja um aumento da condutividade.²⁴

O tipo de dopagem mais comumente usado nos polímeros condutores é a dopagem do tipo p, conforme ilustrado na Figura 2 (a), onde um elétron é removido do nível de energia HOMO (Orbital Molecular Ocupado de maior energia) da cadeia polimérica, gerando uma vacância positivamente carregada. A mobilidade desta vacância através da migração pelo filme

polimérico pode criar uma diferença de potencial elétrico, que pode ser estabilizado usando um ânion.²⁵

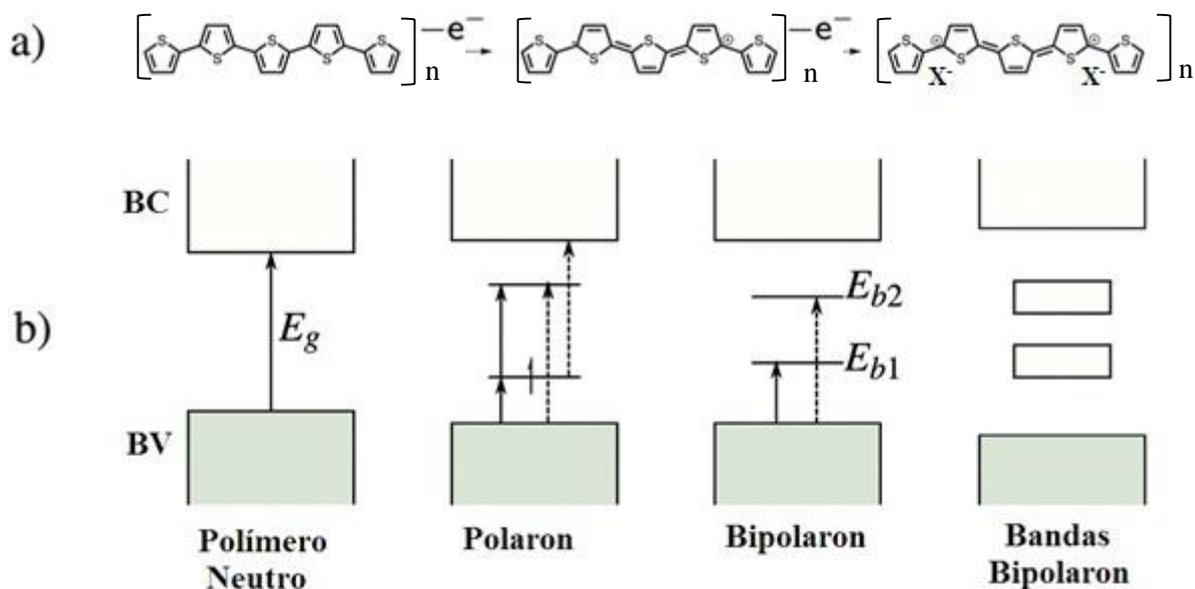


Figura 2. Mudanças estruturais associadas com a oxidação do politiofeno resultando na formação de polaron e bipolaron (a), teoria de banda de um polímero condutor (b).²⁵

Semelhantemente aos semicondutores inorgânicos, a condutividade elétrica dos polímeros pode ser explicada com base no modelo de bandas, como ilustrado na Figura 2 (b). A sobreposição de orbitais p_z , proveniente das ligações insaturadas sobre vários sítios, resulta na formação de bandas de valência (BV) (níveis eletrônicos π ocupados de maior energia) e bandas de condução (BC) (níveis eletrônicos π^* vazios de menor energia), com um pequeno *gap* (E_g) de energia entre elas, cuja largura determina as propriedades elétricas intrínsecas do material.²⁵ Essas propriedades podem ser explicadas para os polímeros aromáticos através de alguns conceitos físicos, os *polarons* e *bipolarons*, que se tratam de uma extensão do Modelo de Bandas. Através de um processo de oxidação, há a formação de um cátion radical (*polaron*) que consiste em um íon radical de carga unitária e spin $1/2$, associado com a mudança da cadeia da forma aromática para a forma quinoide. Esse processo leva à presença de estados localizados no *gap* causando um deslocamento energético da BV e da BC.^{22,26} Os estados intermediários de energia criados no *gap* durante o processo de oxidação, permitem transições eletrônicas que induzem notáveis mudanças na coloração devido a dopagem. Esse processo, que é reversível, é chamado de eletrocromismo.²⁷

Se um segundo elétron é removido da cadeia, é energeticamente mais favorável removê-lo do nível polarônico já formado do que de outra parte da cadeia, e isso leva à formação de um

dicación radical, ou seja, o *bipolaron*, que é responsável pela condução elétrica. Assim como os *polarons*, os *bipolarons* estão associados com distorções geométricas locais da cadeia.^{15,22} Assume-se que o estado *bipolaron* localmente distorcido compreende somente quatro ou cinco unidades monoméricas de um segmento polimérico e que o ganho de energia, em comparação a dois estados *polarons*, é de 0,45 eV. Em termos de energias redox, isso significa que o potencial redox E^0_{redox} para a formação do *bipolaron* poderia ser menor que o E^0_{redox} para a formação de dois *polarons*. Ambos, *polarons* e *bipolarons* podem mover-se ao longo da cadeia polimérica através do rearranjo das ligações conjugadas quando expostos a um campo elétrico.^{26,28}

Sendo os *bipolarons* responsáveis pela condução elétrica, o transporte acontece via mobilidade ao longo dos segmentos da cadeia conjugada polimérica e por saltos intercadeia (*hopping*). A condutividade elétrica do *bulk* (σ) é equivalente ao produto da concentração dos portadores livres contidos no material (n) e a sua mobilidade relativa (μ), (Equação 1), onde e é a unidade de carga eletrônica ($1,6 \times 10^{-19}$ C). Como a mobilidade do íon dopante dentro do material seco é muito baixa, estes polímeros são verdadeiramente condutores eletrônicos e não iônicos.²⁹

$$\sigma = \mu \cdot n \cdot e \quad \text{Equação 1}$$

O fator limitante da condutividade é a mobilidade do portador de carga e não a concentração. Existem no mínimo três elementos que contribuem para a mobilidade dos portadores: transporte intracadeia, transporte intercadeias e contato interpartículas. Estes elementos compreendem uma complicada e resistiva rede, a qual determina a mobilidade efetiva dos portadores. Assim, a mobilidade e, portanto, a condutividade é determinada em ambos os níveis microscópico (intra e intercadeia) e macroscópico (interpartículas).

Muitos polímeros condutores encontram-se na mesma faixa de grandeza da condutividade elétrica da maioria dos semicondutores inorgânicos (Figura 3). Semicondutores inorgânicos possuem um baixo número de portadores (na ordem de 10^{16} a 10^{18} cm^{-3}), porém possuem altas mobilidades (10^2 a 10^5 $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) atribuídas ao alto grau de cristalinidade e pureza destes materiais, e também a números baixos de defeitos na estrutura. Em contrapartida, os polímeros condutores possuem um grande número de portadores (10^{21} a 10^{23} cm^{-3}), mas uma baixíssima mobilidade (10^{-4} a 10^{-5} $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), devido principalmente ao grande número de defeitos estruturais (reticulação e desordenamento das cadeias). Desta maneira, a obtenção de polímeros condutores com maiores condutividades está diretamente relacionada ao aumento da mobilidade dos portadores. Isto pode ser viabilizado pela obtenção de materiais mais

ordenados, ou seja, com melhor orientação das cadeias, menor grau de reticulações e defeitos.^{30,31} Uma estratégia para alcançar maior ordenamento de cadeia é utilizar como dopante contra-íons orgânicos anfifílicos como, por exemplo, um corante dianiônico na dopagem tipo p, como o índigo carmin (IC), na dopagem do polipirrol.³² Esse tipo de dopante permitirá que moléculas de IC encontrem-se perpendicularmente entre as cadeias de polipirrol, facilitando o transporte de massa para o polímero, devido a um aumento no grau de ordenamento da cadeia polimérica.^{33,34} O uso de corantes como dopantes pode alterar propriedades elétricas e ópticas, ao melhorar a eficiência da transferência de carga, podem melhorar a seletividade ao se incorporar dentro do polímero condutor e também tornam a reação mais rápida, assim como os surfactantes.³⁵

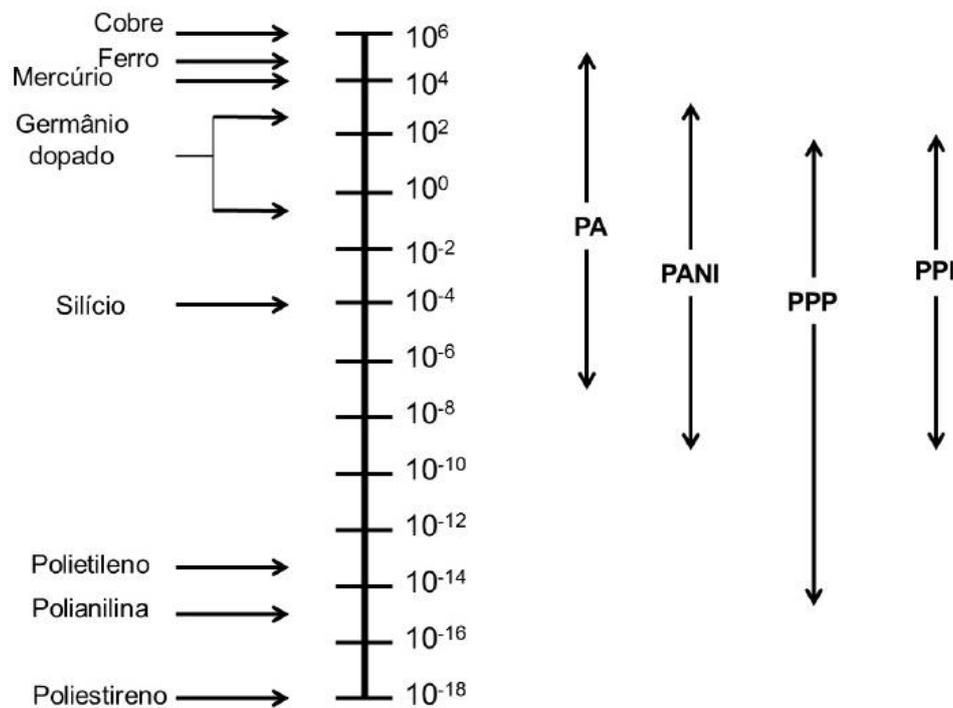


Figura 3. Comparação da condutividade de alguns (PICs) com outros materiais. PA = Poliacetileno, PANI = Polianilina, PPP = Poli (p-fenileno), PPI = Polipirrol.¹⁶

Condutividades diferentes podem ser obtidas ao se utilizar diferentes dopantes, como por exemplo, a utilização também de contra-íons inorgânicos.¹⁵ Esses tipos de dopantes (e.g. Cl^-), por serem pequenos, oferecem a vantagem de aumentarem a difusão dos contra-íons com os centros carregados dentro da matriz do polímero, além de conseguirem sair e entrar novamente na cadeia polimérica podendo sofrer trocas com outros íons. No entanto, a dopagem com contra-íons inorgânicos apresenta baixa estabilidade ambiental e a condutividade do polímero diminui drasticamente com o tempo.^{36,37} Em vista disso, a utilização de contra-íons

orgânicos como dopantes atribui ao polímero condutor maior estabilidade eletroquímica, uma vez que esses dopantes são considerados grandes como, por exemplo, surfactantes como o dodecilsulfato de sódio e, portanto estão mais integrados ao polímero, diminuindo as chances de lixiviação ao longo do tempo ou pela aplicação de estímulos elétricos.^{15,36-38}

A modificação da estrutura dos polímeros condutores afeta não somente sua condutividade, podendo também melhorar outras propriedades, o que torna esses materiais promissores para aplicações em armazenamento de energia,³⁸ eletrocromismo,³⁹ sensores,⁴⁰ entre outros.

2.2.1. Polipirrol

O polipirrol (PPi) é um dos polímeros condutores mais amplamente estudados, possui propriedades que podem ser facilmente controladas e que respondem a estímulos, tornando-o um material muito promissor para diferentes aplicações. Polipirrol pode ser facilmente sintetizado, fabricado com grande área superficial e facilmente modificado para aplicações biológicas.⁴¹⁻⁴³ Atualmente ele pode ser aplicado em uma variedade de materiais, como biossensores,⁴⁴ células solares⁴⁵ e administração de fármacos.⁴⁶ Além disso, o PPi apresenta boa biocompatibilidade, estabilidade química e alta condutividade.

A polimerização do pirrol pode ser realizada através de métodos químicos e eletroquímicos. Ambos os métodos podem ser realizados através de dopagem do tipo p, com a adição de ânions como dopantes. Na síntese química, o agente oxidante é introduzido no meio reacional provocando a formação do cátion radical. O requisito básico para a escolha do oxidante é o fato dele possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero, entre os mais utilizados estão o FeCl_3 ou o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.^{16,22,47} No entanto, apesar deste método ser efetivo, não apresenta boa reprodutibilidade quantitativa, mas ainda é amplamente aplicado em escala industrial. Por outro lado, a síntese eletroquímica é a mais utilizada, por ser mais simples, rápida e mais facilmente controlada. Este tipo de polimerização produz filmes finos de até alguns micrômetros de espessura na superfície de um eletrodo.⁴⁸

A síntese eletroquímica do PPi é baseada na oxidação anódica do monômero pirrol no eletrodo de trabalho e durante a polimerização o filme resultante é simultaneamente oxidado e dopado com os ânions presente no eletrólito. A produção, qualidade e propriedade dos filmes dependerá de fatores como a natureza e concentração do monômero e do contra íon, do solvente, das condições da cela eletroquímica (ex. eletrodo de trabalho e potencial aplicado), da

temperatura e pH.^{49,50} A reação da polimerização eletroquímica é um processo complexo e existem alguns mecanismos propostos, dentre eles, o mais aceito está ilustrado na Figura 4.⁴⁸

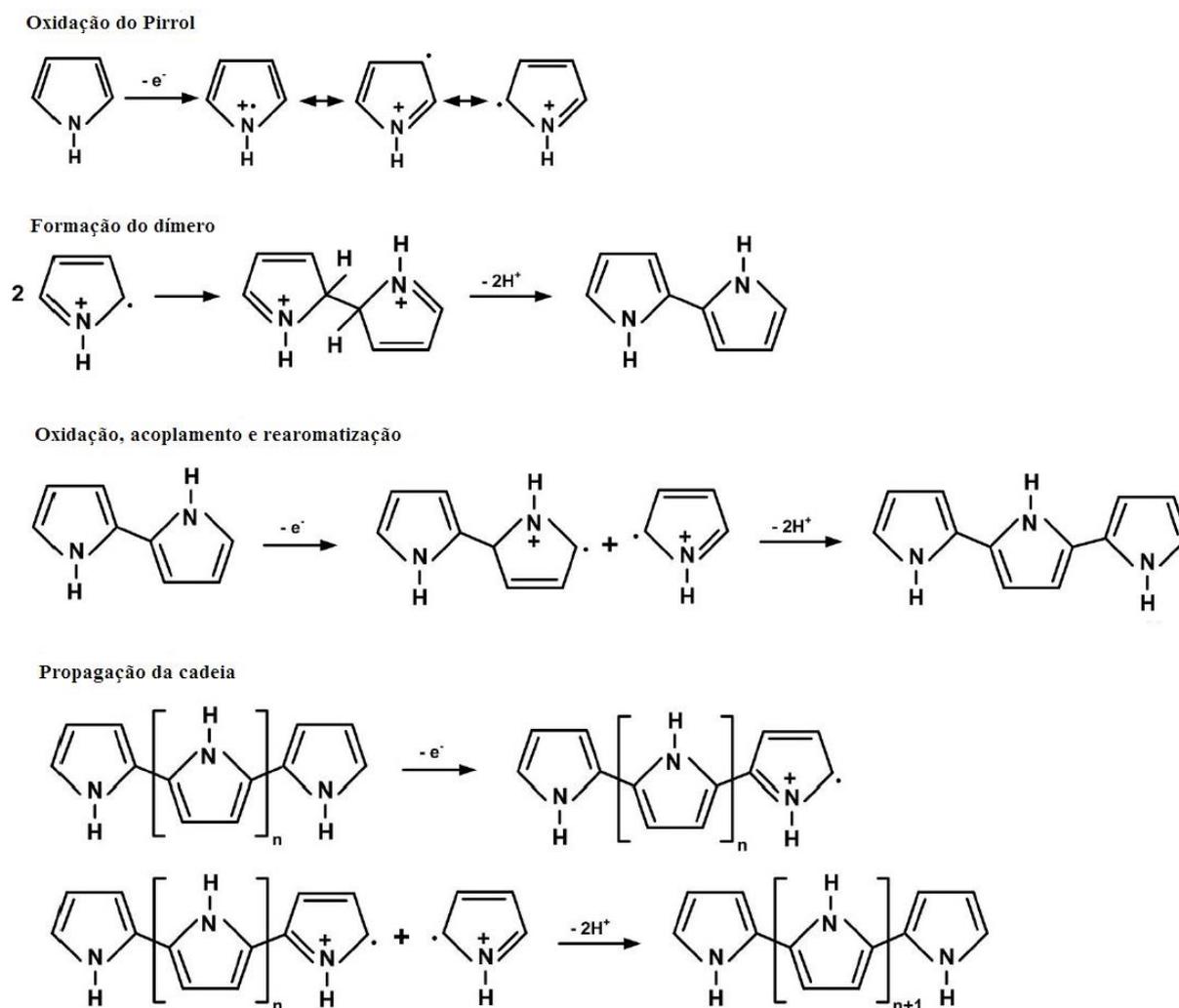


Figura 4. Mecanismo da síntese eletroquímica do Polipirrol.²⁴

No primeiro passo, ocorre a oxidação do monômero formando um cátion radical, o segundo passo envolve o acoplamento de dois cátions radicais com a saída de dois prótons, e reconstituição do sistema aromático, formando uma espécie neutra. A reação continua com o acoplamento de cátions radicais do monômero e cátions radicais dos oligômeros formados.^{16,51} O crescimento da cadeia é terminado quando o cátion radical da cadeia que ainda está polimerizando se torna não reativa, ou quando a cadeia se torna estericamente bloqueada. Para a obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação deve-se levar em consideração a estabilidade do cátion radical do monômero, uma vez que um cátion radical muito estável pode difundir do eletrodo dando origem a oligômeros solúveis, enquanto que um cátion radical muito

reativo pode sofrer reações colaterais.¹⁶ A cadeia final do polímero apresenta uma carga positiva a cada 3 ou 4 unidades de anéis de pirrol, que é contrabalanceada por um ânion.⁵¹

O crescimento ideal das cadeias do PPI consiste em acoplamentos nas posições 2 a 5 dos átomos de carbono do anel pirrólico, situação em que a conjugação entre as ligações simples e duplas é maximizada. No entanto, acoplamentos em outros átomos de carbono também ocorrem, diminuindo a mobilidade dos portadores de carga. Estima-se que cerca de 30% das ligações C-C entre os anéis pirrólicos não são do tipo ideal. A representação desses defeitos que podem ser encontrados no PPI estão representados na Figura 5.^{16,52,53}

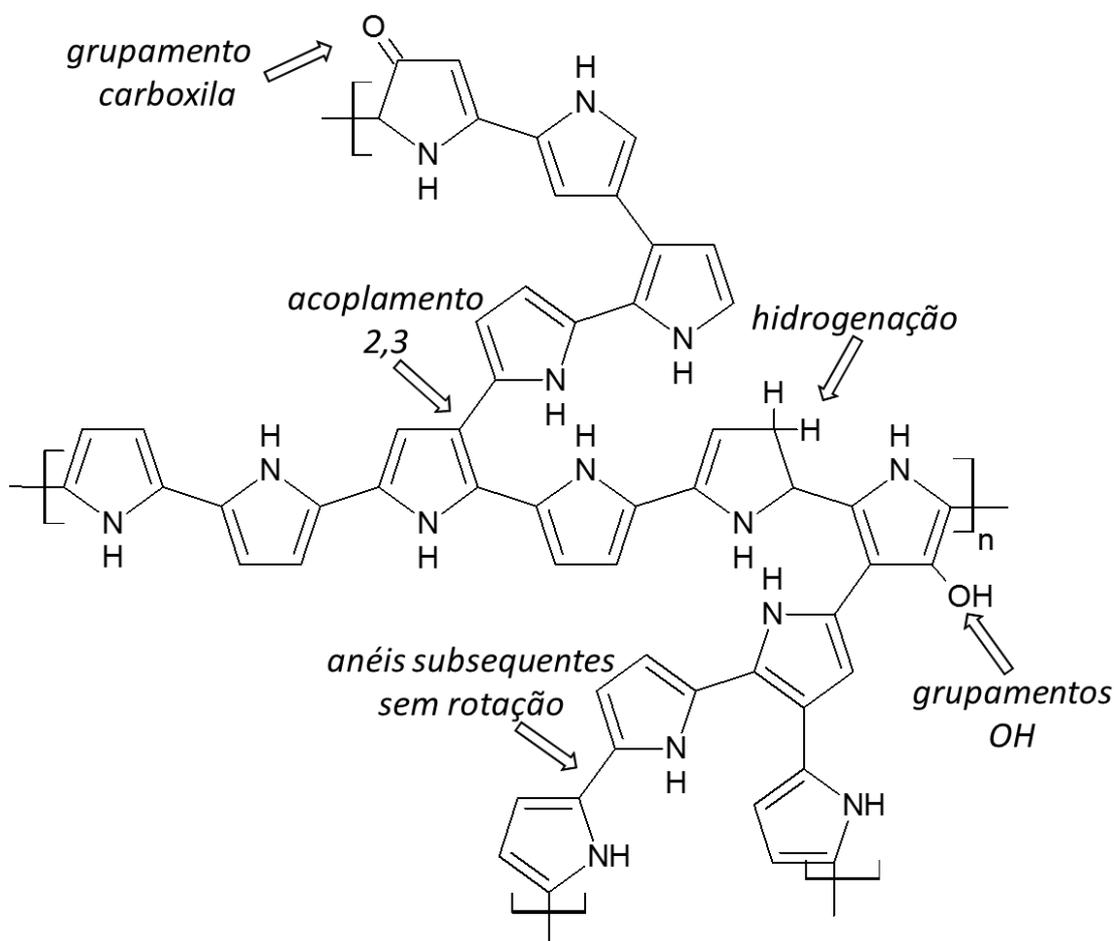


Figura 5. Representação dos possíveis defeitos estruturais encontrados no polipirrol.⁵⁴

A evolução da estrutura de bandas para o PPI pode ser observada conforme a Figura 6, onde encontram-se diferentes níveis de oxidação (dopagem). A energia de *gap* entre as BV e BC no seu estado reduzido é de 3,2 eV, o que faz com que o PPI apresente uma condutividade muito baixa. Com a oxidação da cadeia polimérica (em baixo grau de oxidação), ocorre inicialmente a formação do cátion radical (*polaron*), podendo ser observadas três diferentes bandas de absorção relacionadas a diferentes transições: em 0,7 eV possivelmente associada à transição do topo da BV para o estado *polaron* ligante, em 1,4 eV podendo ser relacionada com

a transição do estado *polaron* ligante para o estado *polaron* antiligante, e em 2,1 eV atribuído à transição do *polaron* ligante para o estado *polaron* antiligante. Aumentando-se os níveis de dopagem (maior grau de oxidação), ocorre a formação de dicátions *bipolarons*, levando a formação de múltiplos estados diiônicos, responsáveis pelo aumento da condutividade do polipirrol, podendo ser evidenciadas duas bandas de absorção, em 1,0 eV e 2,7 eV, associadas à existência das bandas *bipolarons* formadas na região de *gap*.²⁶

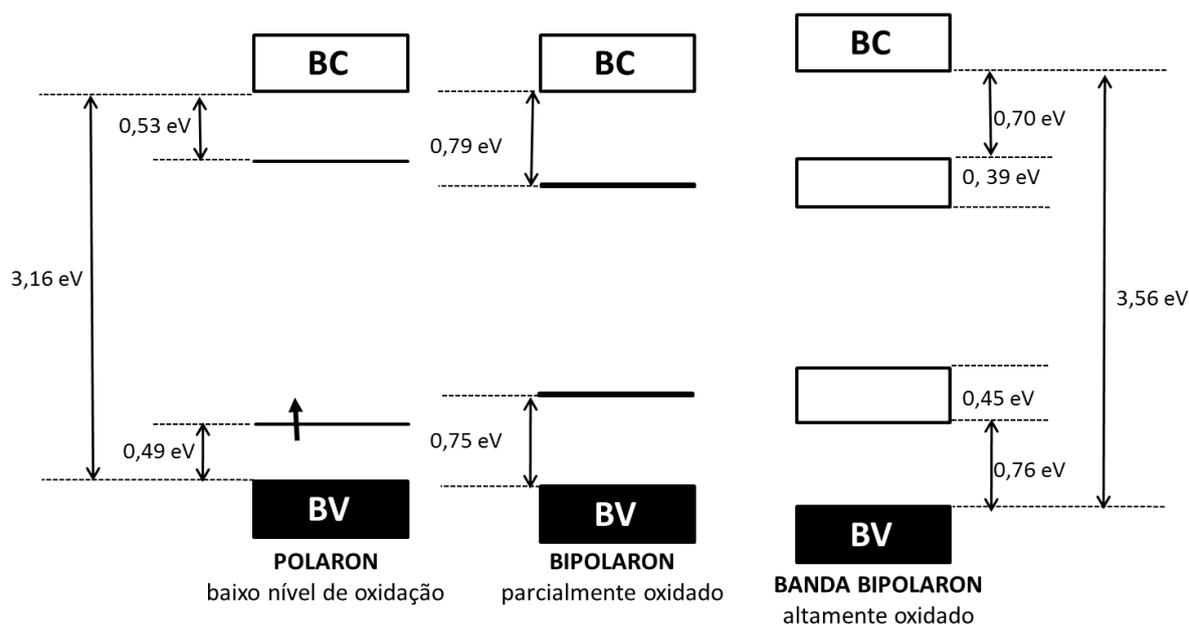


Figura 6. Esquema da evolução da estrutura de bandas para o polipirrol.⁵⁴

2.2.2. Nanocompósitos de Polímeros Condutores

Nanocompósitos de PICs se tornam materiais interessantes de estudo para melhorar suas propriedades físicas e químicas, como as propriedades de flexibilidade mecânica, óptica e elétrica, condutividade elétrica e magnética, etc.⁵⁵ Nanocompósitos de PICs e nanopartículas metálicas (M-NPs) contribuem para a criação de novos materiais com potencial para aplicações em diversas áreas de interesse científico e tecnológico, pois as M-NPs apresentam propriedades distintas dos materiais com escala macroscópica, destacando-se principalmente suas propriedades ópticas, enquanto os PICs são caracterizados tanto por suas propriedades elétricas quanto ópticas, tornando ambos elementos relevantes para diferentes aplicações, em particular em biossensores ópticos ou eletroquímicos, eletrocatalise e no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos.⁵⁶⁻⁵⁸

Nanocompósitos de PICs e M-NPs são facilmente obtidos através de métodos eletroquímicos de síntese, permitindo obter de forma simples M-NPs inseridas em filmes finos de PICs, apresentando grande aplicabilidade em diversas áreas de interesse tecnológico e científico, além de apresentarem um forte apelo na área de nanotecnologia.^{59,60} Recentes trabalhos vêm demonstrando que ao se incorporar M-NPs à matriz de PICs durante os processos de polimerização, pode-se aprimorar as propriedades ópticas, elétricas, eletroquímicas e eletrocromáticas desses materiais.⁶¹⁻⁶³ A interação entre os PICs e as M-NPs, ocorre possivelmente através de um grupamento doador de elétrons, presente no polímero. Por exemplo, no caso de polímeros condutores contendo átomos de enxofre na sua estrutura, as interações químicas ocorrem entre os metais nanoparticulados e o enxofre (Metal-S). Em aplicações biológicas, a M-NP serve como a interface entre a biomolécula e o polímero, enquanto se mantém inalterada a estrutura das biomoléculas, de uma forma sensível e estabilizada.⁶⁴

Dentre as M-NPs, as nanopartículas de ouro ganham destaque por serem nanomateriais inorgânicos com excelentes propriedades químicas e físicas que dependem do seu tamanho e forma, exibindo atividade catalítica, ressonância de plasmon de superfície localizado a temperatura ambiente, alta condutividade, excelentes propriedades ópticas, além de serem biocompatíveis.^{65,66} Por outro lado, entre os polímeros condutores, destacamos o PPI, que devido a sua alta condutividade tornou-se extensivamente investigado, podendo ter suas propriedades químicas e físicas melhoradas através da obtenção de nanocompósitos.

Uma variedade de métodos tem sido explorada para se obter nanocompósitos de polipirrol e nanopartículas de ouro, onde a maioria das propriedades desejáveis dos nanocompósitos depende da dispersão das nanopartículas e das propriedades de superfície. Alguns exemplos de nanocompósitos com PPI reportados na literatura incluem nanopartículas de Ag, Au, Pt e Pd, e apresentam diversas aplicações, como materiais com atividade eletrocatalítica, hidrofóbicos, eletrocatalizadores e sensores químicos, respectivamente.⁶⁷⁻⁷⁰ O método eletroquímico é um dos métodos mais descritos na literatura para obtenção destes nanocompósitos.⁷¹ Nesse tipo de síntese, a oxidação do monômero prossegue em potenciais positivos de um ciclo voltamétrico, ou durante o pulso oxidativo galvanostático. A nucleação e o crescimento das partículas metálicas são iniciados em potenciais negativos de um ciclo voltamétrico, ou durante o pulso redutor galvanostático. Portanto, tanto a polimerização quanto a redução dos íons metálicos ocorrem na mesma solução.⁷² A síntese eletroquímica pode ser realizada por eletrodeposição do polímero condutor a partir de uma solução contendo as nanopartículas de ouro em suspensão ou também pela preparação *in situ* de nanopartículas na

matriz do polímero, já que os polímeros condutores são matrizes adequadas para fabricação de nanocompósitos com nanopartículas metálicas por permitirem um fácil fluxo de cargas eletrônicas durante os processos eletroquímicos. Além disso, a adição de ânions sulfonatos volumosos, como o dodecilsulfato de sódio, podem auxiliar na formação de nanopartículas, já que podem atuar simultaneamente como dopantes e estabilizantes.⁷²⁻⁷⁴

2.3. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS ELETROQUÍMICOS

Biossensores surgiram do interesse em se desenvolver e explorar dispositivos analíticos para a detecção, quantificação e monitoramento de uma espécie química específica, pois são capazes de apresentar alta sensibilidade e especificidade.⁷⁵ Além disso, reduzem o tempo necessário para as análises, são encontrados em tamanhos miniaturizados; são fáceis de manusear, são portáteis - o que facilita análises de campo - e, finalmente, apresentam baixo custo. Apresentam vantagens quando comparados às técnicas analíticas convencionais, como a cromatografia, pois estas requerem instrumentações custosas que não se aplicam à análises de campo, além de consumirem muito tempo.⁷⁵⁻⁷⁷ Como consequência, estes sensores têm se mostrado ferramentas muito importantes para a análise de produtos químicos e biológicos que contaminam o meio ambiente, agentes patogênicos presentes em alimentos, vírus etc.⁷⁸

Os biossensores são formados principalmente por dois componentes, como representado na Figura 7.⁷⁹ O transdutor (converte o sinal biológico para um sinal mensurável) e uma parte de reconhecimento biológica (enzimas, DNA, microrganismos, anticorpos). O desenvolvimento de um biossensor pode apresentar dois aspectos problemáticos: i) a incorporação/imobilização de biocomponente a uma matriz adequada e ii) monitoramento da interação entre os analitos e o biocomponente.^{76,80,81} Estes aspectos podem ser contornados com a utilização de nanocompósitos de PICs com M-NPs, uma vez que os PICs são compatíveis com componentes biológicos, o que facilita a transferência de elétrons na superfície de eletrodos, bem como as M-NPs, que além de auxiliarem na transferência de elétrons, apresentam uma grande área superficial, o que facilita a imobilização de biocomponentes, e também contribuem na catálise de possíveis reações entre os componentes biológicos e analitos de interesse.⁷⁶ PPI e Au-NPs tem sido amplamente explorados neste tipo de aplicação.^{44,82}

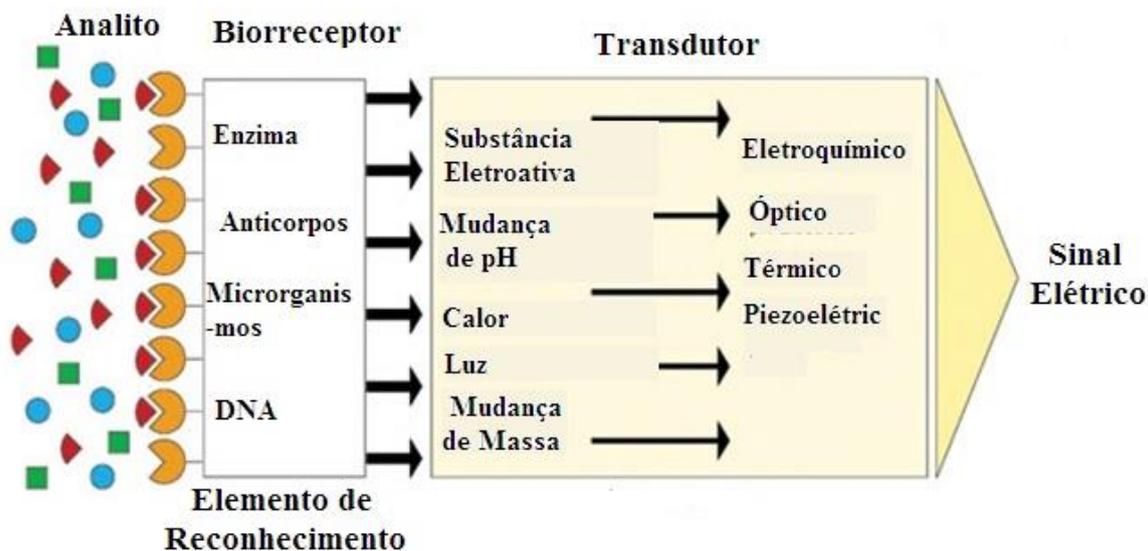


Figura 7. Representação esquemática de um biossensor.⁷⁹

Biossensores enzimáticos são considerados os mais utilizados nesse tipo de ferramenta analítica, quando comparado com imunossensores, genossensores (utilizam ácidos nucleicos) e sensores baseados em microrganismos.^{77,80} Nesse tipo de biossensor a enzima é o elemento de reconhecimento e ela reage seletivamente com o substrato (analito). Esse biossensor pode funcionar mensurando a ação ou inibição da enzima quando em contato com o analito. Por exemplo, a enzima pode metabolizar um analito e assim a concentração da amostra pode ser medida através da transformação catalítica do analito pela enzima; ou, a enzima pode ser inibida pelo analito, e a concentração do mesmo poderá ser medida através da diminuição na formação do produto enzimático.⁸⁰

Os biossensores enzimáticos baseados na inibição apresentam uma alta sensibilidade e oferecem respostas rápidas, ideais para aplicação na monitoração direta de componentes, além de detectar tanto o inibidor quanto o substrato. Alguns inibidores podem tanto se ligar a enzima quanto ao complexo enzima-substrato, o que gera mudanças nas reações enzimáticas. A maioria das enzimas são suscetíveis a baixas concentrações de inibidores, o que causa o aumento na sensibilidade do biossensor.⁷⁵

2.3.1. Enzimas

As enzimas se caracterizam por serem biomoléculas complexas formadas por longas cadeias de aminoácidos interligados através de ligações peptídicas, resultando em uma elevada massa molar. Sua atividade pode ser baseada na ação (sítio ativo) de alguns resíduos de aminoácidos que compõem sua estrutura. Algumas enzimas porém só atuam no substrato na

presença de grupamentos não proteico (cofatores), por exemplo, íons metálicos. Isto faz com que estas biomoléculas apresentem um elevado grau de especificidade nas reações catalisadas. Conforme a natureza destas reações pode-se fazer a classificação das enzimas em seis grupos, que foram agrupados pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, em inglês):

Tabela I. Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.⁸³

Classe	Subclasse	Exemplos de reação catalisada
Oxidoreductases	Oxidação e redução	Peroxidases, hidrogenases
Transferases	Transferência de grupos funcionais	Transaldolases, transcetolases
Hidrolases	Hidrólise de ligações	Lipases, fosfatases
Liases	Adição de grupamento a duplas ligações/formação de duplas ligações pela remoção de grupamentos	Descarboxilases, desidratases
Isomerases	Isomerização do substrato	Racemases
Ligases	Formação de ligações	Sintetases

A inibição de enzimas ocorre através da incorporação de inibidores ao sistema, diminuindo sua atividade enzimática, que pode ser medida antes (I_0) e depois da inibição (I_1) pelo cálculo $((I_0 - I_1)/I_0) \times 100\%$. Esse fenômeno pode ser reversível, na qual a ligação de um inibidor pode ser revertida conforme se diminui a concentração do mesmo, ou irreversível, na qual a ligação do inibidor resulta na inibição permanente da atividade enzimática.^{75,77} Inibição reversível pode ser dividida em inibição competitiva, não competitiva e incompetitiva.⁷⁵ Por outro lado, a inibição irreversível, apesar de causar a inibição permanente da enzima, ocorre de forma gradual, onde sua atividade inicial nunca pode ser obtida novamente. As inibições irreversíveis são características de biossensores enzimáticos usados para a detecção de pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos.^{75,77,78} Ambos compartilham do mesmo mecanismo de inibição da colinesterase.

2.3.1.1. Acetilcolinesterase

A Colinesterase é uma família de enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que resulta na produção de colina e ácido acético, e podem ser encontradas em vertebrados e insetos. No corpo humano, é responsável pela transmissão de impulsos nervosos para as sinapses colinérgicas, essa reação é essencial para que o neurônio colinérgico volte para o estado de repouso após a ativação.^{75,77} A enzima colinesterase pode ser dividida em dois tipos, Acetilcolinesterase (AChE) E.C.3.1.17, que é uma hidrolase, e a Butirilcolinesterase (BChE) E.C.3.1.1.8, ambas tem sido amplamente usadas como biorreceptores na fabricação de biossensores, e especificamente em biossensores para pesticidas no caso da AChE.⁸⁴ A Figura 8 mostra uma representação em 3D da estrutura da enzima AChE.⁸⁵

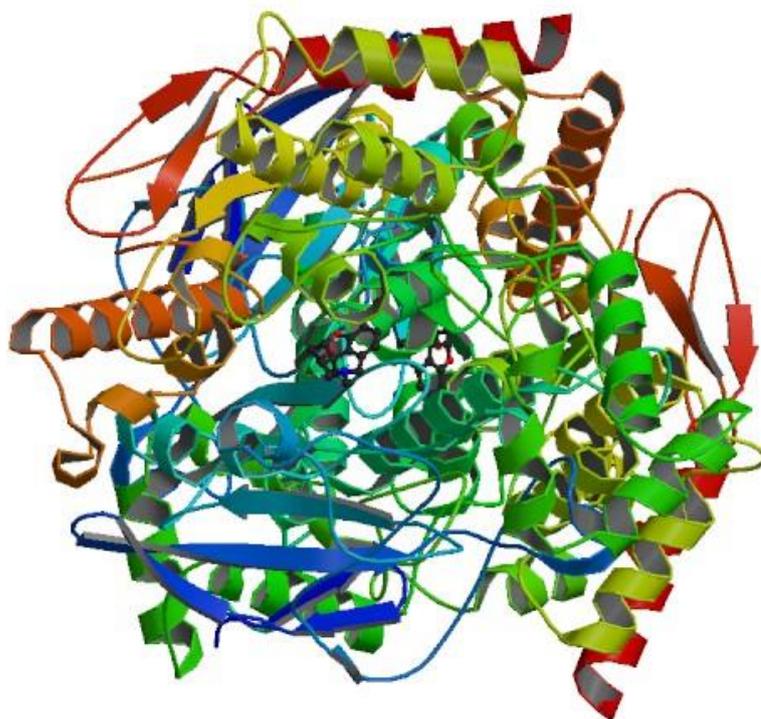


Figura 8. Estrutura 3D da enzima Acetilcolinesterase E.C.3.1.1.7.⁸⁵

Em sinapses nervosas, a AChE encerra a transmissão do impulso nervoso pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. O efeito tóxico de pesticidas OPs e carbamatos está relacionado com sua habilidade de se ligar irreversivelmente ao sítio ativo da enzima, e por consequência impedem a transmissão dos impulsos nervosos, o que pode levar a impactos severos em funções nervosas.^{86,87} O sítio ativo da AChE possui duas regiões distintas, um sítio aniônico contendo um grupo carboxílico de resíduo de glutamato e um sítio com um grupo

serina-OH, no qual ocorre a hidrólise da acetilcolina.⁸⁸ Durante o processo de inibição da enzima, os OPs realizam uma fosforilação no sítio ativo da enzima que se torna bem estável, fazendo com que a hidrólise da acetilcolina seja bloqueada. Esta inibição pode ser reversível ou não, dependendo da estrutura do pesticida. Quando reversível, pode ser recuperada através da utilização de nucleófilos fortes, como o íon 2-metilpiridínio-2-aldoxime.

Como a catálise realizada pela enzima na acetilcolina envolve transferência de elétrons, sua atividade pode ser monitorada através de técnicas eletroquímicas e o processo de inibição, deve reduzir a corrente resultante desta transferência de elétrons. Este é o princípio básico que possibilita a detecção de pesticidas em diferentes amostras através de biossensores.

2.3.2. Biossensores para pesticida baseados na inibição da Acetilcolinesterase

A maioria dos pesticidas organosintéticos apresenta alta afinidade com o mercúrio,⁸⁹ razão pela qual a técnica de polarografia foi historicamente utilizada na detecção destas espécies.⁹⁰⁻⁹² No entanto, apesar desta técnica apresentar limites de detecção extremamente baixos, o manuseio de mercúrio vem sendo cada vez mais restrito. Em virtude disto, ocorreu um crescente avanço no estudo de eletrodos modificados que fossem diferentes daqueles contendo mercúrio, ampliando a capacidade de análise de pesticidas através de técnicas eletroquímicas. Os limites de detecção obtidos com os eletrodos modificados são maiores que os obtidos através do método cromatográfico. Como os limites máximos permitidos para pesticidas em alimentos são extremamente baixos, na ordem de algumas partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$), limites de detecção muito baixos se tornam necessários. Uma alternativa para tentar melhorar este limite de detecção e a sensibilidade destes eletrodos é utilizar materiais nanoestruturados na confecção dos biossensores, pois estes nanomateriais podem suprir a lacuna tão importante e necessária frente à determinação de analitos de interesse.

Devido às inconveniências das técnicas comumente utilizadas na detecção destes pesticidas, várias linhas de pesquisas têm trabalhado com o objetivo de viabilizar o desenvolvimento de métodos de análise simples, com menor custo e que permitam análise de campo.⁹³⁻⁹⁵ Como resultado, ocorreu um crescimento pronunciado na área de desenvolvimento de sensores, não somente para a detecção de pesticidas, mas também para aplicações em diferentes áreas, como biomédica, ambiental, industrial, agro-industrial, dentre outras. A Tabela II resume alguns resultados obtidos por pesquisadores para diferentes materiais utilizados na obtenção de biossensores baseados em AChE para detecção de pesticidas.

Tabela II. Biossensores para pesticida baseados em AChE imobilizada em polímeros condutores.

Biossensor	Transdutor	Analito	Imobilização	LD	Ref.
AChE/Au-PPy-rGO	Potenciométrico	Paraoxon Etil	Eletropolimerização	0.5 nM	44
AChE-PAn-PPy-MWCNTs	Potenciométrico	Malation	Adsorção física	1.0 ng mL ⁻¹	96
AChE-Au-PPy/GCE)	Potenciométrico	Paration Metílico	Aprisionamento	2 ng mL ⁻¹	40
poly(SNS-NH ₂)/AChE-ChO	Amperométrico	Paraoxon Etil	Ligação covalente	111 μM	97
PPy-AChE-Geltn- Glut	Amperométrico	Paraoxon Etil	Ligações cruzadas	1.1 ppb	98
AChE/PEDOT-MWCNTs/FTO	Amperométrico	Malation	Ligação covalente	1 fM	99
GC/MWCNT/PANI/AChE	Cronoamperométrico	Carbaril e Metomil	Adsorção física	1.4 μmol L ⁻¹ e 0.95 μmol L ⁻¹	100
poly(TTP)/AChE/GCE	Potenciométrico	Malation	Ligação covalente	4.08 nM.	101
f-MWCNT/poly(SNS-NH ₂)/AChE	Amperométrico	Paraoxon, Paration e Clorfenvinfós	Ligação covalente	0.5 – 5 ng L	102

O mecanismo utilizado na detecção depende da classificação do pesticida estudado. No caso de biossensores eletroquímicos que utilizam a AChE, a detecção é baseada na inibição desta enzima. Quando o analito (pesticida) não está presente na solução de acetilcolina (eletrólito), o substrato acetilcolina é convertido em colina e ácido acético. A colina é eletroativa

e sofre oxidação em baixos potenciais.¹⁰³⁻¹⁰⁷ Na presença do pesticida a conversão de acetilcolina nos produtos diminui, assim como o sinal elétrico obtido, visto que, a inibição faz com que menos colina seja produzida. Além disso, a corrente anódica é inversamente proporcional a concentração do pesticida.^{86,87,108,109} Esse processo está demonstrado na Figura 9, onde a mesma reação que ocorre com a acetilcolina, ocorre também com acetiltiocolina, seguindo o mesmo princípio e formando a tiocolina, que também é uma espécie eletroativa.

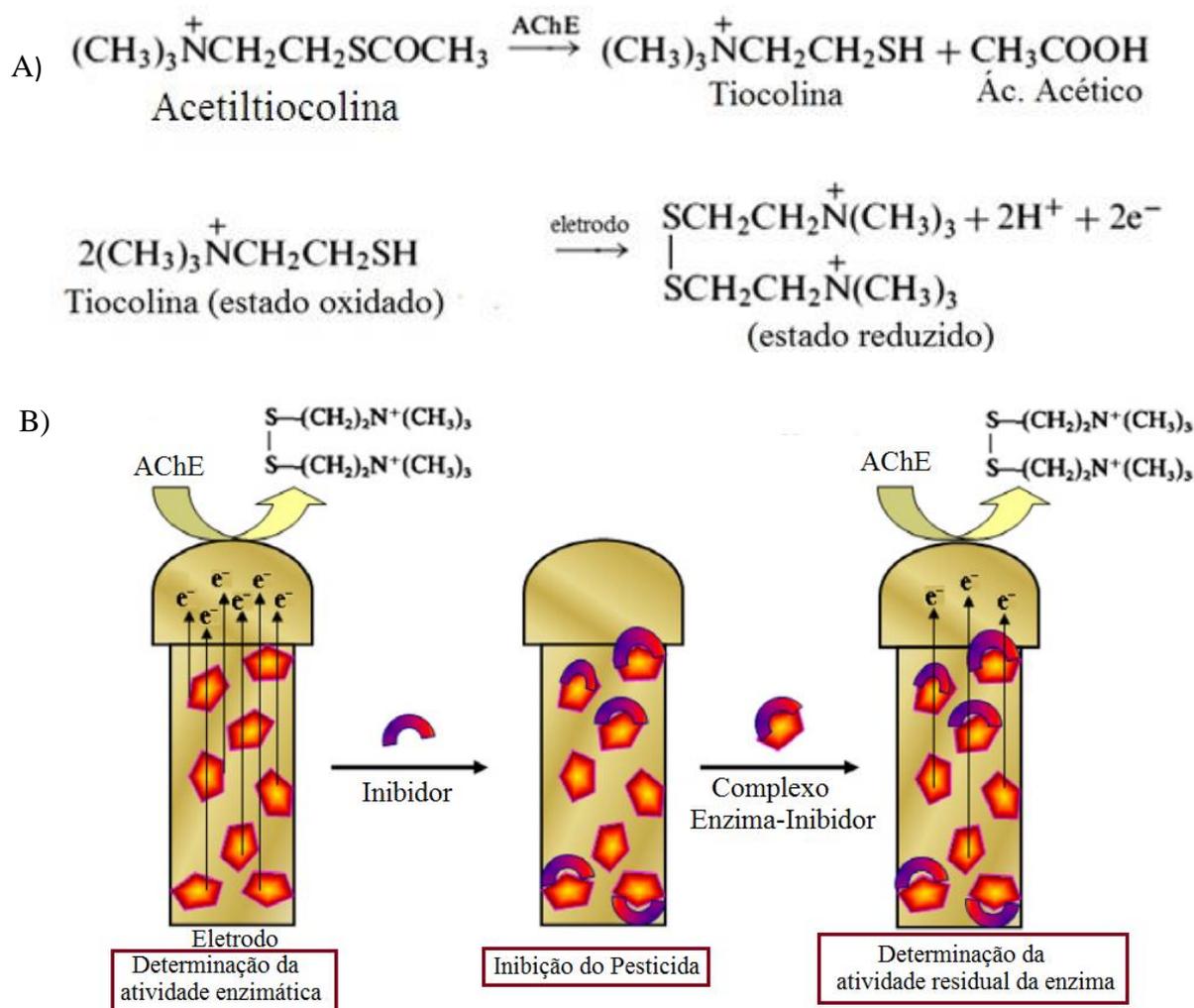


Figura 9. A) Reações eletroquímicas envolvidas na resposta de biossensores baseados em AChE. B) Estratégia para a medição da inibição da AChE imobilizada.⁸⁶

As enzimas podem ser imobilizadas na superfície de um eletrodo e ter sua resposta mensurada pelo transdutor, sendo os mais utilizados os potenciométricos e amperométricos. O processo de imobilização das enzimas é o passo crucial para o funcionamento do biossensor, podendo aumentar o tempo de vida do material e a estabilidade enzimática. Em virtude disto, várias técnicas têm sido estudadas baseando-se na interação entre a enzima e o material

depositado no eletrodo, buscando melhorar propriedades como a sensibilidade, o tempo de resposta e a reprodutibilidade do biossensor.^{80,86} No processo de imobilização, as enzimas são fixadas em um suporte e isto resulta em várias vantagens comparado às enzimas livres, como alta estabilidade, possibilidade de reutilização, maior tempo de vida, menor custo e pode ter a atividade aumentada. Para obter estas vantagens é necessário escolher o método adequado (suporte e reagentes) para manter a integridade do sítio ativo da enzima, mantendo ele disponível para a atividade catalítica. Existem várias técnicas de imobilização podendo propiciar a adsorção física, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e por ligações cruzadas (*cross-linking*).^{77,110} As diferentes técnicas estão resumidas na Figura 10.⁸⁶

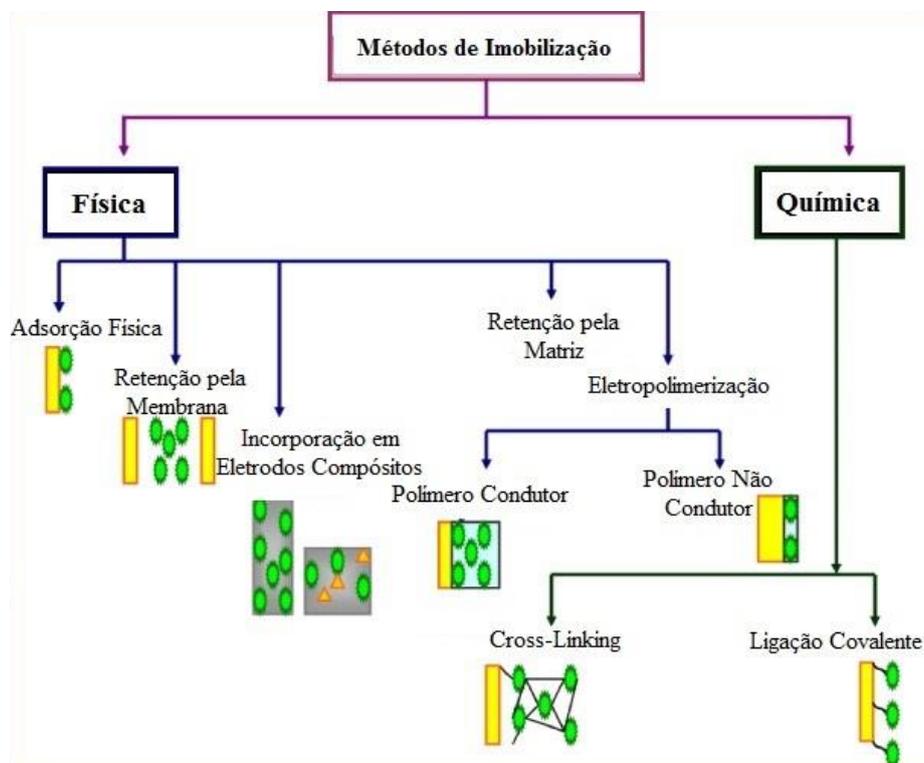


Figura 10. Técnicas de imobilização utilizadas no desenvolvimento de biossensores baseados em AChE.⁸⁶

- Adsorção física:

É um dos métodos mais utilizados devido sua simplicidade. Genericamente consiste da simples deposição da enzima na superfície do eletrodo de trabalho e a fixação da mesma através de ligações fracas como as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio fracas e interações eletrostáticas entre a enzima e o transdutor. Esse método não causa danos à enzima, é uma maneira simples e de baixo custo de imobilização, não acarreta mudanças químicas no suporte e é reversível ao permitir a regeneração da enzima livre. Porém, apresenta tempo de resposta

pequeno, baixa estabilidade operacional e de armazenamento e é sensível a mudanças de temperatura, pH e força iônica, podendo ocorrer dessorção das enzimas.^{110,111} O suporte utilizado neste método de imobilização geralmente apresenta superfície ativa, como o grafite e a alumina.

- Aprisionamento da Enzima:

Aprisionamento em matrizes sol-gel e em estrutura de uma matriz polimérica ou membrana também têm sido usados na modificação dos eletrodos. É feito de forma a reter a proteína ao mesmo tempo em que ocorre a penetração do substrato. Este método de aprisionamento, quando ocorre em um polímero insolúvel, ocorre o confinamento da enzima nos espaços formados entre as ligações covalentes cruzadas não sofrendo nenhuma modificação na estrutura da enzima. Pode-se utilizar também microcápsulas, de forma que a enzima fique recoberta pelo sistema, não interagindo com o suporte e mantendo facilmente sua atividade. O método de aprisionamento possui a vantagem de imobilizar várias enzimas em uma só etapa e tem como principal desvantagem a diminuição da atividade enzimática durante a utilização, devido à perda de enzimas pelos poros maiores. Adicionalmente, é um procedimento barato e simples que pode ser feito a temperatura ambiente sem causar danos à enzima. No entanto, apresentam problemas de reprodutibilidade, controle do tamanho do poro e barreiras de difusão.^{86,112}

- Ligação Covalente:

É um método muito utilizado por permitir que a enzima se ligue fortemente ao suporte sólido com grupos reativos como hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico e tiol, diminuindo o processo de dessorção e permitindo uma maior estabilidade quanto a variações de pH, força iônica e natureza do solvente. É o procedimento mais utilizado, por exemplo para AChE, onde a enzima pode ser ligada covalentemente na superfície do transdutor através de uma ligação covalente estável entre grupos funcionais da enzima e do transdutor. O método tem bom tempo de resposta, não apresenta barreiras de difusão e por ter uma vasta gama de escolhas para selecionar o material portador, torna-se flexível quanto a propriedades químicas e físicas específicas. Apesar disso, é necessária uma grande quantidade de enzima e os procedimentos são complicados e caros.⁸⁶ Adicionalmente, pode ocorrer perda de atividade devido a possíveis ligações com os grupos funcionais dos sítios ativos da enzima.

- Ligações cruzadas:

Trata-se da fixação da enzima por ligações covalentes cruzadas entre a enzima e os grupos funcionais do suporte. Cria-se uma rede através de reagentes reticulantes e ativadores, como diazobenzidina, carbodiimida, ácido bisdiazobenzidínico, triclorotriazina, sendo que o reagente mais empregado é o glutaraldeído, pois confere a enzima uma boa estabilidade. A partir do glutaraldeído forma-se oligoglutaraldeído, que se liga covalentemente à extremidade amino da enzima, formando então uma rede. Ocorre também ligação cruzada via interações físicas (iônicas), onde atrações eletrostáticas fortes passam a ocorrer entre as regiões catiônicas do polímero e aniônicas de uma molécula ligante. Esse procedimento é rápido, simples e é realizado em etapa única, porém ele apresenta baixa estabilidade por ser sensível a mudanças de pH e força iônica do meio.¹¹⁰

- Eletropolimerização:

Este é um método simples que envolve a imobilização controlada de enzimas na superfície de eletrodos. Consiste da aplicação de um potencial ou corrente ao transdutor imerso em solução contendo a enzima e as moléculas do monômero. O polímero é formado na superfície do eletrodo, e as moléculas da enzima próximas a superfície do eletrodo são incorporadas fisicamente dentro da rede do polímero em crescimento. A eletropolimerização pode ser feita ao se manter o filme em um potencial de oxidação adequado ao monômero ou ao usar voltametria cíclica consecutiva em uma região de varredura potencial adequada. Esse tipo de procedimento tem a habilidade de revestir o eletrodo, controlar a espessura do filme e prevenir interferências ou incrustação do eletrodo. Mas o processo é restrito a polímeros condutores, o que limita os tipos de superfícies que podem ser eletropolimerizadas.^{81,110}

Investigação de novas metodologias de modificação de materiais para melhorar a imobilização de enzimas, e por consequência a sensibilidade dos biossensores têm sido constantemente estudadas. O uso de materiais como os polímeros condutores com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono ou óxido de grafeno combinado com nanopartículas de ouro e polímeros condutores mostram-se promissores como matrizes para diferentes métodos de imobilização de enzimas, bem como o uso de diferentes transdutores.

As metodologias de imobilização buscam evitar o desprendimento da enzima, para que não sejam necessários processos de pré-tratamento demorados.¹⁰⁸ No entanto, busca-se também, cada vez, mais simplificar a metodologia de imobilização. Como as propriedades dos polímeros condutores, como a espessura do filme, grau de funcionalização, condutividade,

podem ser ajustadas conforme a necessidade, neste trabalho objetivamos sintetizar e estudar filmes de nanocompósitos de polipirrol com nanopartículas de ouro dopados com um corante e surfactante afim de se obter um material melhorado que permita o desenvolvimento de um biossensor com elevada sensibilidade, utilizando-se um método simples, mas efetivo para a imobilização da enzima AChE.

2.3.3. Pesticidas

Pesticidas são substâncias químicas naturais ou sintéticas e passaram a ser explorados na década de 1940, para combater pragas nas atividades agrícolas e pecuárias e também para o controle de doenças (Chagas, Malária e Febre Amarela). Eles são classificados de acordo com a sua finalidade, como bactericida, fungicida ou inseticida. Atualmente, pesticidas continuam tendo papel fundamental no controle de doenças, bem como a prevenção da perda de cerca de 40% dos alimentos produzidos na agricultura. No entanto, o uso descontrolado destes pesticidas resulta em contaminação ambiental e problemas de saúde na sociedade.¹

No Brasil, os pesticidas foram utilizados primeiramente em programas de saúde pública e a partir da década de 1960 passou a ser usado mais intensivamente na agricultura. Atualmente, é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, devido a sua extensa área de plantio e por ainda ser liberada a utilização de produtos que já foram proibidos na União Europeia e Estados Unidos.¹¹³

Todos os pesticidas são substâncias tóxicas, e seu perigo ao ser humano está relacionado com a toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo de exposição ao produto. A toxicidade pode ser medida de várias maneiras, mas geralmente em humanos é baseada em testes realizados em ratos ou em outros animais. A avaliação mais comum de toxicologia é dada pela dose letal 50, ou DL₅₀, que é definida como a dose derivada de uma substância que causará previsivelmente a morte de 50% de uma população de animais testados, à qual pode ser administrada por via oral, dérmica, inalação ou intravenosa. Quanto menor for o valor de DL₅₀, mais tóxico será o pesticida.¹¹⁴

Atualmente, mais de 800 ingredientes que pertencem a mais de 100 classes de substâncias encontram-se presentes em vários pesticidas comerciais. Dentre os grupos mais importantes, destaca-se os pesticidas organoclorados, organofosforados e organonitrogenados.

Os pesticidas organofosforados (OPs) e organonitrogenados tornaram-se os mais utilizados, pois apresentam meia-vida ambiental pequena, menor toxicidade comparada à organoclorados e uma ampla faixa de aplicação e baixo custo.⁷ Os pesticidas da classe OPs são

os mais utilizados mundialmente, entre eles, destacam-se os compostos clorpirifos, metil paration, monocrotofós e paraoxon. Esses compostos consistem de um átomo central de fósforo com uma ligação dupla com oxigênio ou ligação dupla com enxofre, conforme mostra o esquema da Figura 11, onde R¹ e R² são geralmente grupos alquil ou aril e o grupo X pode ser qualquer grupo entre uma variedade de grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos, substituídos e ramificados, que ligam-se ao átomo de fósforo e atuam como grupo de saída.¹¹⁵

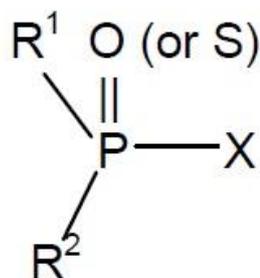


Figura 11. Estrutura de pesticidas organofosforados.¹¹⁵

O uso intensivo de OPs pode levar a envenenamento agudo e crônico além de neurotoxicidade, por isso torna-se necessário o estudo de matérias que possam detectar essas espécies para a proteção da saúde, segurança alimentar e ambiental.

3. METODOLOGIA

Filmes de PPI-IC, PPI-IC-DS, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu foram eletroquimicamente sintetizados por voltametria cíclica à 10 e 25 °C. A solução de síntese conteve pirrol (Pi), índigo-carmim (IC), dodecilsulfato de sódio (DS) e ácido cloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Os filmes de polipirrol e de nanocompósitos obtidos foram caracterizados por Voltametria Cíclica (VC), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR), Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-VIS-NIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia RAMAN.

3.1. LIMPEZA DOS ELETRODOS DE TRABALHO

Previamente ao uso, os eletrodos de trabalho FTO-vidro (placa de vidro a qual é industrialmente depositado óxido de estanho dopado com flúor) passam por um processo de limpeza, que consiste, primeiramente em deixar os mesmos imersos em uma solução aquosa de detergente comercial em um béquer no banho de ultrassom por 15 minutos; na sequência o mesmo procedimento ocorre com imersão em acetona e etanol em banho de ultrassom por 15 minutos, respectivamente. Entre cada etapa os vidros são lavados com água deionizada e ao fim do processo são colocados em estufa a 50 °C para secagem.

3.2. DEPOSIÇÃO DE PLATINA

Antes da eletropolimerização do pirrol, depositou-se um filme de platina sobre o substrato de FTO-vidro afim de melhorar a aderência dos filmes ao FTO-vidro. Utilizou-se o método de cronopotenciometria, aplicando-se uma corrente de -2,0 mA durante 120 s. Para essa deposição foi utilizada uma solução aquosa de ácido cloroplátinico hexahidratado ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5,0 mmol L⁻¹ como eletrólito em uma cela eletroquímica contendo dois eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato AUTOLAB, modelo 302N. Como eletrodo de referência e contra-eletrodo foi utilizado um fio de platina, Degussa S. A., com 99 % de pureza conectado a uma placa de platina de (0,9 x 1,3) cm² com 99 %, Platilab Ltda e o eletrodo de trabalho foi o FTO-vidro. A deposição foi realizada a 25 °C.

3.3. SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE POLIPIRROL

Para o preparo das soluções de síntese, o pirrol foi previamente destilado e armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C. Todos os filmes de polipirrol (PPI-IC, PPI-IC-DS, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu) e nanopartículas de ouro (NPAu) foram eletropolimerizados

a 10 e 25 °C, utilizando-se um banho termostático Tecnal para o controle da temperatura. Este método seguiu-se conforme já previamente descrito na literatura.¹¹⁶

Para a síntese dos filmes foram preparadas soluções aquosas de Pi (0,1 mol L⁻¹), IC (0,005 mol L⁻¹), NaDS (0,1 mol L⁻¹) e H₂AuCl₄.3H₂O (0,006 mol L⁻¹) em um volume total de 25 mL. Os filmes foram eletropolimerizados em uma cela eletroquímica contendo três eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato AUTOLAB, modelo 302N aplicando a técnica de voltametria cíclica (VC) (faixa de potencial entre -0,3 a 1,3 V, por 3 ciclos, com velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹) utilizando um eletrodo de referência (Ag | AgCl | Cl⁻) (sat), ALS, com diâmetro de 0,4 cm, e um contra-eletrodo consistindo de um fio de platina, Degussa S. A. com 99,9 % de pureza, conectado a uma placa de platina de (0,9 x 1,3) cm² com 99,9 % de pureza, Platilab Ltda. O eletrodo de trabalho consistiu no FTO depositado com Pt, Solaronix, cortado nas dimensões (2 cm x 1 cm), com resistência de 15 Ω.cm⁻² e espessura total de 2,2 mm. Os filmes foram sintetizados sobre uma área de 1 cm², delimitada com fita adesiva. Através deste método obtêm-se filmes finos de polipirrol auto suportados sobre a superfície do eletrodo de trabalho de FTO-vidro, conforme ilustra a Figura 12.

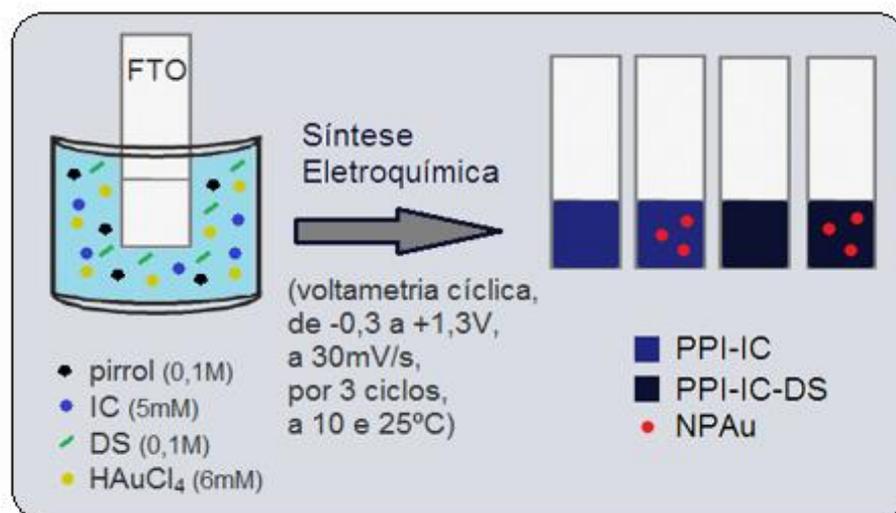


Figura 12. Esquema ilustrando a síntese dos materiais poliméricos sintetizados.

3.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Para a caracterização estrutural, os filmes foram sintetizados pelo método de voltametria cíclica conforme descrito na seção 3.3, mas utilizando como eletrodo de trabalho uma placa de platina de 1,5 cm². Os filmes foram raspados para posterior caracterização através de espectroscopia no infravermelho com acessório de reflexão atenuada por um espectrômetro Alpha-Bruker.

Também foi realizada a caracterização através de espectroscopia Raman, na qual as medidas foram realizadas diretamente nos filmes depositados sob FTO-vidro. Os espectros foram obtidos usando um laser de íons He-Ne no comprimento de onda de 633 nm, em um iHR320 Imaging Spectrometer-HORIBA. Os filmes sintetizados a 10 °C contendo a enzima AChE imobilizada também foram caracterizados por espectroscopia Raman.

3.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A morfologia dos filmes de nanocompósito PPI-IC, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu sintetizados em diferentes temperaturas foi caracterizada através de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os filmes a 10 °C imobilizados com a enzima AChE também foram caracterizados. Previamente às análises, os filmes foram recobertos com carbono. As imagens foram adquiridas com uma tensão de aceleração de 15 kV através de um microscópio eletrônico de varredura JSM 5800.

3.6. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Todas as caracterizações eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB, modelo 302N. O método de voltametria cíclica foi realizado utilizando como eletrólito uma solução de LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹, na faixa de potencial entre -1,0 e +1,0 V, por 6 ciclos, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A célula eletroquímica foi montada com três eletrodos, sendo FTO modificado com os filmes de PPI o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência (Ag | AgCl | Cl⁻) (sat), e contra-eletrodo consistindo de um fio de platina conectado a uma placa de platina de 0,9 x 1,3 cm².

3.7. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

Os filmes foram caracterizados opticamente por espectroscopia UV-VIS-NIR, utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 25, na faixa de varredura entre 300 e 2200 nm.

3.8. IMOBILIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

A solução de enzima Acetilcolinesterase (AChE E.C.3.1.1.7) Tipo VI-S obtida de *Electrophorus electricus* (Poraquê), Sigma-Aldrich, foi preparada em tampão fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) pH 7,0 a uma concentração de 50 U e posteriormente foi imobilizada por adsorção física sob os filmes poliméricos (PPI-IC, PPI-IC-Au e PPI-IC-DS-Au) por *drop casting*, utilizando 50 µL da solução. A secagem do eletrodo ocorreu em temperatura ambiente por 24h.

3.9. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR

A caracterização eletroquímica dos filmes sintetizados a 10 °C, modificados com a enzima AChE (PPi-IC-AChE, PPi-IC-NPAu-AChE, PPi-IC-DS-NPAu-AChE) foi realizada através do método de voltametria cíclica, utilizando, primeiramente como eletrólito uma solução de cloreto de acetilcolina (ATCl), Sigma-Aldrich, 99 % de pureza, (0,5 mmol L⁻¹) na faixa de potencial entre -1,0 e 1,0 V, por 3 ciclos em uma velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. Também foi realizada a caracterização utilizando como eletrólito uma solução de ferri/ferrocianeto de potássio (1,0 mmol L⁻¹) em 1,0 mol L⁻¹ de KCl, seguindo os mesmos parâmetros anteriores. Para estas caracterizações, utilizou-se um eletrodo de referência (Ag | AgCl | Cl⁻) (sat), Metrohm, um contra-eletrodo consistindo de um fio de platina conectado a uma placa de platina de 0,9 x 1,3 cm² e o eletrodo de trabalho.

3.10. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE PESTICIDAS

A detecção eletroquímica do pesticida organofosforado metil paration (MP), Sigma Aldrich, 99,8% de pureza, foi realizada através do método de voltametria cíclica, partindo-se de uma solução estoque de MP (1,92 mmol L⁻¹) em acetonitrila. Para as soluções de trabalho, esta solução estoque foi posteriormente diluída em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹) pH 7,0, numa faixa de concentração entre 1×10⁻³ e 1,15×10⁻⁷ mol L⁻¹. Utilizou-se uma cela eletroquímica com 3 eletrodos, sendo eles, eletrodo de referência, Metrohm, Ag/AgCl, contra-eletrodo de platina e eletrodo de trabalho contendo os filmes com a enzima AChE previamente imobilizada. A voltametria cíclica foi realizada na faixa de potencial entre -1,0 e +1,0 V, com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹, por 2 ciclos. Como eletrólito utilizou-se solução tampão contendo *ca.* de 5 mL de ATCl (0,5 mmol L⁻¹). Para as inibições enzimáticas, os filmes modificados foram imersos por 5 minutos em cada solução de concentrações diferentes do pesticida, sendo realizada a voltametria cíclica em eletrólito de ATCl na sequência após cada imersão, para avaliar a detecção.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Análises de FTIR-ATR (Figura 13) foram realizadas com o objetivo de confirmar a presença dos dopantes na matriz polimérica dos filmes PPI-IC-DS, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu. As bandas típicas do PPI podem ser observadas nos espectros dos três filmes, conforme indicado pelas setas. Em 1527 cm^{-1} observa-se a banda característica da deformação angular N-H do PPI.³² Bandas atribuídas às deformações angulares no plano das ligações C-H, N-H e C-N-C do anel do PPI são observadas em 1010 cm^{-1} e 960 cm^{-1} . As bandas em 1611 , 1476 e 1041 cm^{-1} estão associadas ao estiramento das ligações C=C, C-C e C-N, bem como às vibrações do anel do PPI.

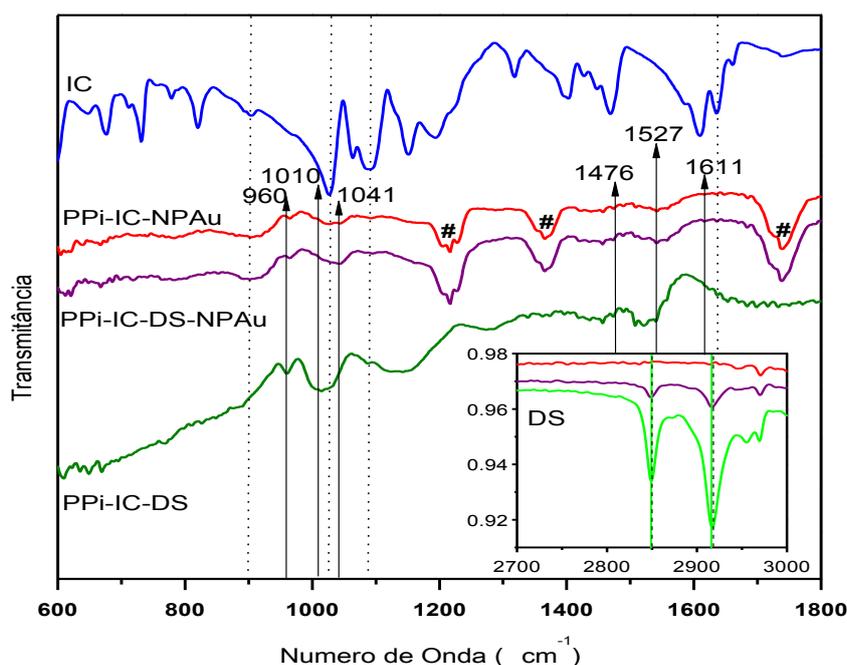


Figura 13. Espectros de FTIR-ATR para os filmes de PPI-IC-DS, PPI-IC-DS-NPAu e PPI-IC-NPAu, índigo-carmim (IC) e dodecilsulfato (DS) (*inset*).

A incorporação dos dopantes na matriz polimérica dos filmes pode ser observada, primeiramente através da presença de IC (linhas pontilhadas na Figura 13), sugerida pelas bandas em 900 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} , 1094 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} atribuídos às vibrações S-O, C-N-C, C-O e C=O do IC, respectivamente. A presença de DS pode ser confirmada ao se comparar os

filmes PPI-IC-DS-NPAu e PPI-IC-NPAu, com as bandas típicas do dodecilsulfato em 2850 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} (linhas tracejadas no *inset* da Figura 13) atribuídas ao estiramento C-H. Também foram observados deslocamentos das bandas vibracionais dos filmes com NPAu em relação aos filmes sem nanopartículas, o que sugerem interações químicas entre PPI, IC, DS e as AuNPs.⁶¹

A formação de NPAu durante a eletropolimerização é sugerida através da intensificação das bandas em 1216 , 1373 e 1739 cm^{-1} (indicadas com # na Figura 13) observadas nos espectros dos nanocompósitos. Tais intensificações podem resultar de um efeito de absorção de radiação infravermelho intensificado pela superfície (SEIRA, do inglês *Surface Enhanced Infrared Absorption*), o que não é observado nos filmes sem NPAu. Esse efeito é observado em moléculas adsorvidas sobre superfícies metálicas nanoestruturadas, que resultam em bandas de absorção de dez a mil vezes mais intensas do que seria observado para a mesma molécula na ausência do metal.¹¹⁷ Apesar de predominar o comportamento de *bulk* em relação à superfície do nanocompósito, ainda assim foi possível visualizar o efeito de intensificação.

Os filmes também foram estudados por espectroscopia Raman (Figura 14), que é uma importante técnica para a obtenção de informações estruturais de um material, bem como é usada como uma técnica complementar ao infravermelho, fornecendo uma caracterização estrutural definida.^{118,119} Em todos os espectros é possível verificar a presença do polipirrol, com bandas característicos em 1596 cm^{-1} , relacionada ao modo vibracional de estiramento C=C, em 1378 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-C do anel interno e outra banda localizada em 1051 cm^{-1} referente à deformação angular C-H no plano do PPI oxidado.^{118,120,121} Duas das mais importantes bandas vibracionais do PPI aparecem em 934 and 984 cm^{-1} . A banda em 984 cm^{-1} é relacionada à forma quinoide do anel pirrólico (forma reduzida), enquanto que a banda em 934 cm^{-1} é associada com o anel benzoico (forma oxidada).¹²² Considerando a razão entre as intensidades destes modos vibracionais (I_{934} / I_{984}) para PPI-IC-NPAu, PPI-IC e PPI-IC-DS-NPAu (1,1, 1,1 e 1,2, respectivamente), verificamos que o grau de dopagem dos nanocompósitos contendo os dois dopantes (IC e DS) é *ca.* 10% maior.

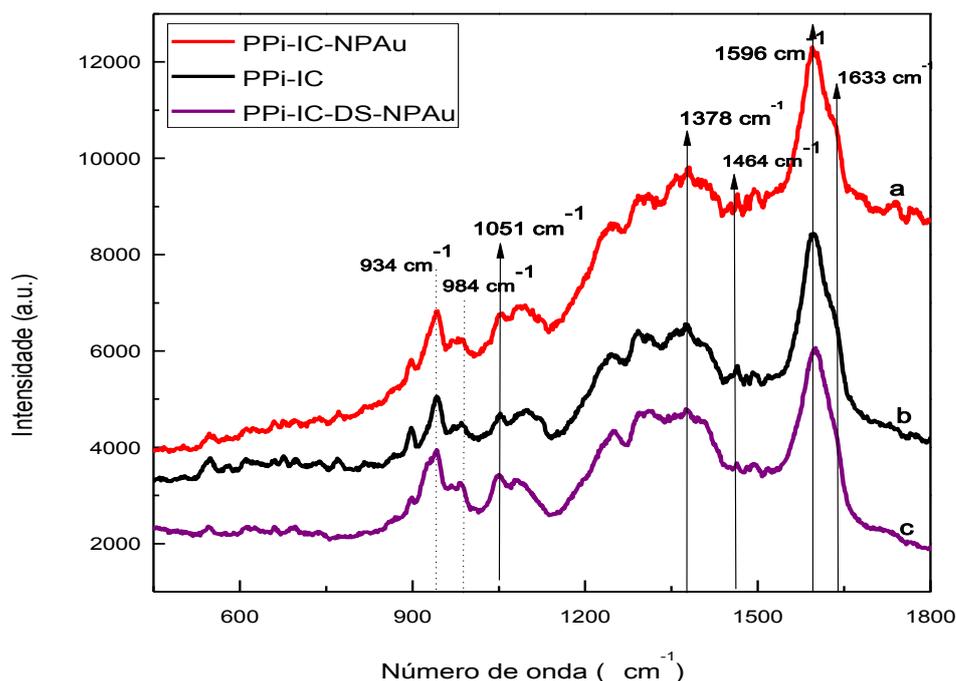


Figura 14. Espectros Raman para os filmes PPI-IC (a), PPI-IC-NPAu (b) e PPI-IC-DS-NPAu (c).

Ao comparar o espectro Raman obtido para o filme de PPI-IC (Figura 14 (b)) com os espectros de PPI e IC encontrados na literatura,^{118,123} é possível observar bandas que confirmam a presença do IC. Em 1633 cm^{-1} observa-se um ombro, correspondente ao estiramento C=O, e em 1464 cm^{-1} aparece uma banda de baixa intensidade, atribuída ao anel aromático, ambas as bandas atribuídas ao IC. Algumas bandas (1051 , 984 e 934 cm^{-1}) sofreram um deslocamento no filme dopado com IC em relação aos números de onda encontrados na literatura para filmes de polipirrol (1040 , 980 e 944 cm^{-1}), o que pode ser indício de que o dopante está interagindo com o polímero.¹²⁴

A presença de NPAu geralmente aumenta a intensidade das bandas Raman devido ao efeito de ressonância de plasmon de superfície localizado, resultando no espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*).^{120,125} No entanto, não ficou evidente nenhuma intensificação, possivelmente porque nos filmes poliméricos predomina o comportamento *bulk* e não o de superfície e conseqüentemente, a intensidade dos sinais Raman foram similares para os três filmes.

4.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com os filmes de polipirrol eletropolimerizados na presença de índigo-carmim, dodecilsulfato de sódio e nanopartículas de ouro, a fim de analisar a morfologia dos mesmos. Nas Figura 15 a, b, c e d encontram-se as imagens de MEV dos nanocompósitos sintetizados em diferentes temperaturas.

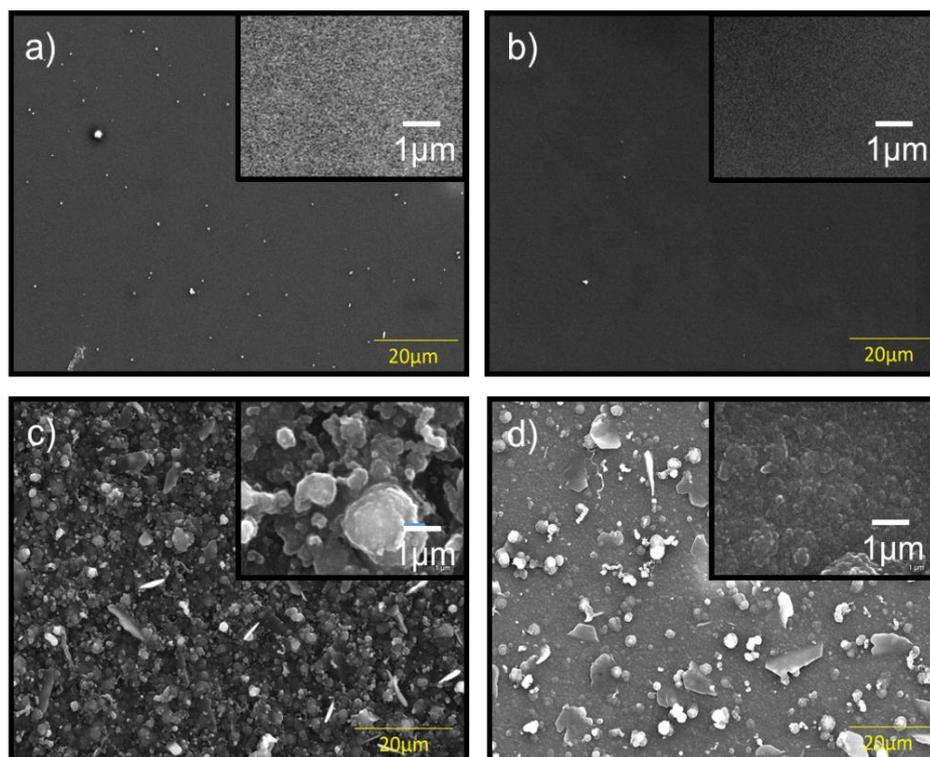


Figura 15. Imagens obtidas por MEV dos filmes de nanocompósitos sintetizados em diferentes temperaturas: a) PPI-IC-NPAu (10°C), b) PPI-IC-NPAu (25°C), c) PPI-IC-DS-NPAu (10°C) e d) PPI-IC-DS-NPAu (25°C).

Os filmes sintetizados a 10 e 25 °C na ausência de DS (Figura 15 a e b) não apresentam grandes alterações nas suas morfologias, uma vez que para ambas as temperaturas se verificam superfícies bem homogêneas. Ao levar-se em consideração o aumento da concentração de precursor de ouro utilizada na solução de síntese, observa-se que esse fator também não afeta significativamente a morfologia dos filmes obtidos.¹¹⁶ No entanto, com a incorporação do dopante DS nos nanocompósitos, notam-se alterações significativas na morfologia superficial, como mostra as Figura 15 c e d, onde os filmes passam a apresentar glóbulos e lamelas. Essas mudanças na morfologia podem estar atribuídas às características distintas das estruturas moleculares dos dopantes (Figura 16), que competem para intercalarem-se com o PPI durante

sua síntese, o que acaba resultando em diferentes morfologias. Levando-se em consideração o caráter dianiônico do IC, o mesmo pode atuar como ponte entre as cadeias poliméricas, provendo uma maior organização e levando à formação de lamelas; o DS, que foi usado acima da sua concentração micelar crítica (CMC), leva a um crescimento de glóbulos, de forma semelhante a dopantes inorgânicos. Portanto, a dopagem por DS atribui ao polímero maior área superficial, quando comparado ao efeito do IC. Estas observações sugerem que o dopante é o principal responsável pelas propriedades morfológicas do filme.

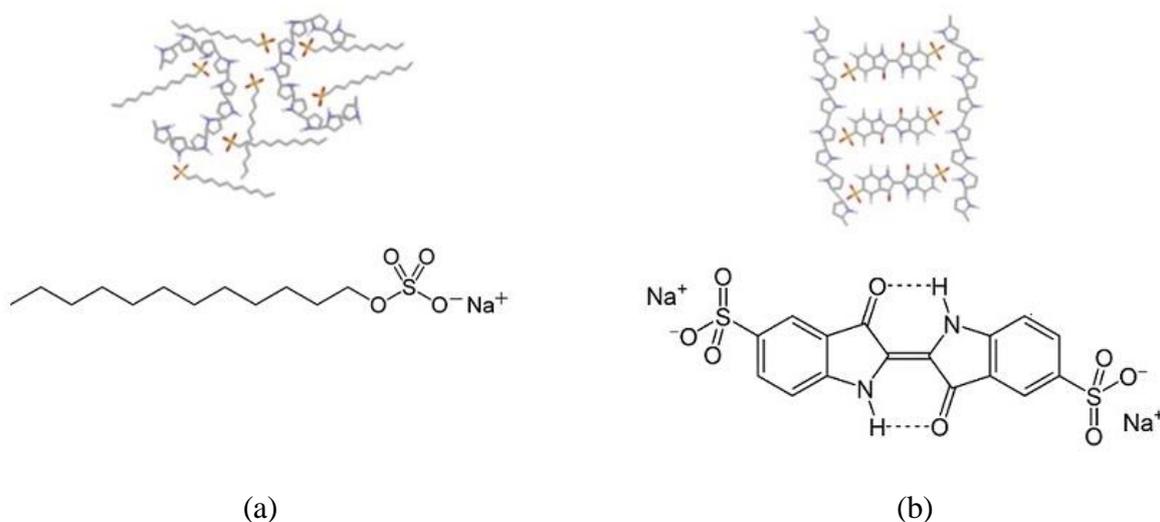


Figura 16. Imagem ilustrativa bidimensional exemplificando a interação entre as moléculas dos dopantes com as cadeias poliméricas de PPI e estruturas químicas do a) DS e b) IC.³³

Segundo a literatura,³³ a concentração de dopante também pode afetar a morfologia dos filmes, por exemplo, quando filmes de PPI são sintetizados a partir de soluções aquosas de DS com concentrações abaixo ou acima da CMC, obtém-se diferentes morfologias. No caso de concentração abaixo da CMC, onde não ocorre formação de micelas, o material apresenta apenas morfologia globular. Ao se utilizar concentração de DS acima da CMC, podem ocorrer alterações na morfologia na forma de estruturas tubulares, uma vez que há melhor difusão de íons, decorrente da formação de micelas.

O mapeamento químico feito através de EDS nos nanocompósitos sintetizados em diferentes temperaturas (Figura 17) evidencia a presença de oxigênio, enxofre (elementos presentes nas moléculas de IC e DS), nitrogênio (elemento presente na molécula de pirrol) e ouro nos filmes de PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu. Com base nessa análise, é possível observar que a presença de ouro não afeta a distribuição dos agentes dopantes na matriz do PPI,

que se apresentam homogeneamente distribuídos (nesta ordem de grandeza) em todos os filmes, o que se encontra de acordo com resultados já obtidos na literatura.¹¹⁶

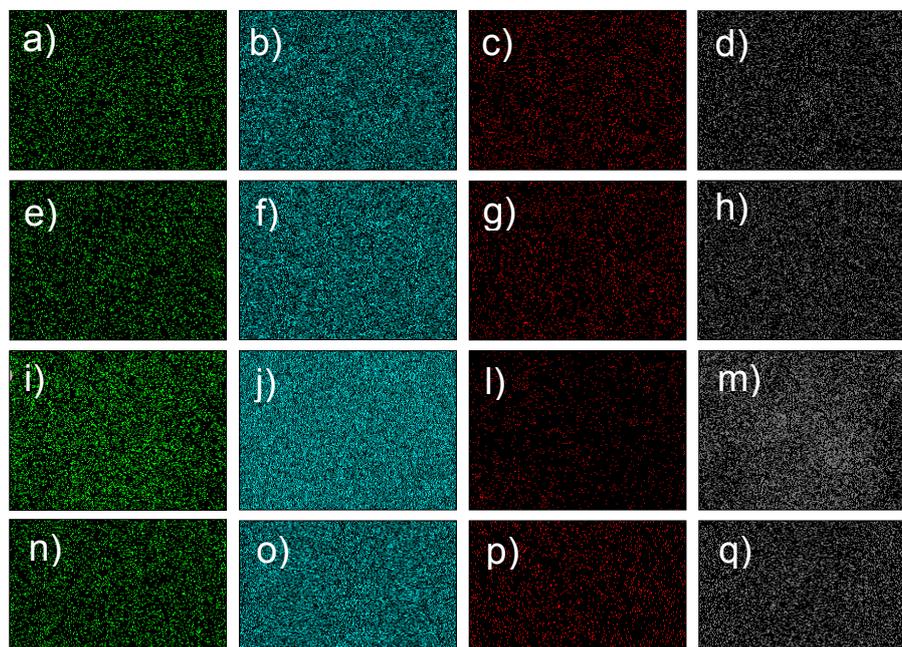


Figura 17. Mapeamento EDS dos filmes sintetizados em diferentes temperaturas: (a-d) PPI-IC-NPAu (10°C), (e-h) PPI-IC-NPAu (25°C), (i-m) PPI-IC-DS-NPAu (10°C), e (n-q) PPI-IC-DS-NPAu (25°C). Elementos: (a, e, i, n) oxigênio, (b, f, j, o) enxofre, (c, g, l, p) ouro, e (d, h, m, q) nitrogênio.

4.3. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Análises de voltametria cíclica foram realizadas nos filmes sintetizados a fim de estudar o comportamento eletroquímico dos mesmos. A Figura 18 apresenta os voltamogramas dos filmes de PPI-IC e PPI-IC-NPAu sintetizados a 10 e 25 °C. A partir desses voltamogramas é possível observar que, independente da temperatura de síntese, as nanopartículas de ouro na matriz do polímero facilitam o transporte de carga, resultando em um aumento na densidade de carga e nas correntes de pico redox do polímero. Esses aspectos indicam que as NPAu podem melhorar a mobilidade de carga por *hopping* devido à sua boa condutividade, além de proporcionarem um aumento do caminho de condução. Adicionalmente, permitem maior acumulação de carga na superfície do eletrodo modificado, explicando o aumento simultâneo da corrente capacitiva e faradaica como resultado da maior área eletroativa.

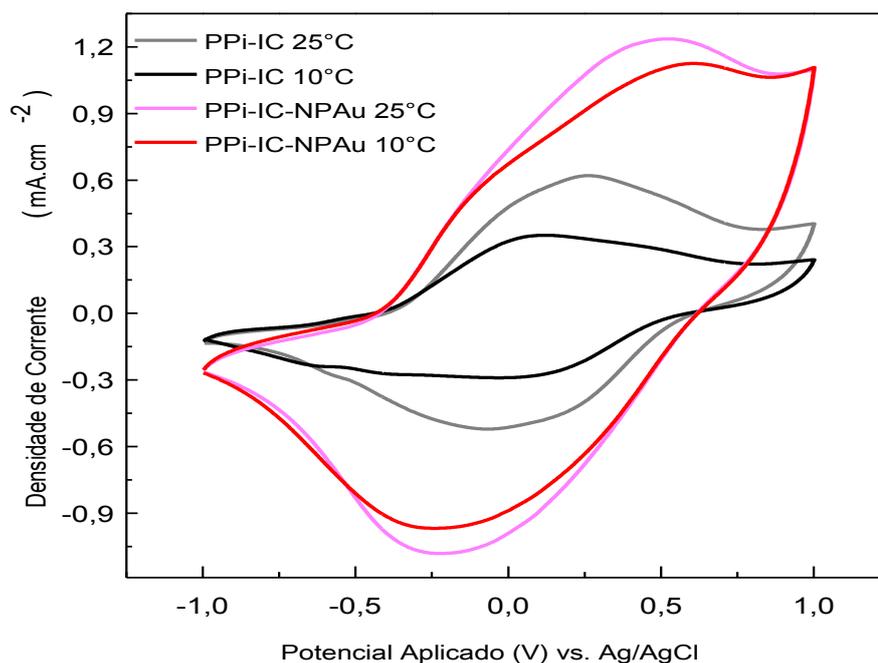


Figura 18. Quinto ciclo dos voltamogramas dos filmes de PPI-IC e PPI-IC-NPAu sintetizados em diferentes temperaturas. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 .

O aumento de temperatura de síntese resultou em voltamogramas com densidade de carga e correntes de pico maiores. Para a temperatura de 10°C ocorre uma cinética de reação mais lenta, resultando na formação de filmes menos espessos (visivelmente perceptível). Também foi possível verificar um aumento na densidade de carga devido a uma maior concentração de precursor de ouro na solução de síntese ($6,0 \text{ mmol L}^{-1}$, deste trabalho, e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, da literatura).¹¹⁶ Para $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de precursor de ouro, obteve-se uma diferença na densidade de carga de 304% para o filme PPI-IC-NPAu em relação ao filme PPI-IC, por outro lado, utilizando $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de precursor de ouro, obtêm-se uma diferença bem menor, de apenas *ca.* 19%. Portanto, o aumento na concentração de HAuCl_4 na síntese leva a um aumento considerável da área eletroativa do nanocompósito.¹¹⁶

A Figura 19 apresenta os voltamogramas de todos os filmes sintetizados a 25°C (PPI-IC, PPI-IC-DS, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu), com a finalidade de mostrar as diferenças nas propriedades eletroquímicas desses materiais em função da presença do surfactante DS na matriz do polímero.

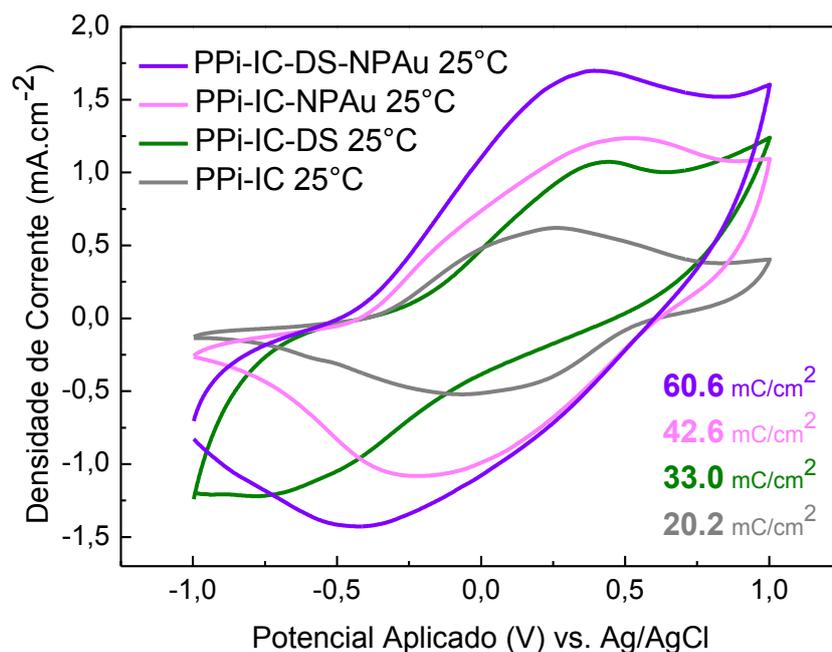


Figura 19. Voltamogramas dos filmes sintetizados à 25 °C. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ em solução 0,1 mol L⁻¹ de LiClO₄. Quinto ciclo.

Comparando os voltamogramas dos filmes, podem-se observar algumas mudanças nos parâmetros eletroquímicos, que estão resumidos na Tabela III, como o aumento de densidade de corrente quando se utiliza dois dopantes, o que pode ser resultado do maior nível de dopagem e decorrência da maior concentração total. Apesar da característica quase-reversível, a presença de DS parece aumentar a reversibilidade (razão entre densidades de corrente mais próximo de 1), ao mesmo tempo que aumenta a resistência à transferência de carga (maior ΔE_p) no filme PPI-IC-DS. Por outro lado, a incorporação de NPAu em PPI-IC-DS, diminui a reversibilidade enquanto que a transferência de carga aumenta, ao contrário do que acontece na ausência de DS no nanocompósito de PPI-IC-NPAu, possivelmente por ocorrer uma mudança na interação entre polímero e dopante na presença das NPAu. De forma geral, todos os filmes apresentaram razão entre densidades de corrente próxima de 1.

Tabela III. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC dos filmes de polipirrol sintetizados a 25 °C.

Filme	j_a (mA cm ⁻²)	j_c (mA cm ⁻²)	$ j_a/j_c $	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	$[(E_a + E_c) / 2]$
PPI-IC	0,62	-0,51	1,22	0,24	-0,04	0,28	0,10
PPI-IC-DS	1,08	-1,18	0,91	0,43	-0,66	1,09	-0,12
PPI-IC-NPAu	1,25	-1,07	1,17	+0,52	-0,23	0,75	0,14
PPI-IC-DS-NPAu	1,70	-1,43	1,19	+0,39	-0,41	0,80	-0,01

Através dos voltamogramas da Figura 19, verifica-se ainda que maiores densidades de carga e corrente são observadas para o nanocompósito PPI-IC-DS-NPAu, sendo *ca.* de 42,3% maior comparado ao nanocompósito PPI-IC-NPAu. Isso pode ser atribuído a um melhor processo de dopagem do PPI quando DS encontra-se presente nos filmes, podendo estar relacionado com a morfologia onde uma maior área superficial leva a maior incorporação de NPAu, corroborando com os resultados obtidos por Raman (Figura 14).¹²⁵ Os valores das densidades de carga calculadas para todos os filmes sintetizados a 25 °C encontram-se na Figura 19, mostrando que o nanocompósito PPI-IC-DS-NPAu apresenta a maior corrente capacitiva e separação de carga. Adicionalmente, a adição de nanopartículas de ouro dobra a densidade de carga dos filmes de polipirrol, tanto na presença quanto na ausência do surfactante.

4.4. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

4.4.1. Filmes de nanopartículas de ouro

Espectros de extinção na região UV-VIS (Figura 20), que combinam efeitos de absorção e de espalhamento, foram obtidos para confirmar a formação de NPAu através do método eletroquímico utilizado para a síntese dos filmes de PPI em diferentes temperaturas (seção 3.3). Para isso, utilizamos os mesmos parâmetros descritos na seção 3.3, mas utilizando apenas a solução de H₂AuCl₄ (6,0 mmol L⁻¹) no eletrólito. Para o filme de NPAu sintetizado a 10 °C pode-se observar a formação de duas bandas distintas, em *ca.* de 538 nm e 670 nm; e, para o filme sintetizado a 25 °C, encontra-se uma banda larga em *ca.* de 625 nm, com um ombro em *ca.* de 538 nm. De acordo com trabalhos descritos na literatura^{126,127}, o modo de propagação do plasmon na superfície da nanopartícula pode ser afetado pela distância interpartícula, deslocando a banda ou surgindo um ombro em maiores comprimentos de onda. Por outro lado, as duas bandas presentes no filme de NPAu a 10 °C sugere que as nanopartículas possuem diferentes tamanhos, sendo que a banda plasmônica em maiores comprimentos de onda é resultante de uma menor força restauradora no modo de oscilação dos plasmons presentes em nanopartículas com diâmetros maiores.¹²⁸ A maior dispersão de tamanho obtida na síntese em menor temperatura pode ter origem da menor energia cinética da reação de redução do Au⁺³ para Au⁰, criando mais pontos de nucleação no substrato. Como o crescimento de nanopartículas é governado pelo tempo de reação, podem ocorrer formação de *clusters* próximos, que se aglomeram e formam nanopartículas de tamanhos diferentes.^{57,128}

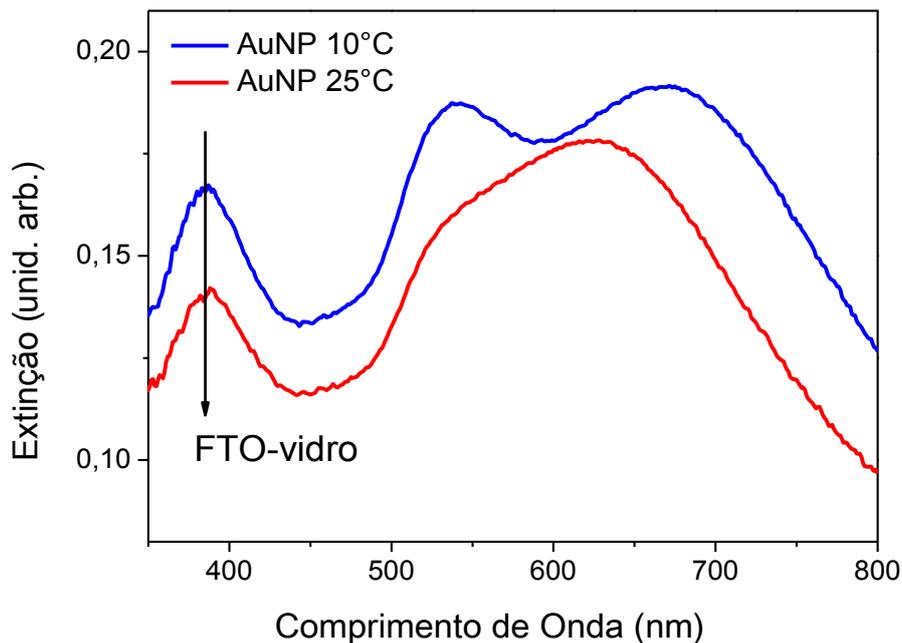


Figura 20. Espectros de extinção dos filmes de NPAu sintetizados a 10 e 25 °C.

4.4.2. Filmes de Polipirrol

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível-infravermelho próximo foram obtidos com o objetivo de estudar o nível de dopagem dos materiais sintetizados. Esse estudo foi baseado no fato de que os níveis de energia do polipirrol (bem como o intervalo de energia entre eles) são modificados gradualmente pelo processo de dopagem, como mostra a Figura 21, que informa as energias relacionadas com as transições eletrônicas de filmes de PPI (dopado com ClO_4^-) com diferentes graus de dopagem.²⁶ Como esse processo depende fortemente dos dopantes utilizados para a síntese do polipirrol, espera-se que os efeitos provocados pela presença de IC e DS na matriz do polímero sejam diferentes.

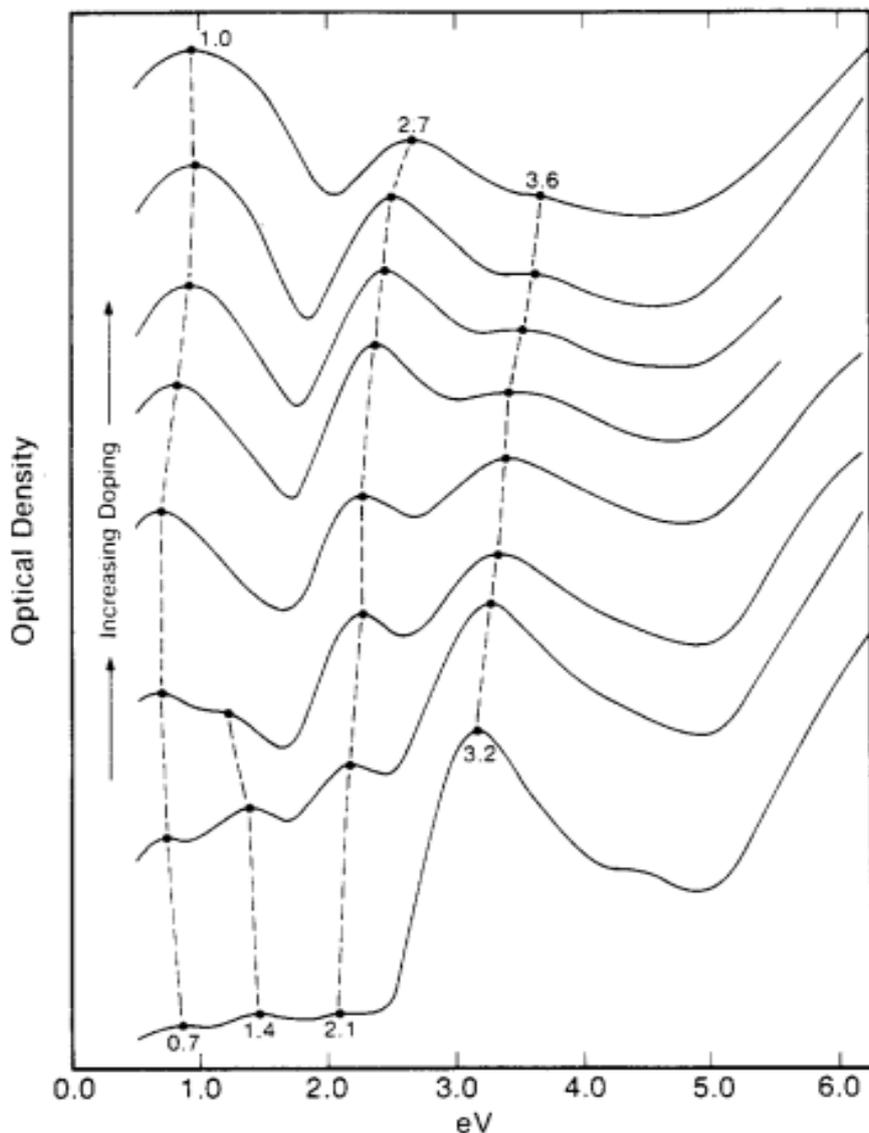


Figura 21. Espectros de absorção óptica de polipirrol dopado com ClO_4^- para diferentes concentrações do dopante.²⁶

Os espectros de absorção (Figura 22) mostram que na presença do DS, há uma diminuição da absorção em valores altos de energia, em torno de 3,6 eV (correspondente à transição da BV para a BC), aparecendo uma banda de absorção em torno de 2,7 eV (transição da BV para o polaron antiligante).²⁶ Sugere-se que este comportamento seja decorrente ao maior nível de dopagem dos filmes de polipirrol dopado com os dois dopantes, corroborando os resultados obtidos por Raman. Por outro lado, a presença de nanopartículas de ouro parecem não afetar significativamente o grau de dopagem do material. Comparando os filmes sintetizados a 10 °C com os filmes a 25 °C, observa-se que o nível de dopagem é maior para os filmes sintetizados em menor temperatura, o que pode ser confirmado pela presença da banda bipolaron bem definida em 1,0 eV (*inset* da

Figura 22), ao invés das bandas polaron em *ca.* de 0,7 e 1,4 eV que aparecem apenas nos filmes sintetizados à 25 °C.

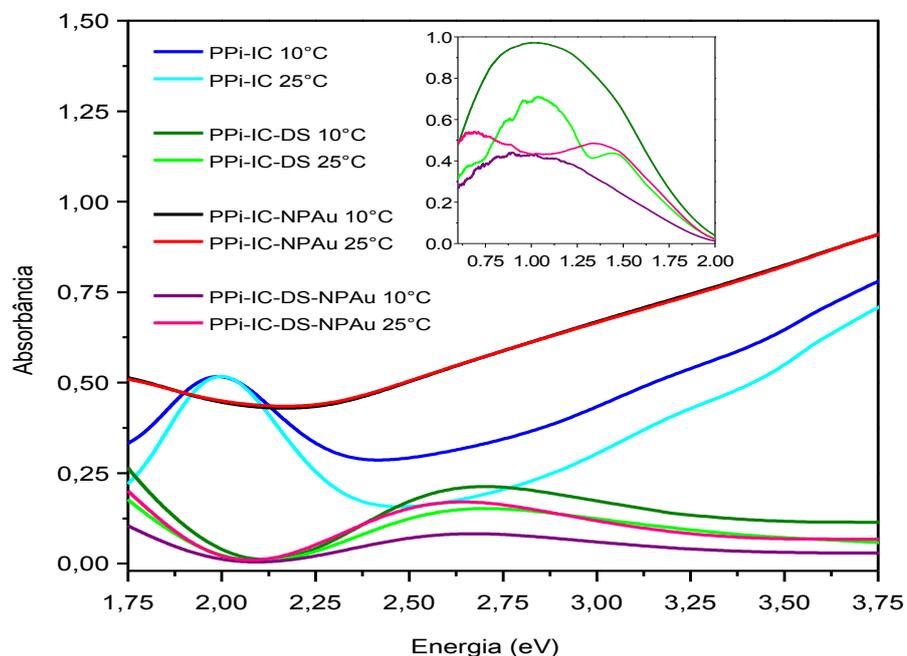


Figura 22. Espectro de absorção UV-VIS-NIR dos materiais sintetizados.

A dopagem pelo índigo-carmim é evidenciada através da banda de absorção em 2,0 eV,¹¹⁶ visível nos espectros dos filmes de PPI-IC, sugerindo que a incorporação deste corante na matriz polimérica é favorecida na ausência de outras espécies que possam atuar como dopante. O DS, apesar de apresentar um tamanho de cadeia relativamente grande, foi utilizado para a síntese dos filmes em uma concentração consideravelmente maior que do IC (100:5), sendo possivelmente o principal responsável pela dopagem desses filmes (segundo sugere a morfologia dos materiais, na Figura 15). Ao analisar o filme com nanopartículas de ouro (PPI-IC-NPAu), a absorção de IC também não é observada, pois a solução de síntese desse filme possui também íons cloreto que são provenientes do ácido cloroáurico, que é empregado como precursor das nanopartículas que possuem mobilidade iônica superior ao IC. Porém, isso não impediu que o material apresentasse evidências da dopagem com IC, fornecidas pelas análises estruturais, morfológicas e ópticas. A dopagem puramente com cloreto resultaria em morfologia globular.⁹⁸

Com base na caracterização estrutural, morfológica, eletroquímica e óptica dos filmes de PPI, optou-se em aplicar os filmes sintetizados à 10 °C como biossensores devido ao maior grau de dopagem, menor espessura e menor corrente capacitiva.

4.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO BIOSSENSOR

De acordo com espectros encontrados na literatura para a enzima AChE, ela possui alguns grupamentos vibracionais característicos;¹²⁹ adicionalmente, sua interação com a superfície de imobilização pode resultar em alterações dos espectros Raman. A Figura 23 compara os espectros Raman para os filmes PPI-IC, PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS-NPAu antes (i) e após a imobilização da enzima AChE (ii). De acordo com os espectros obtidos, fica evidente a imobilização da enzima AChE nos filmes PPI-IC e PPI-IC-NPAu (Figura 23 a e b) devido à presença das bandas atribuídas às vibrações dos aminoácidos dos anéis aromáticos de fenilalanina, tirosina e triptofano na região entre 1550-1615 cm^{-1} , presentes nesta enzima.¹³⁰ Adicionalmente são evidentes as bandas atribuídas com o modo amida I da estrutura secundária da enzima em *ca.* 1635 cm^{-1} , que aparecem devido ao estiramento da ligação C=O das ligações peptídicas, que são moduladas pela estrutura secundária (α -helix, β -sheet, etc).¹³¹ Esta caracterização não foi possível nos filmes de PPI-IC-DS-NPAu, uma vez que estas bandas não ficaram tão evidentes. Este resultado sugere que a superfície destes nanocompósitos não é tão favorável à imobilização da enzima AChE. No entanto, não podemos descartar a presença de enzima, uma vez que alguns trabalhos da literatura apresentam espectros Raman da AChE sem as bandas características evidentes, muitas vezes devido à baixa concentração analisada. Além disso, a interação da enzima com a superfície mais rugosa do PPI-IC-DS-NPAu pode resultar na sobreposição das bandas Raman.^{125,129}

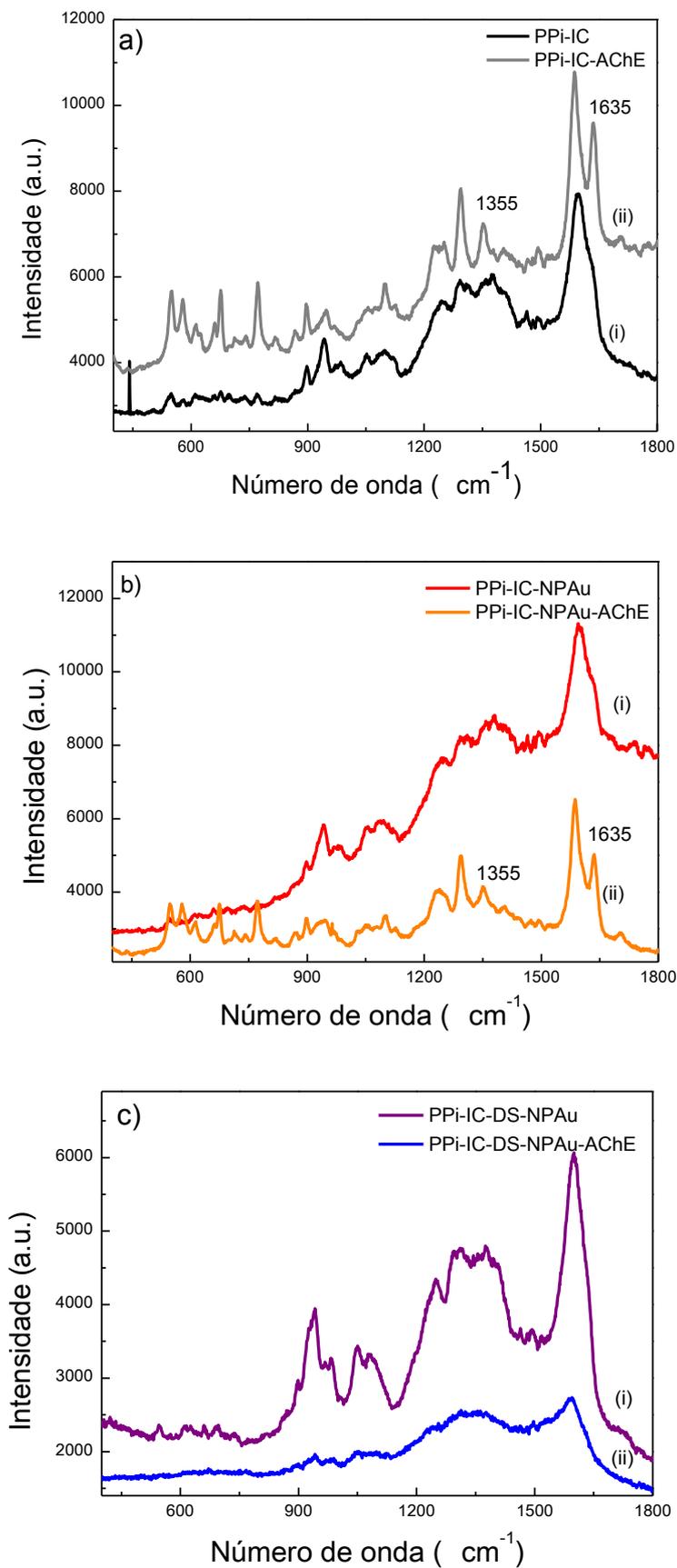


Figura 23. Espectros Raman dos filmes sintetizados a 10°C : PPI-IC (a) PPI-IC-NPAu (b) e PPI-IC-DS-NPAu (c) sem (i) e com (ii) AChE imobilizada.

Além de evidenciar a imobilização da enzima AChE, os espectros Raman podem sugerir a disponibilidade ou bloqueio de resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo, como o triptofano, através da análise das bandas relacionados ao mesmo, uma vez que sua presença no sítio ativo da enzima foi previamente demonstrada através de estudos espectroscópicos e de marcação por fotoafinidade.¹³²⁻¹³⁴ O estado dos resíduos de triptofano podem ser analisados através das bandas próximas a 1355 cm^{-1} , por ser sensível ao ambiente. Este banda aparece intensa quando o sítio ativo está bloqueado e sua intensidade é menor quando o sítio ativo está exposto.¹³¹ Comparando a intensidade dessa banda com a banda em 1590 cm^{-1} do PPI, verificamos que a razão I_{1355}/I_{1590} é *ca.* 13% menor para o nanocompósito PPI-IC-NPAu comparado ao filme de PPI-IC (0,77 e 0,89, respectivamente), sugerindo uma maior exposição ou não dos resíduos de triptofano na enzima, podendo indicar mais disponibilidade dos sítios ativos da AChE quando a imobilização ocorre na superfície dos filmes de nanocompósito.

4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO BIOCSENSOR

A morfologia dos filmes de PPI sintetizados a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e modificados com a enzima AChE, foi caracterizada através de MEV, podendo ser comparada com as imagens dos filmes na ausência de enzima (seção 4.2, Figura 15). Na Figura 24 (a) pode-se observar que o filme de PPI-IC apresenta uma morfologia homogênea e ao comparar-se com o filme de PPI-IC-AChE (Figura 24 b), é possível perceber o aparecimento de uma morfologia granular compactada quase uniforme pela superfície do filme, sugerindo uma alta concentração de enzimas imobilizadas na superfície.

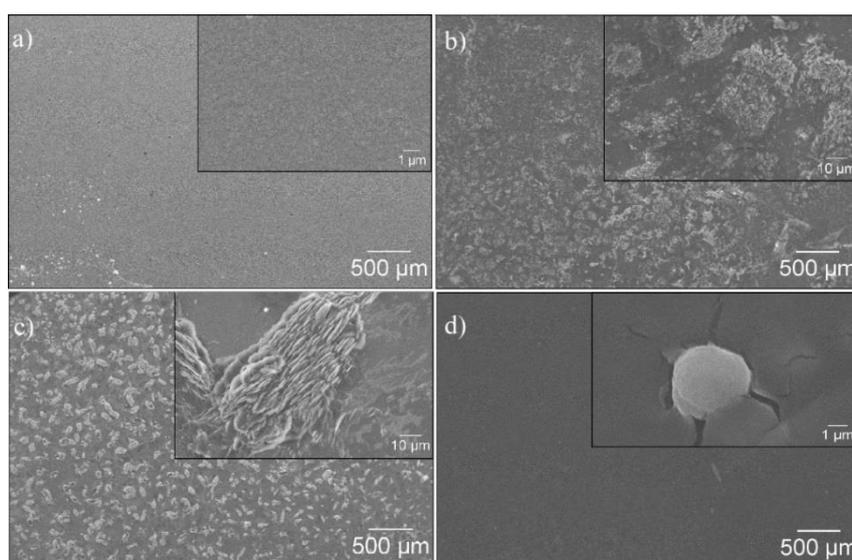


Figura 24. Imagens obtidas por MEV dos filmes PPI-IC (a), PPI-IC-AChE (b), PPI-IC-NPAu-AChE (c) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (d).

Após a imobilização de AChE no filme de PPI-IC-NPAu (Figura 24 c), a morfologia torna-se mais granular com uma distribuição uniforme, cobrindo totalmente a superfície do filme. Para o filme de PPI-IC-DS-NPAu-AChE (Figura 24 d), observa-se que a superfície do filme apresenta uma morfologia completamente homogênea, com a distribuição de poucos glóbulos circulares pelo filme, atribuídos à AChE. Adicionalmente, verifica-se que a imobilização da enzima sobre o nanocompósito PPI-IC-NPAu parece ocorrer de forma orientada, o que pode favorecer a disponibilidade dos sítios ativos da enzima. Esses resultados fortalecem as evidências apresentadas nas análises de Raman.

4.7. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR

4.7.1. Comportamento eletroquímico na presença do substrato ATCl

O comportamento eletroquímico dos filmes sintetizados a 10 °C foram estudados previamente e após a imobilização da enzima AChE (50 U), utilizando como eletrólito i) tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e ii) mesmo meio contendo 0,5 mmol L⁻¹ de ATCl (Figura 25). Nos voltamogramas obtidos para o filme PPI-IC na ausência de ATCl (voltamograma a), observa-se um pico anódico e um catódico de alta intensidade em *ca.* - 0,05 V e - 0,45 V, respectivamente; atribuídos às reações redox do PPI.¹³⁵ Após a imobilização da enzima e na ausência de ATCl (voltamograma b), observa-se deslocamentos dos picos redox, resultando em aumento da resistência à transferência de carga. Adicionalmente, verifica-se que independente do meio, a imobilização da enzima AChE resulta em uma diminuição da densidade de corrente e de carga, que pode ser resultante de um efeito de bloqueio devido a presença da camada de enzima sobre a superfície do filme de PPI.¹³⁶ Este resultado é mais um indício da imobilização e interação entre enzima e filme polimérico.

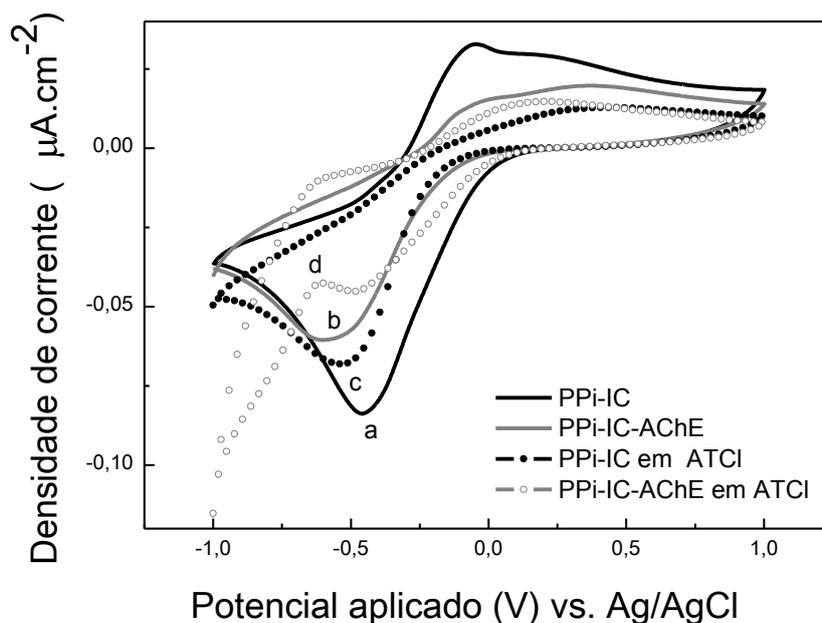


Figura 25. Voltamogramas do filme PPI-IC e PPI-IC-AChE na ausência (a e b respectivamente) e na presença de 0,5 mM ATCl em PBS (c e d). Velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

De acordo com os parâmetros eletroquímicos resumidos na Tabela IV, na presença de ATCl, o filme PPI-IC sem enzima (voltamograma c) apresenta um voltamograma com menores correntes anódicas e catódicas comparado ao PPI-IC sem ATCl (voltamograma a), porém o potencial de redução não é muito afetado, mas sofre um pequeno deslocamento para valores mais negativos de potencial, de forma diferente do potencial de oxidação que sofre um deslocamento pronunciado para valores maiores de potencial, resultando em maior resistência à transferência de carga, havendo também perda de reversibilidade. Após a imobilização da enzima AChE e na presença de ATCl (voltamograma d), verifica-se que a resistência à transferência de carga é menor comparada ao filme sem enzima no mesmo eletrólito e um pouco maiores no meio sem ATCl. Adicionalmente, observa-se a presença de um pico de oxidação em $+0,15 \text{ V}$ que pode ser atribuído à oxidação da tiocolina, produto da hidrólise do ATCl catalisada pela AChE.⁹⁸ O mecanismo da reação entre AChE e ATCl segue conforme ilustrado na Figura 26, onde o sítio ativo da enzima é responsável pela extração do grupo acetil da acetiltiocolina, formando então a tiocolina.^{137,138}

Tabela IV. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes de PPI-IC sintetizados a 10 °C.

Filme e meio	j_a ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	j_c ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$ j_a/j_c $	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	$[(E_a + E_c) / 2]$
PPI-IC	0,03	-0,08	0,38	-0,05	-0,45	0,40	-0,25
PPI-IC-AChE	0,02	-0,06	0,33	0,35	-0,58	0,93	-0,11
PPI-IC em ATCl	0,01	-0,07	0,14	0,28	-0,53	0,81	-0,12
PPI-IC-AChE em ATCl	0,01	-0,04	0,25	0,15	-0,45	0,60	-0,15

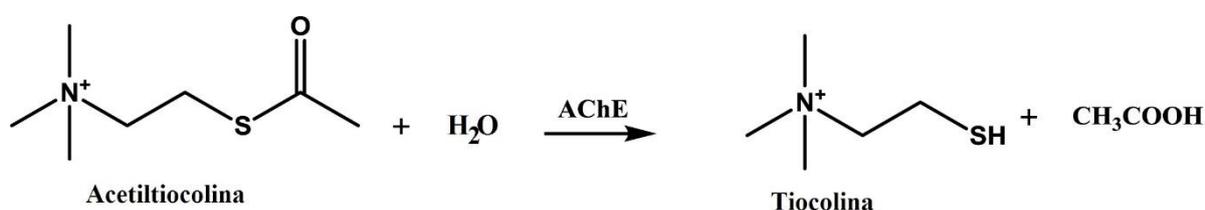


Figura 26. Mecanismo de reação entre acetiltiocolina e AChE.¹³⁸

A Figura 27 apresenta os voltamogramas do filme PPI-IC-NPAu e modificado com a enzima AChE (50 U) em i) tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e ii) no mesmo meio contendo ATCl 0,5 mmol L⁻¹. O comportamento eletroquímico do nanocompósito PPI-IC-NPAu exibiu o par redox característico do PPI (voltamograma a) em + 0,51 V (oxidação) e - 0,78 V (redução). No entanto, os processos redox são desfavorecidos na presença do ATCl (voltamograma c), havendo uma diminuição significativa da densidade de corrente e resolução de picos redox. Após a imobilização da enzima AChE (voltamograma b), observam-se picos de oxidação e redução em + 0,08 V e - 0,46 V, respectivamente para a medida em PBS (voltamograma b), resultando em maiores densidades de corrente, melhor reversibilidade e menor resistência à troca de carga (ver dados na Tabela V). Na presença de ATCl, o filme modificado com a enzima (voltamograma d) passa a exibir o par redox em *ca.* + 0,37 V (anódico) e - 0,57 V (catódico), que podem ser atribuídos a oxidação da tiocolina, produto da hidrólise de ATCl catalisada pela AChE. Adicionalmente, após a imobilização da AChE, de forma oposta aos filmes de PPI-IC (Figura 26) verificou-se um aumento significativo da densidade de corrente e carga, independente do meio, sugerindo que o processo de imobilização ocorra de forma diferente na presença das NPAu.⁴⁰ De fato, as análises de Raman e MEV corroboram esta hipótese.

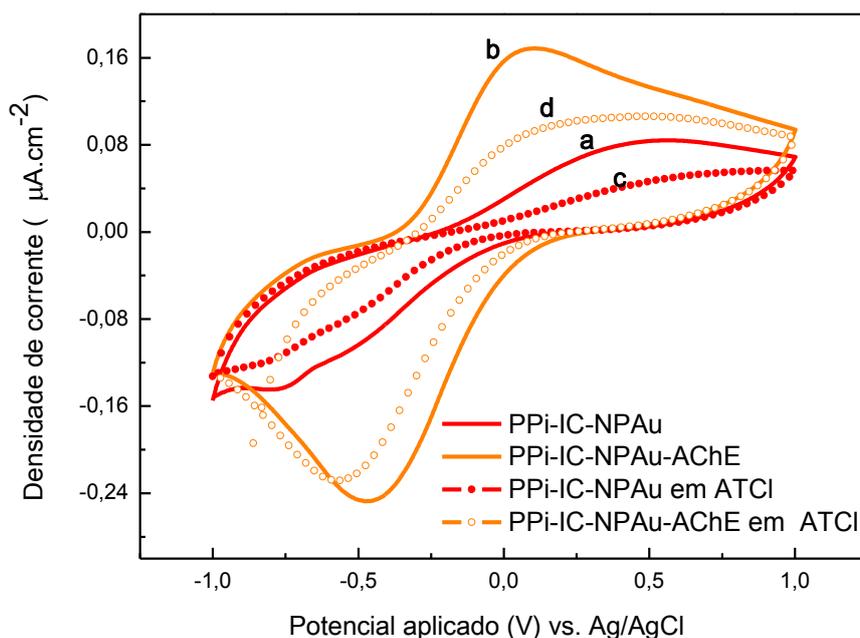


Figura 27. Voltamogramas dos filmes PPI-IC-NPAu em PBS (a) e em 0,5 mM ATCl em PBS (c) PPI-IC-NPAu-AChE em PBS (b) e em 0,5 mM ATCl em PBS (d). Velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

Tabela V. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes do nanocompósito PPI-IC-NPAu sintetizados a 10°C .

Filme e meio	j_a ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	j_c ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$ j_a/j_c $	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	$[(E_a + E_c / 2)]$
PPI-IC-NPAu	0,08	-0,14	0,57	0,51	-0,78	1,29	-0,13
PPI-IC-NPAu-AChE	0,17	-0,25	0,68	0,08	-0,46	0,54	-0,19
PPI-IC-NPAu em ATCl	-	-	-	-	-	-	-
PPI-IC-NPAu-AChE em ATCl	0,10	-0,23	0,43	0,37	-0,57	0,94	-0,10

A Figura 28 apresenta os voltamogramas do filme de nanocompósito PPI-IC-DS-NPAu e modificado com a enzima AChE (50 U) em i) tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e ii) no mesmo meio contendo ATCl $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. O comportamento eletroquímico do PPI-IC-DS-NPAu em solução tampão PBS (voltamograma a) ficou evidente, apresentando par redox da mesma forma que os filmes de PPI-IC e PPI-IC-NPAu, mantendo o comportamento após a imobilização da

enzima (voltamograma b). De forma semelhante aos nanocompósitos de PPI-IC-NPAu observados no voltamograma anterior, a imobilização da enzima nos filmes de PPI-IC-DS-NPAu resultou em aumento de densidade de corrente e de carga do voltamograma e na presença de ATCl, os filmes sem (voltamograma c) e com enzima imobilizada (voltamograma d) apresentaram uma diminuição ainda mais drástica de densidade de corrente e de carga. Este comportamento pode ser resultante da baixa aderência destes filmes aos eletrodos. Adicionalmente, a imobilização pode não ter sido eficiente, conforme evidenciado nas caracterizações estruturais, morfológicas e ópticas, evitando que a hidrólise da acetilcolina ocorra.

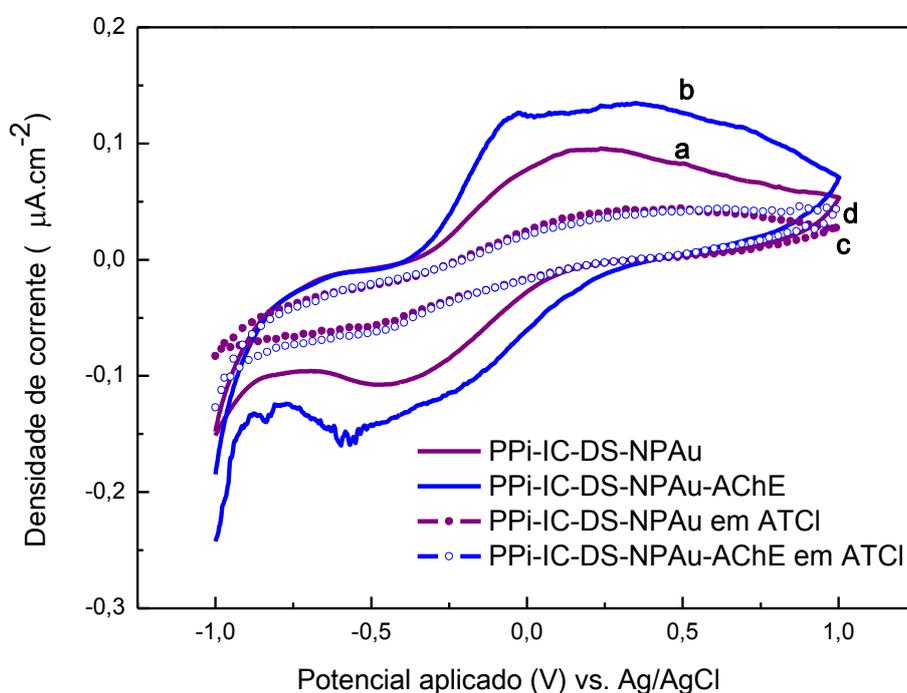


Figura 28. Voltamograma dos filmes PPI-IC-DS-NPAu (a) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) em PBS; PPI-IC-DS-NPAu (c) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (d) em 0,5 mM ATCl em PBS. Velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹.

Os parâmetros eletroquímicos obtidos dos voltamogramas da Figura 28 estão resumidos na Tabela VI. O nanocompósito apresentou comportamento semelhante em termos de reversibilidade e resistência à transferência de carga após a imobilização da enzima, podendo ser resultante da baixa densidade de enzimas imobilizadas em sua superfície. O comportamento do material com e sem enzima foi similar, o que corrobora com o Raman, de que provavelmente a imobilização tenha sido menor e com os sítios ativos bloqueados. A perda de definição dos picos redox em meio contendo ATCl impossibilitou a caracterização nessa condição.

Tabela VI. Parâmetros eletroquímicos obtidos por VC em tampão PBS na ausência e presença do substrato ATCl para os filmes do nanocompósito PPI-IC-DS-NPAu sintetizados a 10 °C.

Filme e meio	j_a ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	j_c ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$ j_a/j_c $	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	$[(E_a + E_c) / 2]$
PPI-IC-DS-NPAu	0,10	-0,11	0,90	0,18	-0,46	0,64	-0,14
PPI-IC-DS-NPAu- AChE	0,12	-0,15	0,80	-0,03	-0,59	0,56	-0,31
PPI-IC-DS-NPAu em ATCl	-	-	-	-	-	-	-
PPI-IC-DS-NPAu- AChE em ATCl	-	-	-	-	-	-	-

Ao comparar a resposta catalítica para ATCl dos três filmes de PPI modificados com a enzima AChE (Figura 29), pode-se observar que a resposta eletroquímica para o filme de PPI-IC-NPAu-AChE foi muito maior quando comparada com a resposta do filme PPI-IC-AChE e PPI-IC-DS-NPAu-AChE, com uma densidade de carga 5 vezes maior em relação a PPI-IC-AChE e 1,8 vezes maior em relação a PPI-IC-DS-NPAu-AChE. Isso pode ser atribuído a uma imobilização mais eficiente da enzima (maior quantidade de sítios ativos expostos) e à presença das NPAu, que facilita a ação das enzimas devido a uma menor resistência à transferência de carga uma vez que essas apresentam propriedades condutoras, além do comportamento catalítico, o que por consequência promove mais eficientemente a oxidação da tiocolina gerada, justamente porque apresentam alta afinidade com a tiocolina. Essa afinidade das NPAu pelo grupo mercapto (R-SH) presente na tiocolina parte da formação de uma ligação coordenada entre Au^0 e o par de elétrons do enxofre, ou uma ligação covalente de Au-R-SH .¹³⁹ As NPAu foram distribuídas homogeneamente na superfície do filme durante a síntese, promovendo um ótimo material para a imobilização da enzima AChE. Além disso, auxiliam no transporte de elétrons e exibem uma resposta mais sensível do que filmes modificados somente com o polímero condutor.

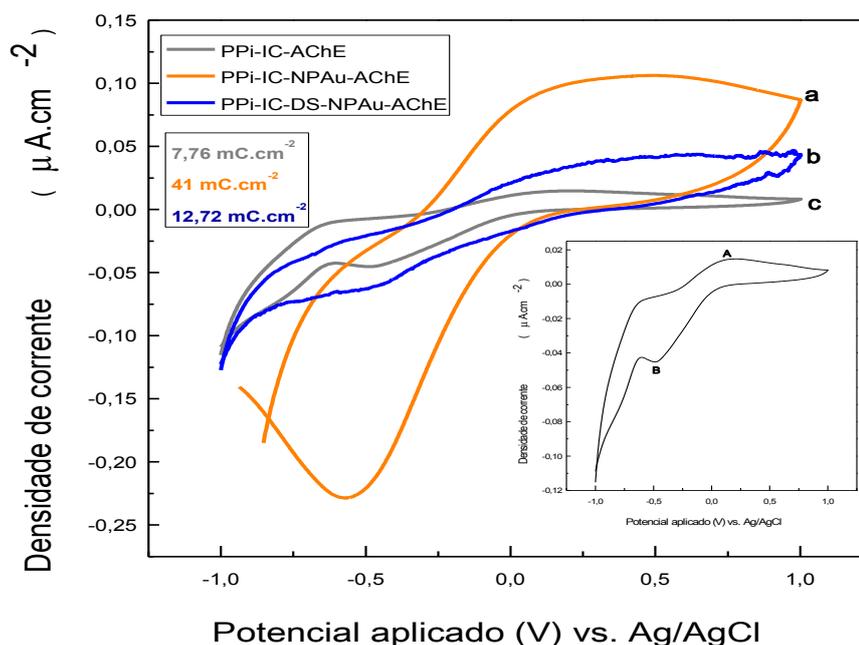


Figura 29. Voltamogramas dos filmes PPI-IC-NPAu-AChE (a), PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) e PPI-IC-AChE (c) em 0,5 mM ATCl em PBS. *inset*: PPI-IC-AChE. Velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

Apesar do PPI-IC-AChE apresentar a menor densidade de carga, observa-se através do *inset* da Figura 29, a presença de dois picos redox definidos (A e B) diferente do filme PPI-IC-DS-NPAu-AChE, que apesar de mais espesso, apresentou menor densidade de corrente e de carga que o nanocompósito PPI-IC-NPAu-AChE. Nestes nanocompósitos, não foi possível caracterizar a presença de quantidades expressivas de enzimas em sua superfície (Figura 24 d), sendo um indício de que a imobilização da AChE não foi tão eficiente.

4.7.2. Caracterização dos processos redox na interface eletrodo/solução

Com a finalidade de caracterizar o processo envolvido na interface eletrodo/solução como difusional ou adsorptivo, estudou-se a dependência dos picos anódicos e catódicos com a velocidade de varredura. Este estudo foi realizado com os filmes sintetizados a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ através de voltametrias cíclicas na faixa de potencial de $-1,0$ à $1,0 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) em ATCl $0,5 \text{ mM}$ em PBS, variando as velocidades de varredura na faixa entre 5 e 50 mV s^{-1}

Na Figura 30 estão apresentados os voltamogramas do filme PPI-IC-AChE. Em 5 mV s^{-1} (voltamograma a) o filme apresenta um par redox bem definido em $+0,25 \text{ V}$ (pico anódico, identificado como A no *inset*) e em $-0,48 \text{ V}$ (pico catódico, identificado como B no *inset*). O

pico anódico é atribuído à oxidação da tiocolina produzida a partir da hidrólise de ATCl na presença da enzima AChE, e o pico catódico indica a redução do grupo dissulfeto (R-S-S-R) formado durante a oxidação anódica da ATCl.⁹⁸ O baixo valor do potencial de oxidação pode ser relacionado ao fato de que o PPI apresenta propriedades condutoras e electrocatalíticas. Estes picos tendem a se deslocar para potenciais maiores, assim como a aumentar a densidade de corrente com o aumento da velocidade de varredura. O deslocamento de pico é observado para as velocidades entre 5 e 30 mV s^{-1} , onde o pico anódico passa para um potencial de + 0,77 V e o pico catódico para - 0,80 V (voltamograma f). A partir de 35 mV s^{-1} os potenciais dos picos continuam a aumentar, no entanto perdem definição (voltamograma g a j), sugerindo que os cátions e ânions não estão mais disponíveis para participar completamente no processo de dopagem e desdopagem em velocidades de varredura altas.¹⁴⁰

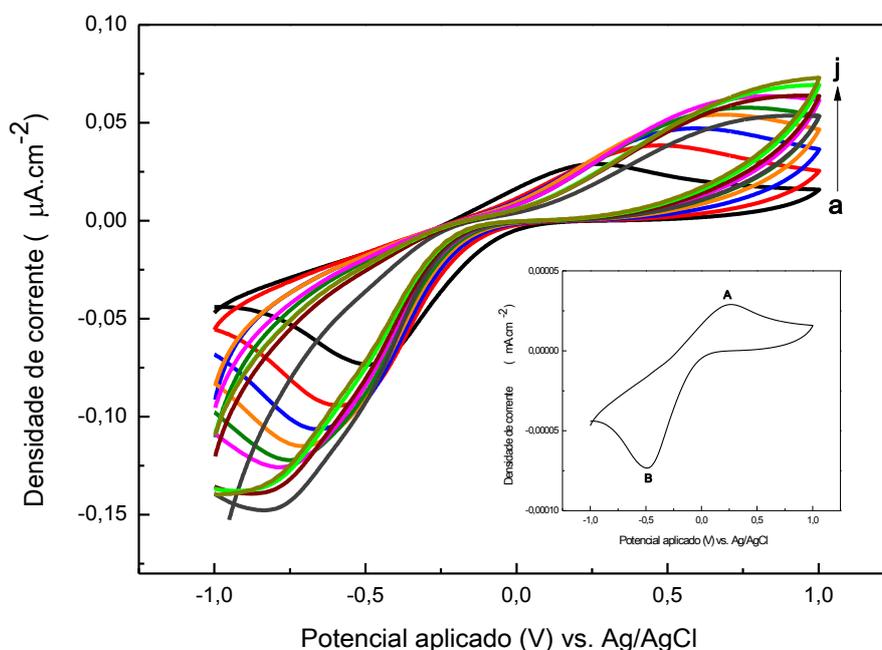


Figura 30. Voltamograma do filme PPI-IC-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s^{-1} (j). *Inset*: voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.

A dependência dos picos anódicos e catódicos do filme de PPI-IC-AChE foram avaliados na Figura 31, onde o logaritmo da corrente de pico ($\log i_p$) foi plotado em relação ao logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). Os declives encontrados foram de - 0,31 (pico anódico) e + 0,38 (pico catódico), com coeficientes de determinação de 0,927 e 0,939, respectivamente. Como é descrito pela equação de Randles-Sevcik,¹⁴¹ para gráficos de $\log i_p$

vs. $\log v$, inclinações da reta próximas do valor 0,5 indicam um mecanismo controlado por processo difusional, enquanto que inclinações próximas a 1,0 indicam um mecanismo controlado pela taxa de adsorção. Portanto, para PPI-IC-AChE o processo predominante no transporte de massa é o difusional, o que é confirmado pelo comportamento dos picos, os quais ao aumentar a velocidade de varredura tornam-se maiores em magnitude.¹⁴² Através desse tipo de gráfico também é possível determinar se o sistema do transporte de massa é reversível (troca de elétrons rápida), quase-reversível ou irreversível (troca de elétrons lenta). Para este filme o sistema predominante é quase-reversível, onde a taxa de transferência de elétrons se torna comparável à taxa de transporte de massa e a característica dos picos é de que o potencial do pico aumente conforme se aumenta a taxa de varredura.¹⁴²

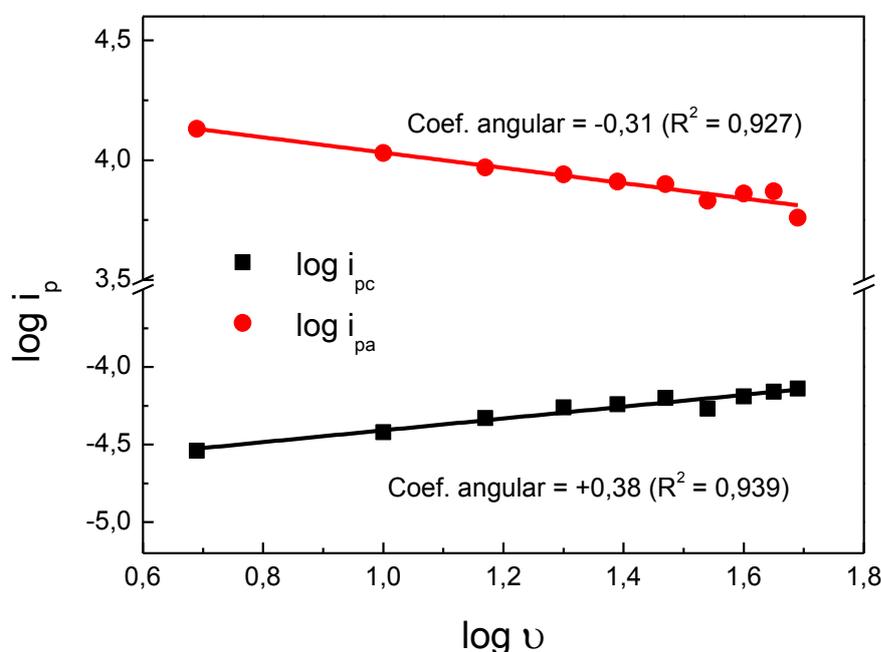


Figura 31. $\log i_p$ vs. \log velocidade de varredura (v) do filme PPI-IC-AChE.

Para o filme PPI-IC-NPAu-AChE foram obtidos os voltamogramas apresentados na Figura 32, seguindo o mesmo procedimento utilizado anteriormente para PPI-IC-AChE. Diferentemente dos voltamogramas da Figura 30, neste caso não foi observado nenhum sinal detectável para um pico anódico, enquanto que em $-0,45$ V observa-se um pico catódico (pico A do *inset*), para a velocidade de 5 mV s^{-1} .

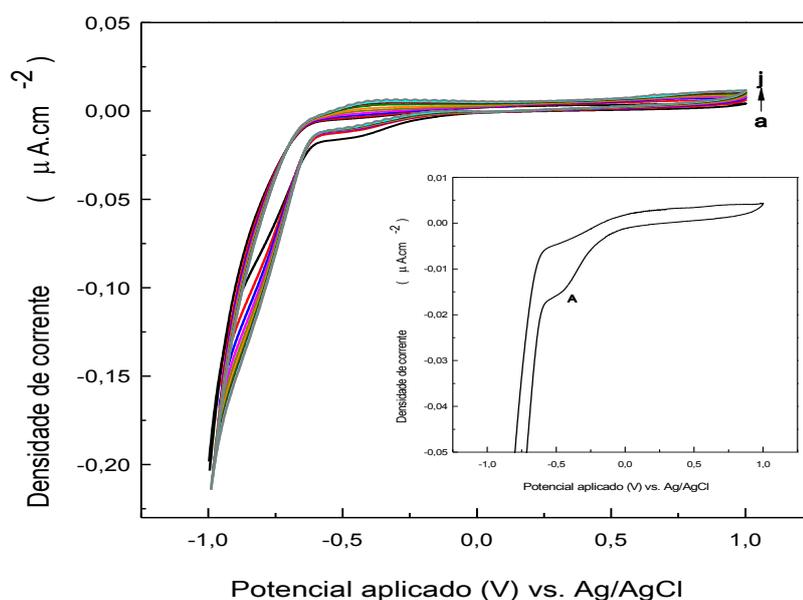


Figura 32. Voltamogramas do filme PPI-IC-NPAu-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s^{-1} (j). *Inset*: voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.

Os declives encontrados para PPI-IC-NPAu-AChE, conforme mostra a Figura 33, foram de - 0,13 (pico anódico) e + 0,37 (pico catódico), o que caracteriza o filme com um processo difusional no transporte de massa, com coeficientes de determinação de 0,988 e 0,974, respectivamente, E o sistema apresenta um comportamento de quase-reversível confirmado pelo comportamento dos gráficos, os quais tornam-se maiores em magnitude quando aumenta-se a velocidade de varredura.

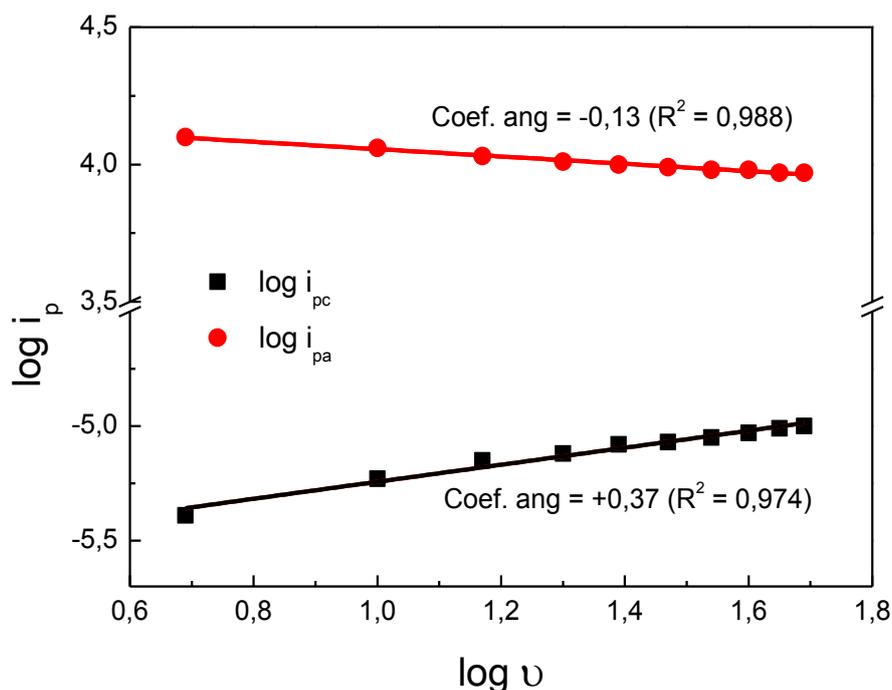


Figura 33. $\log i_p$ vs. \log velocidade de varredura (v) do filme PPI-IC-NPAu-AChE.

Para os filmes de PPI-IC-DS-NPAu-AChE, os gráficos das velocidades de varredura, representados pela Figura 34, apresenta um par de picos redox (picos A e B do *inset*) em 5 mV s^{-1} (voltamograma a) nos potenciais de $+0,30 \text{ V}$ (pico A) e $-0,46 \text{ V}$ (pico B) correspondentes aos picos de oxidação e redução, respectivamente. Para esse filme, ao contrário dos outros, o sistema predominante é reversível, onde a troca de elétrons é rápida e os picos de oxidação e redução apresentam o mesmo potencial conforme aumenta a taxa de varredura, porém neste caso, os picos diminuem em magnitude, comportamento que não é o esperado para esse tipo de sistema. Atribui-se a perda de corrente capacitiva à falta de aderência destes filmes à superfície do FTO previamente modificado com Pt.

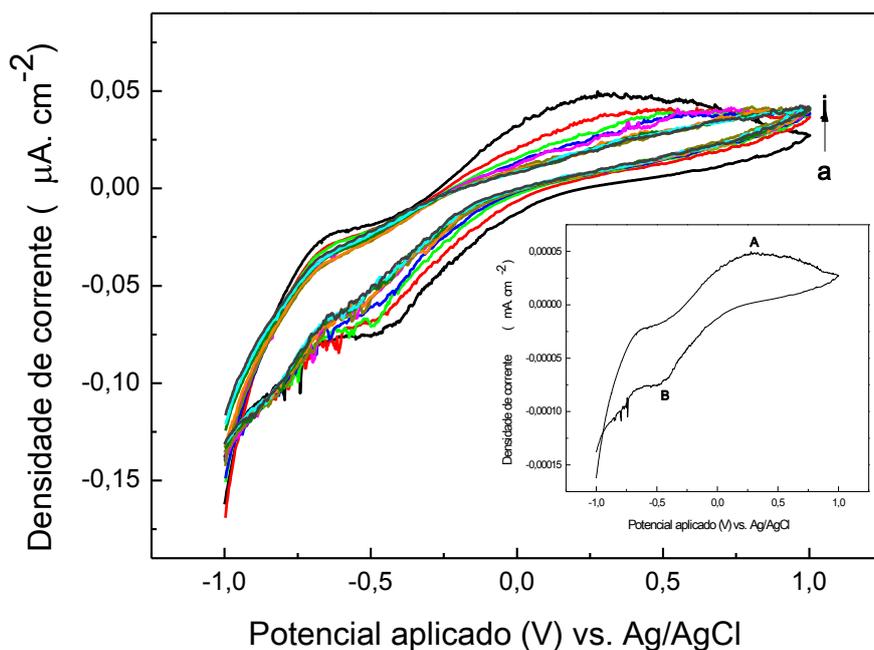


Figura 34. Voltamograma do filme PPI-IC-DS-NPAu-AChE em diferentes velocidades de varredura: 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e), 30 (f), 35 (g), 40 (h), 45 (i) e 50 mV s^{-1} (j). *Inset*: voltamograma a. Eletrólito cloreto de acetiltiocolina (ATCl) 0,5 mM em PBS.

Os declives para PPI-IC-DS-NPAu-AChE são 0,14 (pico anódico) e $-0,25$ (pico catódico), indicando um mecanismo controlado por processo difusional, com coeficientes de determinação de 0,965 e 0,910, respectivamente, conforme mostra a Figura 35.

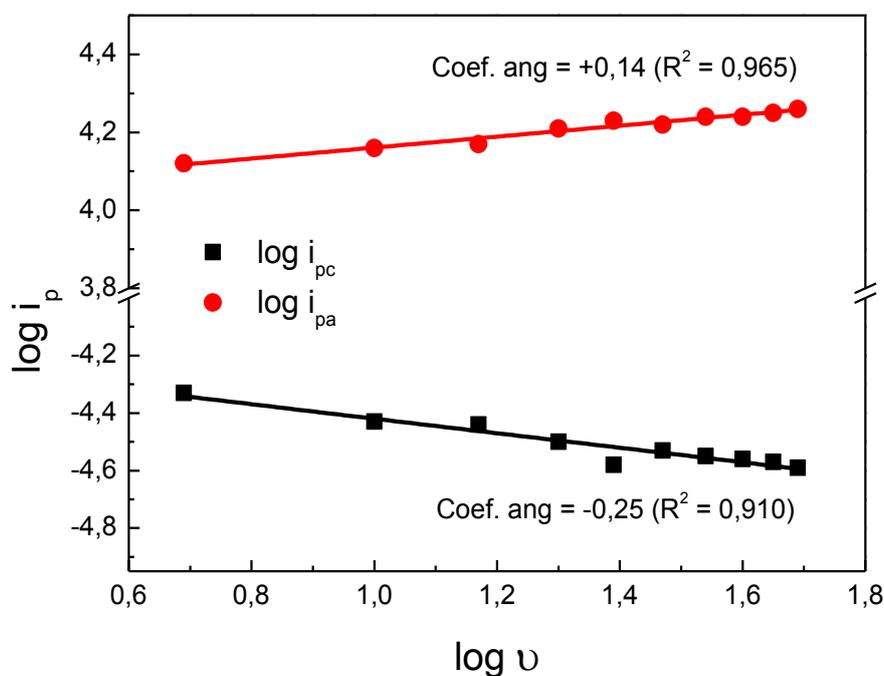


Figura 35. $\log i_p$ vs. \log velocidade de varredura do filme (v) PPI-IC-DS-NPAu-AChE.

De acordo com estes resultados, pode-se observar que além dos processos serem difusionais para todos os filmes, o sistema predominante é quase-reversível, com troca de elétrons igual a taxa de transporte de massa, onde o potencial do pico aumenta com a taxa de varredura. Através dos gráficos é possível identificar esse tipo de sistema pela resposta característica dos mesmos, onde o pico máximo se desloca com a taxa de velocidade aplicada na voltametria, ou seja, o potencial do pico se desloca conforme se aumenta a taxa de varredura. Com base nesses resultados a velocidade de 5 mV s^{-1} foi escolhida para a realização das outras medidas, uma vez que a formação de picos ocorre mais claramente, além de permitir mais tempo de contato entre a enzima e o substrato.

4.7.3. Comportamento eletroquímico na presença do par redox ferrocianeto / ferrocianato de potássio

A voltametria cíclica em solução de sonda redox como o par de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ mostra-se uma ferramenta valiosa e confiável para monitorar a resposta do eletrodo modificado, permitindo caracterizar propriedades de superfície decorrentes da modificação com materiais como NPAu ou enzimas.¹⁴³ Em virtude disto, os três filmes sintetizados a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, sem e com a enzima imobilizada, foram estudados por VC a 5 mV s^{-1} em solução de ferrocianeto/ferrocianato de potássio a fim de avaliar possíveis respostas características.

Para o filme PPI-IC (Figura 37), pode-se observar dois picos de oxidação em $+0,28 \text{ V}$ e $-0,11 \text{ V}$ e também dois de redução em $+0,13 \text{ V}$ e $-0,54 \text{ V}$ no filme sem AChE (voltamograma a), os quais correspondem ao comportamento redox do par ferrocianeto/ferrocianato. Na presença da enzima imobilizada no filme (voltamograma b), há um pico de oxidação evidente em $+0,33 \text{ V}$ e um de redução menos intenso em $+0,13 \text{ V}$, isso pode ser atribuído ao fato da AChE ter agido como barreira entre a interface do filme e o eletrólito, indicando uma competição entre a enzima e o ferrocianeto/ferrocianato, bloqueado a transferência de carga. O *inset* mostra a resposta desses filmes após a inibição no pesticida metil paration (MP). Para PPI-IC (voltamograma A do *inset*) observa-se um deslocamento dos potenciais dos picos de oxidação do filme quando comparado com os picos obtidos antes da inibição, que passam para um valor de $-0,23 \text{ V}$ e $+0,30 \text{ V}$. Em $+0,09 \text{ V}$ ocorre o aparecimento de um pico de redução. O deslocamento nos valores desses picos podem ser atribuídos ao processo redox do MP, que ocorrerá concomitantemente com os processos redox do ferrocianeto/ferrocianato, ocasionando numa possível interação entre essas duas espécies entre a interface do filme e ao eletrólito, uma vez que o MP encontra-se ligado na superfície do

eletrodo (através da incubação na solução do pesticida). O processo de transferência de elétrons do pesticida envolve o aparecimento de dois picos de redução, um origina da redução do grupo nitro para hidroxilamina (reação 1), o qual é oxidado para o grupo nitroso (reação 2), sendo este a origem do pico de oxidação. O outro pico de redução origina do processo reverso (reação 3) da reação 2, envolvendo então a transferência reversível de 2 elétrons em um processo redox, conforme mostra o esquema ilustrado na Figura 36.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

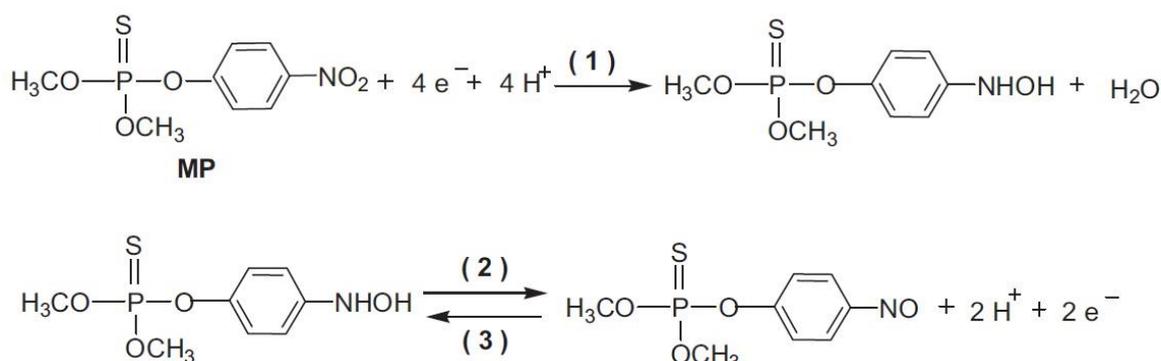


Figura 36. Esquema do mecanismo de transferência de elétrons do metil paration.¹⁴⁴

Como pode ser observado no voltamograma A do *inset*, o filme PPI-IC após a inibição apresentou dois picos de oxidação, esses picos podem ser atribuídos ao ferrocianeto/ferrocianato, porém conforme segue a reação de transferência de elétrons do MP, o pico de oxidação em + 0,30 V também pode ser atribuído a presença do pesticida na superfície do filme, pois de acordo com valores encontrados na literatura¹⁴⁷ esse pico de oxidação aparece em torno de + 0,085 V. O deslocamento do pico de oxidação para o valor de + 0,30 V encontrado no voltamograma A do *inset* em comparação com o valor da literatura para o MP, pode ser relacionado com a interação das espécies do pesticida e o eletrólito, como foi discutido anteriormente. Da mesma maneira essa relação pode ser atribuída ao aparecimento do pico de redução em + 0,09 V, indicando a presença de MP e ferrocianeto/ferrocianato, ocorrendo novamente um deslocamento do valor encontrado quando comparado com o pico de oxidação obtido antes da inibição (em + 0,13 V) e também com o valor encontrado na literatura¹⁴⁷ (- 0,007 V).

No PPI-IC-AChE (voltamograma B do *inset*) nota-se novamente picos de oxidação em - 0,31 V correspondente ao par redox ferrocianeto/ferrocianato e em + 0,30V atribuído a interação do MP com ferrocianeto/ferrocianato. Dois picos de redução foram observados em + 0,11 V e - 0,53 V. Em + 0,11 V, conforme foi discutido no voltamograma A do *inset*, esse pico pode estar relacionado com a presença de MP e ferrocianeto/ferrocianato no meio,

enquanto que o aparecimento do segundo pico de redução em $-0,53$ V pode ser atribuído ao MP, uma vez em que o valor encontrado encontra-se próximo de valores encontrados na literatura¹⁴⁷. O surgimento desse pico está relacionado com o fato do pesticida se ligar irreversivelmente ao centro ativo da enzima imobilizada na superfície do filme.

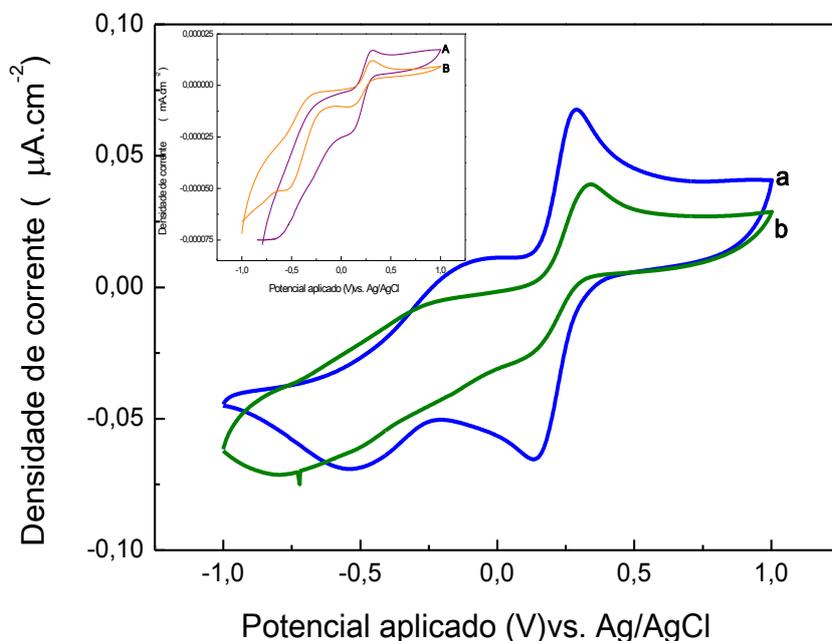


Figura 37. Voltamograma do filme (a) PPI-IC e (b) PPI-IC-AChE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. *Inset*: PPI-IC (A) e PPI-IC-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.

Nos voltamogramas obtidos para o filme PPI-IC-NPAu (Figura 38), pode-se observar dois pico de oxidação em $-0,30$ V e $+0,38$ V e dois de redução em $0,06$ V e $-0,47$ V pertencentes ao filme sem AChE (voltamograma a). Assim como para o PPI-IC, esses picos correspondem ao comportamento do íon ferricianeto e o deslocamento dos valores dos picos obtidos em relação ao PPI-IC pode ser atribuído a presença das NPAu. Após a imobilização da enzima AChE (voltamograma b), observa-se algumas modificações no voltamograma, como a presença de um ombro em $+0,03$ V, possivelmente devido a uma competição entre a AChE e o ferrocianeto/ferrocianato, e um pico de oxidação em $+0,49$ V e dois de redução, ambos amplos e de baixa intensidade de corrente, em $-0,07$ V e $-0,41$ V. Diferentemente para o que foi observado em PPI-IC-AChE, nesse caso a resposta de corrente aumenta na presença da AChE, possivelmente devido as NPAu que facilitam a transferência de elétrons e melhoram a condutividade do filme. O *inset* mostra a resposta desses filmes após a inibição no pesticida metil paration (MP). Para PPI-IC-NPAu (voltamograma A) observam-se dois picos de oxidação dos filmes antes da inibição no valor de $-0,26$ V e $+0,34$ V, e dois picos intensos equivalentes à redução em $+0,05$ V e $-0,51$ V. Conforme foi observado para o filme anterior após a inibição,

neste caso para o PPI-IC-NPAu também ocorre pequenos deslocamentos em relação aos valores obtidos para os picos de oxidação e redução do filme antes da inibição e também com relação aos valores encontrados na literatura para o MP. O surgimento do segundo pico de redução confirma a presença de MP na superfície do filme. Por outro lado, para o PPI-IC-NPAu-AChE (voltamograma B) nota-se o deslocamento do “ombro”, presente antes da inibição, para valores negativos levando à formação de um pico de oxidação em $-0,26$ V. Nesse caso, pode haver uma competição entre a enzima AChE e o par redox ferrocianeto/ferrocianato, aumentando a resistência a transferência de carga, além disso, os grupamentos amina presentes na enzima podem adsorver o par redox ferrocianeto/ferrocianato, intensificando os picos de corrente. O segundo pico de oxidação em $+0,46$ V pode estar relacionado com a oxidação do ferrocianeto/ferrocianato e também com a oxidação do pesticida, com valores deslocados para potenciais mais positivos quando comparados com o filme PPI-IC-AChE e com os valores encontrados na literatura¹⁴⁷, talvez pela presença das NPAu. Também foram observados dois picos de redução, em $-0,02$ V e $-0,51$ V, sendo esse segundo pico em $-0,51$ V novamente atribuído a presença do MP no sítio ativo da AChE.

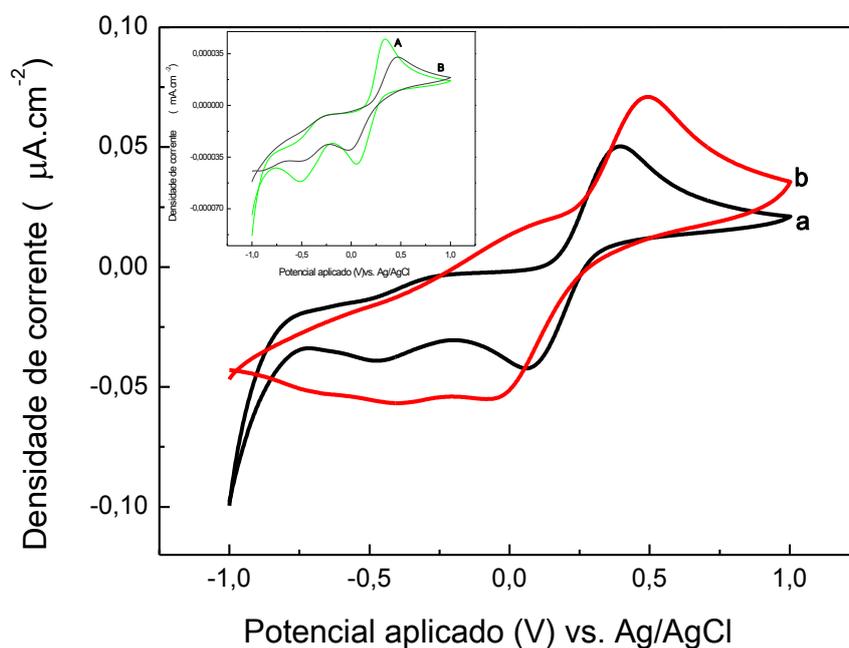


Figura 38. Voltamograma do filme PPI-IC-NPAu (a) e PPI-IC-NPAu-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. *Inset*: PPI-IC-NPAu (A) e PPI-IC-NPAu-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.

Nos voltamogramas dos filmes de PPI-IC-DS-NPAu (voltamograma a, Figura 39) pode-se observar um pico de oxidação em $+0,44$ V e de redução em $+0,10$ V, resultado que é similar com os encontrados para o filme PPI-IC-NPAu, e isso pode estar atribuído ao fato de o

DS não alterar significativamente a resposta do filme na presença do par redox ferrocianeto/ferrocianato. Porém, a presença de um segundo dopante, juntamente com as NPAu melhora a transferência de elétrons e por consequência o pico de oxidação aparece mais intenso quando comparado aos outros filmes. No entanto, após a imobilização da enzima, apesar de apresentarem também, dois picos de oxidação, neste caso em - 0,02 V e + 0,33 V, associados à resposta do ferrocianeto/ferrocianato frente à AChE, há o surgimento de um terceiro pico em + 0,73 V que pode ser resultado de uma interação entre o DS imobilizado com AChE e o eletrólito. Também observou-se dois picos de redução em + 0,02 V e -0,37 V, seguindo o mesmo comportamento dos filmes anteriores. O *inset* mostra a resposta desses filmes após a inibição no pesticida metil paration (MP). Para PPI-IC-DS-NPAu (voltamograma A do *inset*) observa-se um pico de oxidação intenso em + 0,41 V e um de redução em +0,05 V, sendo o comportamento desses picos basicamente iguais a resposta obtida antes da inibição, talvez pela ligação do MP na superfície do filme não ter sido tão efetiva. Para o filme PPI-IC-DS-NPAu-AChE (voltamograma B do *inset*) ocorre a formação de um pico de oxidação e redução bem largos em + 0,40 V e - 0,33 V, respectivamente, não sendo possível tirar conclusões claras quanto a presença do pesticida ligado a AChE na superfície do filme. Isso pode ser um indício de que a imobilização da enzima não tenha sido tão efetiva nesse filme.

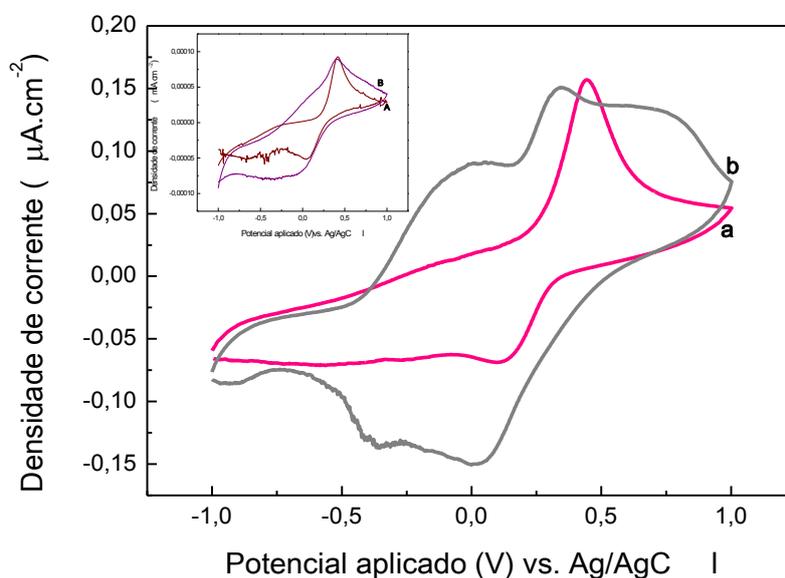


Figura 39. Voltamograma do filme PPI-IC-DS-NPAu (a) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. *Inset*: PPI-IC-DS-NPAu (A) e PPI-IC-DS-NPAu-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.

As voltametrias dos filmes modificados com AChE (PPI-IC-NPAu-AChE e PPI-IC-AChE) estão plotadas na Figura 40 para fins de comparação do comportamento eletroquímico em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O nanocompósito PPI-IC-NPAu-AChE (voltamograma a)

apresentou picos redox mais definidos para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, permanecendo após a inibição da enzima pelo pesticida MP. Em virtude disto, o nanocompósito PPI-IC-NPAu-AChE parece ser o filme mais adequado para aplicação, principalmente pelos picos correspondentes à resposta da AChE evidentes e por seu comportamento na presença do pesticida, como evidenciado no voltamograma A do *inset*.

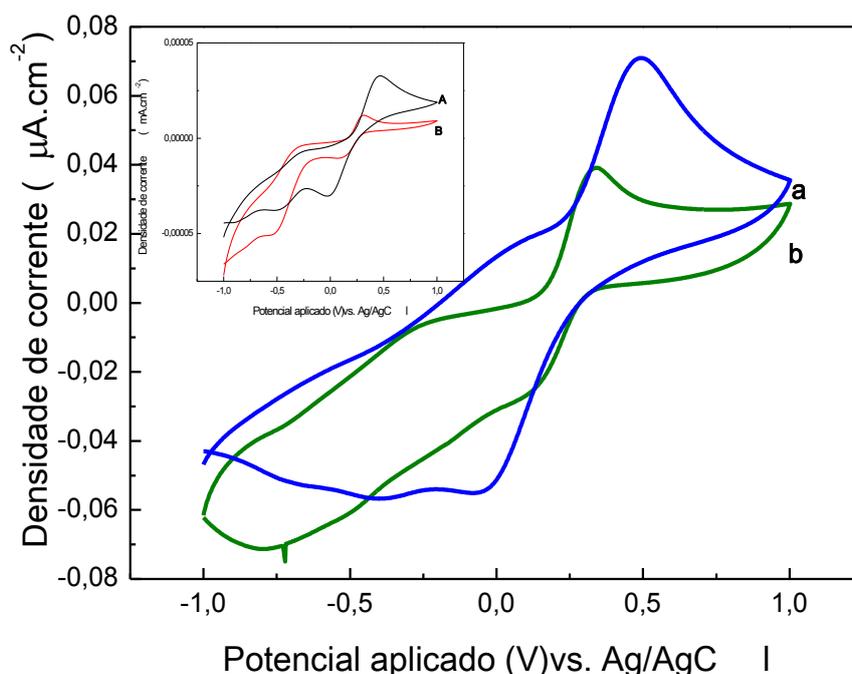


Figura 40. Voltamograma do filme PPI-IC-NPAu-AChE (a) e PPI-IC-AChE (b) em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. *inset*: PPI-IC-NPAu-AChE (A) e PPI-IC-AChE (B) depois da inibição em 1×10^{-3} M de metil paration.

Ambos os filmes (PPI-IC-NPAu-AChE e PPI-IC-AChE) apresentaram dois picos de oxidação e dois de redução na presença do pesticida MP, que condizem com a resposta dos filmes em relação ao par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e com a transferência de elétrons do pesticida, mostrando a resposta dos mesmos em relação a AChE.

O filme contendo o segundo dopante DS e modificado com a enzima não foi considerado no estudo comparativo, pois como foi mostrado na Figura 39, o mesmo não apresenta uma resposta clara do comportamento eletroquímico, ou seja, os picos, apesar de estarem presentes na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, com a inibição em MP eles deixam de ser evidentes e intensos, dificultando assim a associação destes com as possíveis reações que ocorrem na interface do filme com a AChE e posteriormente com MP. Além disso, esse filme apresenta pouca aderência

ao eletrodo comparado aos outros filmes, desprendendo com facilidade durante as medidas, conforme ocorre a aplicação de potencial.

4.8. APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NA DETECÇÃO DE METIL PARATION

Os filmes modificados com a enzima AChE podem ser utilizados como biossensores na medição quantitativa de pesticidas organofosforados, uma vez que a corrente produzida está relacionada com a atividade da enzima. Conforme descrito na seção 3.10, após a imersão do filme nas soluções de MP, a corrente diminuiu à medida que a concentração do pesticida aumenta. Isso ocorre pois o metil paration exibe uma toxicidade alta e está envolvido na inibição irreversível da AChE, permitindo assim a determinação do mesmo. Este comportamento está ilustrado na Figura 41. Quando o filme de PPI-IC-AChE é imerso nas soluções de pesticidas de diferentes concentrações, por cerca de 5 minutos, nota-se que as densidades de corrente produzidas diminuem conforme se aumenta a concentração de metil paration.

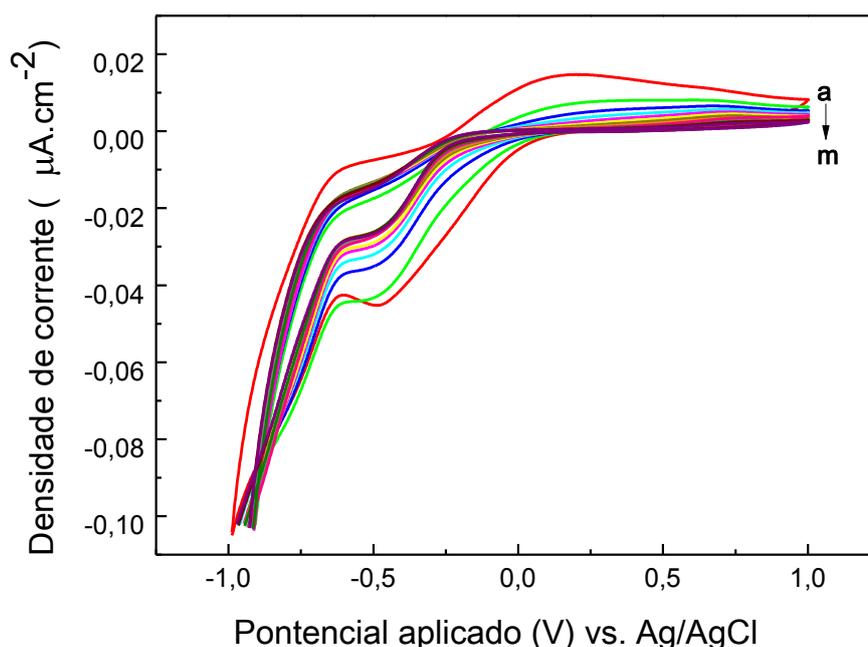


Figura 41. Voltamograma do PPI-IC-AChE em 0,5mM de ATCl em PBS (a) e depois da inibição em $1,152 \times 10^{-7}$ (b), $5,67 \times 10^{-7}$ (c), $3,84 \times 10^{-6}$ (d), 5×10^{-6} (e), $7,68 \times 10^{-6}$ (f), 1×10^{-5} (g), $2,99 \times 10^{-5}$ (h), 5×10^{-5} (i), $7,48 \times 10^{-5}$ (j), 1×10^{-4} (k), $2,99 \times 10^{-4}$ (l) e 5×10^{-4} (m) mol L⁻¹ de MP, respectivamente. Velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹.

Os picos de oxidação e redução, referentes à hidrólise de ATCl foram observados em *ca.* + 0,16 V e - 0,49 V (voltamograma a), respectivamente, e continuam presentes após a inibição na primeira solução do pesticida MP (voltamograma b), porém ambos diminuem o

sinal da corrente com o aumento das concentrações das soluções de MP (voltamograma c à m). Este comportamento para o pico anódico segue até nenhum sinal ser detectável nas soluções mais concentradas, enquanto que para o pico catódico observa-se a mesma diminuição na corrente, com a intensidade do pico decrescendo proporcionalmente com o aumento das concentrações do pesticida, em virtude disto, escolhemos o pico catódico para a caracterização do biossensor.

A diminuição na corrente, que permite a detecção do pesticida, se relaciona com o fato de não ocorrer a hidrólise do substrato ATCl pela ação da AChE, visto que os sítios ativos foram bloqueados pela presença do pesticida MP, que age como um inibidor irreversível, e por consequência, não ocorre a produção de tiocolina, que é uma espécie eletroativa. Pesticidas organofosforados como o MP inibem a AChE ao formar uma ligação covalente no grupo serina-OH (ser-OH) do sítio ativo da AChE. O mecanismo está apresentado na Figura 42, onde parte da ligação covalente da serina-OH se liga ao átomo central (P) do MP, formando um complexo reversível onde o grupo de saída foi substituído pelo oxigênio da ser-OH.¹⁴⁸

Esse complexo sofre fosforilação e após passa por um processo de desalquilação, formando então a AChE fosforilada, que é um complexo irreversível, isso ocorre porque a carga negativa do grupo fosforil (PO_3^-) é mais estável e isso faz com que a AChE deixe de ser reativa.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

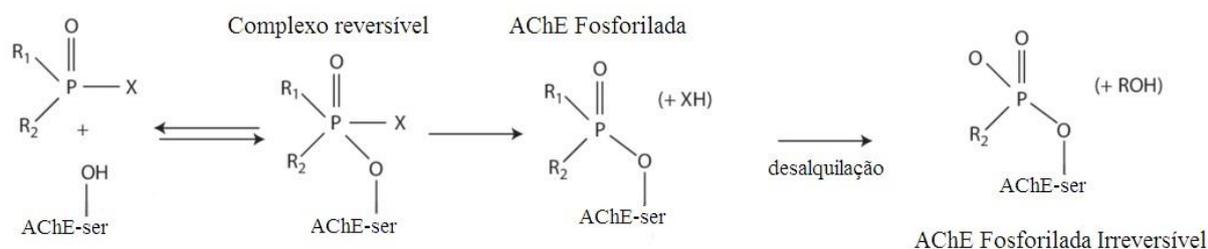


Figura 42. Mecanismo de fosforilação da AChE.¹⁵⁰

Com base na mudança de corrente produzida, é possível obter a porcentagem de inibição do pesticida, aplicando a Equação 2:⁹⁸

$$I\% = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde I_0 é a resposta inicial do biossensor ao ATCl antes da incubação na solução de pesticida e I_1 é a resposta após a incubação na solução do inibidor. Para o filme de PPI-IC-AChE utilizou-se o potencial em - 0,4 V para calcular a mudança da corrente de pico produzida, obtendo-se (Figura 43) uma faixa de inibição de 48 a 95,2 %, correspondente à solução mais

diluída ($1,152 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) até a mais concentrada ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Através dos resultados obtidos, a inibição do MP foi proporcional à sua concentração em uma faixa, de $5,76 \times 10^{-7}$ à $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (*inset*), e a equação de linearização da inibição (%) obtida foi:

$$I (\%) = 1,92 \times 10^6 c + 54,9815 (\%), \text{ com um coeficiente de determinação } (R^2) \text{ de } 0,976.$$

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da média das correntes obtidas pela voltametria cíclica do filme em ATCl (branco), onde foram aplicados 10 ciclos. Utilizando-se um potencial de -0,5 V para a seleção das correntes, calculou-se a média através da Equação 3:

$$\bar{x} = \frac{\sum i}{n} \quad \text{Equação 3}$$

Onde $\sum i$ é a soma das correntes em -0,5 V e n é o número de ciclos aplicados. Obteve-se um valor de $54,42 \times 10^{-6} \text{ A}$, a partir disso calculou-se o desvio padrão (DP), através da Equação 4:

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde xi é a corrente para cada ciclo em -0,5 V, obtendo um valor de $10,09 \times 10^{-6} \text{ A}$ para o DP. Com a inclinação da reta da inibição (%) (Figura 43), calculou-se o limite de detecção e de quantificação, através das Equações 5 e 6:

$$LD = \frac{3 \cdot DP}{b} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10 \cdot DP}{b} \quad \text{Equações 5 e 6}$$

Onde b é a inclinação da reta. Os valores obtidos foram de $1,57 \times 10^{-11}$ e $5,25 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente para LD e LQ, e através de uma regra de 3 simples, converteu-se esses valores em termos da massa de MP detectado, ao multiplicar os valores encontrados para LD e LQ pela massa molar de MP. Foi obtido então para o LD um valor de $4,15 \text{ ng L}^{-1}$ e LQ de $13,8 \text{ ng L}^{-1}$. O limite de detecção obtido é comparável com os que já foram reportados em outros trabalhos (Tabela VII) com biossensores de nanocompósitos baseados na inibição da enzima, sendo um valor menor dos quais já foram encontrados para esse tipo de material.

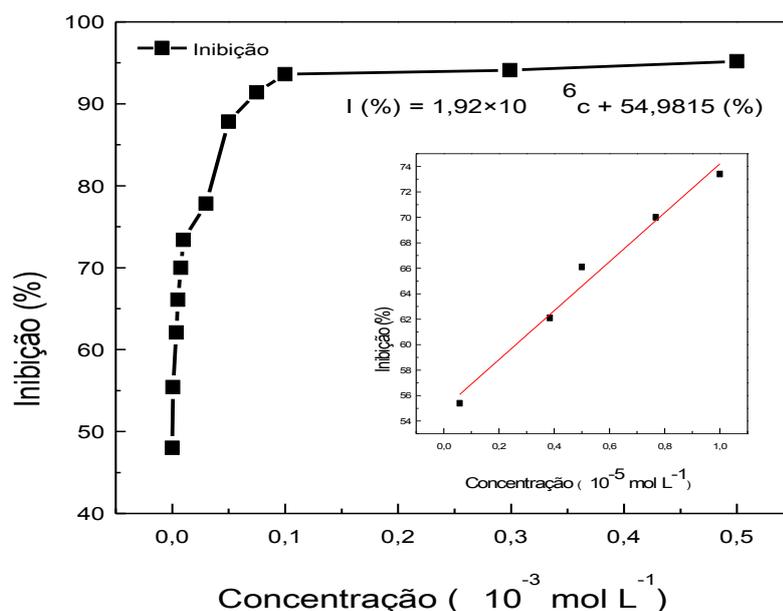


Figura 43. Curva de calibração do PPI-IC-AChE para a determinação de MP. *inset*: Relação linear entre inibição (%) e concentração de MP.

Para o filme de PPI-IC-NPAu-AChE (Figura 44), de forma semelhante, a corrente produzida diminui conforme se aumenta a concentração de metil paration. O filme também foi imerso em soluções de MP com diferentes concentrações por 5 minutos para a inibição. Os picos de oxidação e redução, referentes à hidrólise de ATCl (voltamograma a), foram observados em *ca.* + 0,36 V e - 0,56 V, respectivamente, e continuam presentes após a inibição na primeira solução do pesticida MP (voltamograma b), porém ambos diminuem o sinal da corrente com o aumento das concentrações das soluções de MP. Para o pico de oxidação, o comportamento segue, no mesmo potencial, até nenhum sinal ser detectável, após as inibições nas soluções mais concentradas (voltamograma l à o), enquanto que para o pico de redução observa-se a mesma diminuição da corrente, com a intensidade do pico decrescendo proporcionalmente com o aumento das concentrações do pesticida e o potencial se deslocando para um valor de - 0,73 V após a inibição na solução mais concentrada.

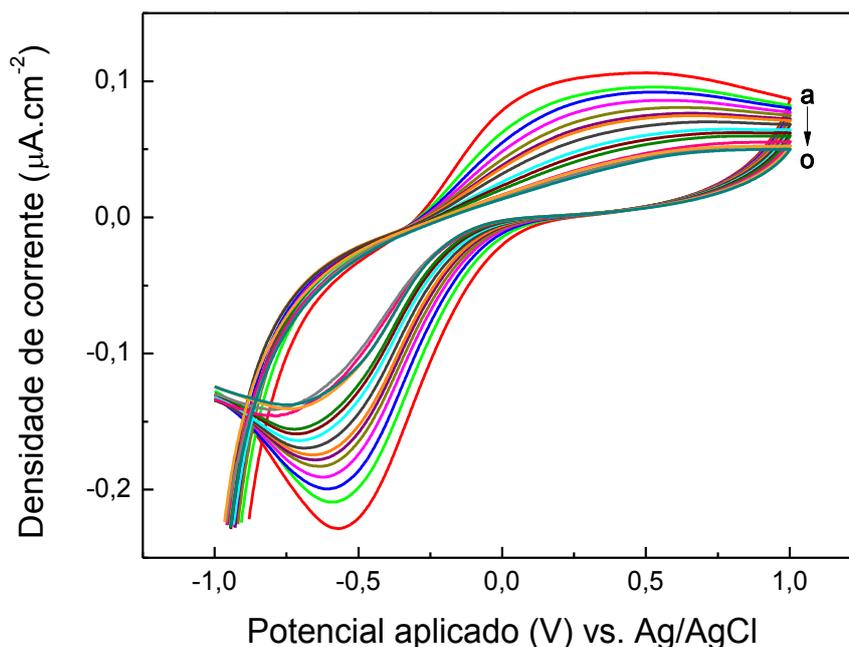


Figura 44. Voltamograma do PPI-IC-NPAu-AChE em 0,5mM de ATCl em PBS (a) e depois da inibição em $1,152 \times 10^{-7}$ (b), $5,67 \times 10^{-7}$ (c), $3,84 \times 10^{-6}$ (d), 5×10^{-6} (e), $7,68 \times 10^{-6}$ (f), 1×10^{-5} (g), $2,99 \times 10^{-5}$ (h), 5×10^{-5} (i), $7,48 \times 10^{-5}$ (j), 1×10^{-4} (k), $2,99 \times 10^{-4}$ (l) e 5×10^{-4} (m), $6,24 \times 10^{-4}$ (n) e 1×10^{-3} (o) mol L⁻¹ de MP, respectivamente. Velocidade e varredura de 5 mV s⁻¹.

A porcentagem de inibição pelo MP no filme PPI-IC-NPAu-AChE também foi calculada, utilizando o potencial em -0,4 V para calcular a mudança da corrente de pico produzida, e está apresentada na Figura 45. Através dos parâmetros otimizados, o filme PPI-IC-NPAu-AChE obteve uma faixa de inibição de 9,42 à 62,1 %, correspondente à solução mais diluída ($1,152 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) até a mais concentrada (1×10^{-3} mol L⁻¹). Através dos resultados obtidos, a inibição do MP foi proporcional à sua concentração em duas faixas, de $1,152 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ à $7,68 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (*inset A*), com variação na inibição de 9,42 à 30,19 %, e de 1×10^{-5} mol L⁻¹ à 1×10^{-4} mol L⁻¹ (*inset B*), com variação na inibição de 32 à 51,43 %. As equações de linearização das inibições obtidas para cada faixa de concentração foram:

$$I(\%) = 2,67 \times 10^6 c + 10,19 (\%) \text{ com } R^2 = 0,968 \text{ e}$$

$$I(\%) = 2,13 \times 10^5 c + 31,28 (\%), \text{ com } R^2 = 0,948, \text{ respectivamente.}$$

O limite de detecção e de quantificação foram calculados conforme foi feito para o filme PPI-IC-AChE, a partir da média das correntes obtidas pela voltametria cíclica do filme em ATCl (branco), onde foram aplicados 10 ciclos. Utilizando-se o potencial de 0,2 V para a seleção das correntes, calculou-se a média através da Equação 3, obtendo um valor de $89,05 \times 10^{-6}$ A, e a partir disso calculou-se o DP, através da equação 4, sendo esse um valor de $50,34 \times 10^{-6}$ A. Com

a inclinação da reta da inibição (%) (Figura 45) encontrada na faixa de 9,42 à 30,19 %, calculou-se o LD e o LQ, através das Equações 5 e 6. Os valores obtidos foram de $5,65 \times 10^{-11}$ e $1,88 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, para LD e LQ respectivamente e seguindo do cálculo utilizado anteriormente, através de uma regra de 3 simples, converteu-se esses valores em termos da massa de MP detectado, encontrando-se então valores finais de $14,8 \text{ ng L}^{-1}$ para o LD e de $49,5 \text{ ng L}^{-1}$ para o LQ. Assim como filme anterior, o limite de detecção obtido para PPI-IC-NPAu-AChE é comparável com os que já foram reportados em outros trabalhos (Tabela VII) com biossensores de nanocompósitos baseados na inibição da enzima, sendo um valor menor dos quais já foram encontrados para esse tipo de material.

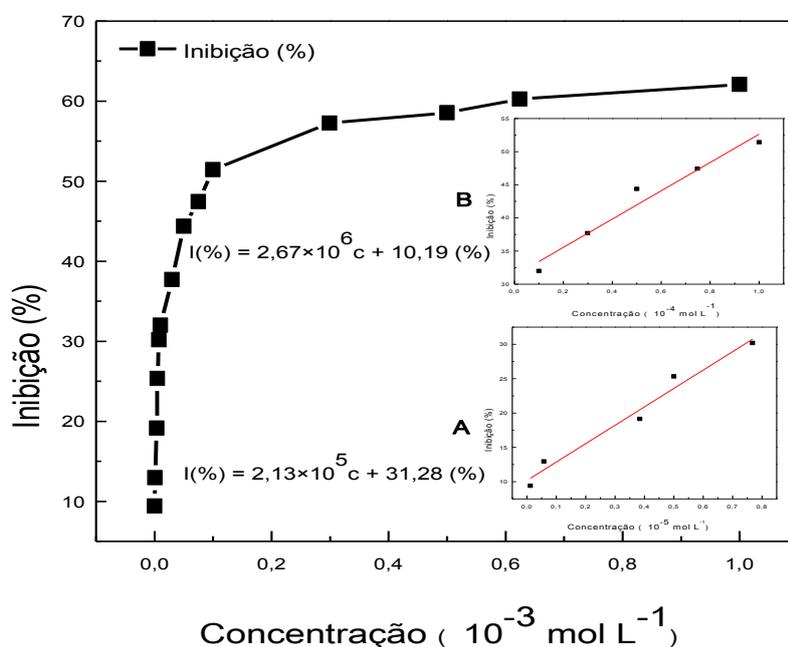


Figura 45. Curva de calibração do PPI-IC-NPAu-AChE para a determinação de MP. *Inset:* Relação linear entre inibição (%) e concentração de MP.

Tabela VII. Comparação de biossensores imobilizados com AChE em polímeros condutores para detecção de pesticidas.

Biossensor	Transdutor	Analito	Imobilização	LD	Ref.
PPi-IC-AChE	Potenciométrico	Metil Paration	Adsorção física	4,15 ng L ⁻¹	Esse trabalho
PPi-IC-NPAu-AChE	Potenciométrico	Metil Paration	Adsorção física	14,8 ng L ⁻¹	Esse trabalho
AChE/Au-PPy-rGO	Potenciométrico	Paraoxon Etil	Eletropolimerização	0.5 nM	44
poly(SNS-NH ₂)/AChE-ChO	Amperométrico	Paraoxon Etil	Ligação covalente	111 μM	97
GC/MWCNT/PANI/AChE	Cronoamperométrico	Carbaril e Metomil	Adsorção física	1.4 μmol L ⁻¹ e 0.95 μmol L ⁻¹	100
poly(TTP)/AChE/GCE	Potenciométrico	Malation	Ligação covalente	4.08 nM.	101

Os resultados da detecção do metil paration para o filme PPi-IC-DS-NPAu-AChE não foram apresentados, pois como previsto na caracterização eletroquímica, o filme não apresentou uma resposta com picos característicos, adicionalmente, não apresentou estabilidade a todas as medidas de inibição, ocorrendo facilmente o desprendimento do filme do FTO, impossibilitando a conclusão do estudo e por consequência a detecção do MP nesse filme. Isso pode ser atribuído ao fato desse filme ser mais espesso, uma vez que foi sintetizado com dois dopantes, e após a imobilização da AChE sua superfície tornava-se rugosa, o que facilitava a perda de aderência do filme.

5. CONCLUSÃO

Através desse trabalho foi possível sintetizar e caracterizar, de forma simples e eficiente, filmes de polímero condutor modificados para o possível uso como biossensor enzimático de pesticida. A caracterização estrutural feita por FTIR e Raman evidenciou a presença dos dopantes, das nanopartículas de ouro e das enzimas na matriz do polímero, além de permitirem comparar a eficiência de imobilização. Através das caracterizações morfológicas foi possível observar que os filmes contendo DS não favorecem a imobilização da enzima, sendo corroborado pelo fato de que durante a caracterização eletroquímica do PPI-IC-DS-NPAu-AChE e na detecção do pesticida, o filme não apresentou resposta característica, se desprendendo facilmente do eletrodo. Os resultados obtidos através do UV-VIS-NIR, mostraram um maior nível de dopagem para os filmes sintetizados à 10 °C, e de fato, os filmes de PPI-IC-AChE e PPI-IC-NPAu-AChE sintetizados nesta temperatura apresentaram resposta eletroquímica para o substrato ATCl, bem como para o par redox ferrocianato/ferrocianeto, exibindo picos característicos da hidrólise da ATCl, confirmando assim que o método de imobilização utilizado foi eficiente, sendo um método simples e rápido. Ambos os filmes de PPI-IC-AChE e PPI-IC-NPAu-AChE responderam à presença do pesticida metil paration através da técnica de voltametria cíclica, resultando na diminuição da corrente com o aumento da concentração das soluções de MP. Através dos voltamogramas, obteve-se uma curva relativa da porcentagem de inibição em função da concentração desse pesticida, obtendo-se para esses filmes, limites de detecção com valores adequados para sua aplicação, sendo comparáveis a outros trabalhos publicados na literatura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filho, J.P.A. *Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos*. Annablume São Paulo, **2002**.
2. <http://epoca.globo.com/tempo/filtro/noticia/2016/02/governo-do-rs-suspende-larvicidapyriproxyfen-depois-de-estudo-que-associa-produto-microcefalia.html>. Acesso em: 19/06/2017.
3. <https://news.un.org/en/story/2017/03/552872-un-human-rights-experts-call-global-treaty-regulate-dangerous-pesticides#.WMAgpdIrKM8>. Acesso em: 19/06/2017.
4. <http://sindiveg.org.br/?p=450>. Acesso em: 18/02/2016.
5. Moreira, J.C.; Peres, F.; Simões, A.C.; Pignati, W.A.; Dores, E.C.; Vieira, S.N.; Strüssmann, C.; Mott, T.; *Ciênc. saúde coletiva* **2012**, *17*, 1557.
6. Sabik, H., Jeanot, R., Roundeau, B.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 217.
7. Liu, S.; Zheng, Z.; Li, X.; *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405*, 63.
8. Popp, J.; Petö, K.; Nagy, J.; *Agron. Sustain. Dev.* **2013**, *33*, 243.
9. Rahman, N.A.; Kudin, T. I. T.; Ali, M. M. A.; Yahya, A. Z. M.; *J. Mater. Sci. Eng. A*, **2012**, *2*, 190.
10. Kishore, P. S.; Viswanathan, B.; Varadarajan, T. K.; *Nanoscale Res Lett* **2008**, *3*, 14.
11. Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P.V.; *Sensors* **2012**, *12*, 1657.
12. Mano, E.B.; Mendes, L.C.; *Introdução a polímeros*; Edgar Blücher São Paulo, **1999**, 2ª edição, p 1.
13. Silva, E. A. da; *Tese (Doutorado em Física)*; Universidade de São Paulo, São Paulo; **2009**, 107.
14. Ates, M.; *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, *33*, 1853.
15. Balint, R.; Cassidy, N.J.; Cartmell, S.H.; *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2341.
16. Maia, D. J.; De Paoli, M. -A.; Alves, O. L.; *Quím. Nova* **2000**, *23*, 204.
17. Faez, R.; Reis, C.; Freitas, P. S.; Kosima, O. K.; Ruggeri, G.; De Paoli, M. -A.; *Quim. Nova Esc.* **2000**, *11*, 13.
18. Molapo, K.M.; Ntangili, P.M.; Ajayi, R.F.; Mbambisa, G.; Mailu, S.M.; Njomo, N.; Masikini, M.; Baker, P.; Iwuoha, E. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2012**, *7*, 11859.
19. Hatchett, D.W.; Josowicz, M.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 746.
20. Shirakawa, H.; Ikeda, S.; *Polym. J.* **1971**, *2*, 231.

-
21. Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J.; *J. Chem. Soc.: Chem. Commun.* **1977**, 16, 578.
 22. Lange, U.; Roznyatovskaya, N. V.; Mirsky, V. M.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, 614, 1.
 23. Gazotti, W. A.; Nogueira, A.; Giroto, E. M.; Micaroni, L.; Martini, M.; Neves, S.; De Paoli, M. A.; In *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices*; Nalwa, H. S. (Org.); New York: Academic Press, **2000**, 10, p. 53.
 24. Gvozdenović, M.M.; Jugović, B.Z.; Stevanović, J.S.; Grgur, B.N. *Hem. Ind.* **2014**, 68, 673.
 25. Beverina, L.; Pagani, G. A.; Sassi, M.; *Chem. Commun.* **2014**, 50, 5413.
 26. Bredas, J. L.; Street, G. B.; *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 309.
 27. Baranski, A. S.; Fawcett, W. R.; McDonald, A. C.; De Norbriga, R. M.; *J. Electrochem. Soc.*, **1981**, 128, 963.
 28. Heinze, J.; Mortensen, J.; Störz bach, M.; In *Electronic Properties of Conjugated Polymers*; Kuzmany, H.; Mehring, M.; Roth, S.; Springer Science & Business Media, **2012**, p. 385.
 29. Chance, R. R.; Bredas, J. L.; Silbey, R.; *Phys. Rev. B* **1984**, 29, 4491.
 30. Laquai, F.; Wegner, G.; Bäessler, H.; *Phil. Trans. R. Soc. A* **2007**, 365, 1473.
 31. Noriega, R.; Salleo, A.; Spakowitz, A.J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 16315.
 32. Sultana, I.; Rahman, M.M.; Wang, J.; Wang, C.; Wallace, G.G.; Liu, H.; *Solid State Ionics*, **2012**, 215, 29.
 33. Giroto, E.; *Tese (Doutorado em Química)*; Universidade Estadual de Campinas; **2000**, 140f.
 34. Song, H.-K.; Palmore, R.G. T.; *Adv. Mater.* **2006**, 18, 176.
 35. Matoetoe, M.C.; *Mater. Sci. Forum* **2010**, 657, 208.
 36. Kar, P.; *Doping In Conjugated Polymers*, John Wiley & Sons, **2013**, 31.
 37. Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 876.
 38. Shi, Y.; Peng, L.; Ding, Y.; Zhao, Y.; Yu, G.; *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6684.
 39. Li, H.; Xie, K.; Pan, Y.; Wang, H.; Wang, H.; *Synth. Met.* **2012**, 16, 22.
 40. Gong, J.; Wang, L.; Zhang, L.; *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2285.
 41. Ghadim, M.F.; Imani, A.; Farzi, G.; *J. Nanostruct. Chem.* **2014**, 4, 101.
 42. Omastová, M.; Bober, P.; Morávková, Z.; Perinka, N.; Kaplanová, M.; Syrový, T.; Hromádková, J.; Trchová, M.; Stejskal, J.; *Electrochim. Acta* **2014**, 122, 296.
 43. Feng, X.; *Chin. J. Chem.*, **2010**, 28, 1359.
 44. Yang, Y.; Asiri, A.M.; Du, D.; Lin, Y.; *Analyst* **2014**, 139, 3055.
 45. Xia, J.; Chen, L.; Yanagida, S.; *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 4644.

-
46. Ferraz, N.; Strømme, M.; Fellström, B.; Pradhan, S.; Nyholm, L.; Mihranyan, A.; *J Biomed Mater Res Part A* **2012**, *100*, 2128.
47. Mike, J.F.; Lutkenhaus, J.L.; *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2013**, *51*, 468.
48. Diaz, A.F.; Kanazawa, K.K.; Gardini, G.P.; *J.C.S. Chem. Comm.*, **1979**, 635.
49. Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G.; *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 283.
50. Pina, C.D.; Falletta, E.; Rossi, M.; *Catal. Today* **2011**, *160*, 11.
51. Nalwa, H.S.; *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*, Academic Press, **2011**.
52. Street, G.; Clarke, T.; Geiss, R.; Lee, V.; Nazzal, A.; Pfluger, P.; Scott, J.; *J. Phys., Colloq.* **1983**, *44*, 599.
53. Breza, M.; Luurinc, V.; *Macromol. Theory Simul.* **1996**, *5*, 107.
54. Ferreira, J.; *Tese (Doutorado em Química)*; Universidade Estadual de Maringá, Maringá; **2009**.
55. Shrivastava, S.; Jadon, N.; Jain, R.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 55.
56. Pingarrón, J.M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A.; *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5848.
57. Chauhan, S.K.; Mukherji, S.; *Mater. Technol. (Abingdon, U. K.)* **2014**, *30*, 167.
58. Liu, R.; *Materials* **2014**, *7*, 2747.
59. Ali, Y.; Kumar, V.; Sonkawade, G. R.; Dhaliwal, S. A.; Swart, C. H.; *Vacuum*, **2014**, *9*, 265.
60. Yoon, H.; *Nanomaterials* **2013**, *3*, 524.
61. Loguercio, L. F.; Alves, C. C., Thesing, A., Ferreira, J.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 1234.
62. Gupta, K.; Jana, P.C.; Meikap, A.K.; *Synthetic Metals* **2010**, *160*, 1566.
63. Ghani, S.; Sharif, R.; Bashir, S.; Ashraf, A.; Shahzadi, S.; Zaidi, A.A.; Rafique, S.; Zafar, N.; Kamboh, A.H.; *Mater. Sci. Semicond. Process.* **2015**, *31*, 588.
64. Kesik, M.; Kanik, F.E.; Hızalan, G.; Kozanoglu, D.; Esenturk, E.N.; Timur, S.; Toppare, L.; *Polymer* **2013**, *54*, 4463.
65. Leroux, Y.; Eang, E.; Fave, C.; Trippe, G.; Lacroix, J.C.; *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1258.
66. Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D.A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 251.
67. Liu, F.; Yuan, Y.; Li, L.; Shang, S.; Yu, X.; Zhang, Q.; Jiang, S.; Wu, Y.; *Composites: Part B* **2015**, *69*, 232.
68. Mikoliūnaitė, L.; Kubiliūtė, R.; Popov, A.; Voronovič, J.; Šakirzanovas, S.; Ramanavičienė, A.; Ramanavičius, A.; *Chemija* **2014**, *25*, 63.

-
69. Lemos, H.G.; Santos, S.F.; Venancio, E.C.; *Synth. Met.* **2015**, *203*, 22.
70. Vasilyeva, S.V.; Vorotyntsev, M.A.; Bezverkhy, I.; Lesniewska, E.; Heintz, O.; Chassagnon, R.; *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 19878.
71. Camargo, P.H.C.; Satyanarayana, K.G.; Wypych, F.; *Mater. Res.* **2009**, *12*, 1.
72. Tsakova, V. In *Nanostructured Conductive Polymers*; Eftekhari, A. (Ed.); John Wiley & Sons, Ltd, **2010**, p. 261.
73. An, T.; Choi, W.; Lee, E.; Cho, J.S.; Lim, G.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12*, 4975.
74. Folarin, O.M.; Sadiku, E.R.; Maity, A.; *Int. J. Phys. Sci.* **2011**, *6*, 4869.
75. Upadhyay, L.S.B.; Verma, N.; *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 225.
76. Prieto-Simón, B.; Campàs, M.; Andreescu, S.; Marty, J.-L.; *Sensors* **2006**, *6*, 1161.
77. Kurbanoglu, S.; Ozkan, S.A.; Merkoçi, A.; *Biosens. Bioelectron.*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.102>
78. Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A.; Simonian, A.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8733.
79. Buerk, D. G.; *Biosensors: Theory and Applications*; CRC Press, **1995**.
80. Songa, E.A.; Okonkwo, J.O.; *Talanta* **2016**, *155*, 289.
81. Turner, A.P.F.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3184.
82. Spain, E.; Keyes, T.E.; Forster, R.J.; *Electrochim. Acta* **2013**, *109*, 102.
83. de Oliveira, I. R. W. Z.; *Tese (Doutorado em Química)*; UFSC, Santa Catarina, **2007**.
84. Pohanka, M.; *Int. J. Electrochem. Sci.* **2016**, *11*, 7440.
85. Bartolucci, C.; Perola, E.; Pilger, C.; Fels, G.; Lamba, D.; *Proteins* **2001**, *42*, 182.
86. Pundir, C.S.; Chauhan, N.; *Anal. Biochem.* **2012**, *429*, 19.
87. Dhull, V.; Gahlaut, A.; Dilbaghi, N.; Hooda, V.; *Biochem. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1.
88. Sriram, D.; Yogeewari, P.; *Medicinal Chemistry*; Pearson Education India, **2010**, p. 418.
89. Zuman, P.; *Anal. Lett.* **2000**, *33*, 163.
90. Mendez, J.H.; Matinez, R.C.; Gonzalo, R.E.; *Electroanalysis* **1990**, *2*, 389.
91. Conciliani, V.; Lippolis, M.T.; *Analyst* **1989**, *114*, 1617.
92. Smyth, M.R.; Osteryoung, J.G.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *96*, 335.
93. Waichman, A.V.; Rombke, J.; Ribeiro, M.O.A.; Nina, N.C.S.; *Environ. Sci. Pollut. R.* **2002**, *9*, 423.
94. Dietrich, A.M.; Dacosta, W.F.; *Water Environ. Res.* **1997**, *69*, 391.
95. Vaz, C.M.P.; Crestana, E.S.; Machado, S.A.S.; Mazo, L.H.M.; Massaropi, R.C.; Avaca, L.A.; *Pesticidas, R. Técnico* **1996**, *6*, 55.

-
96. Du, D.; Ye, X.; Cai, J.; Liu, J.; Zhang, A.; *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2503.
97. Kanik, F.E.; Kolb, M.; Timur, S.; Bahadir, M.; Toppare, L.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 111.
98. Dutta, R.R.; Puzari, P.; *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 166.
99. Kaur, N.; Thakur, H.; Prabhaka, N.; *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 775, 121.
100. Cesarino, I.; Moraes, F.C.; Lanza, M.R.V.; Machado, S.A.S.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 873.
101. Guler, M.; Turkoglu, V.; Kivrak, A.; *Environ Sci Pollut Res* **2016**, *12*, 12343-12351.
102. Kesik, M.; Kanik, F.E.; Turan, J.; Kolb, M.; Timur, S.; Bahadir, M.; Toppare, L.; *Sens. Actuators, B* **2014**, *205*, 39.
103. Schulze, H.; Scherbaum, E.; Anastassiades, M.; Vorlová, S.; Schimid, R.D.; Bachmann, T.T.; *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1095.
104. Bucur, B.; Andreescu, S.; Marty, J.; *Anal. Lett.* **2004**, *37*, 1571.
105. Bucur, B.; Fournier, D.; Danet, A.; Marty, J.L.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *562*, 115.
106. Caetano, J.; Machado, S.A.S.; *Sens. Actuators B* **2008**, *129*, 40.
107. Upadhyay, S., Rao, G.R., Sharma, M.K., Bhattacharya, B.K., Rao, V.K., Vijayaraghavan, R., *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 832.
108. Vimala, V.; Clarke, S.K.; Urvinder, K.S.; *Biosens J* **2016**, *5*, 133.
109. Hughes, G.; Westmacott, K.; Honeychurch, K.C.; Crew, A.; Pemberton, R.M.; Hart, P.J.; *Biosensors* **2016**, *6*, 50.
110. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489.
111. Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J.-L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 209.
112. Pierre, A.C.; *Biocatal. Biotransform* **2004**, *22*, 145.
113. Araújo, I.M.M. de; Oliveira, Â.G.R.C.; *Trab. educ. saúde* **2017**, *5*, 117.
114. Raj, J.; Chandra, M.; Dogra, T.D.; Pahuja, M.; Raina, A.; *Toxicol. Int.* **2013**, *20*, 1.
115. Kaur, N.; Prabhakar, N.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *92*, 62.
116. Loguercio, J.; *Dissertação (Mestrado em Química)*; Universidade Federal de Pelotas, Pelotas; **2014**.
117. Osawa, M.; *Topics Appl. Phys.* **2001**, *81*, 163.
118. Abdullah, H.S.; *Int. J. Phys. Sci.* **2012**, *7*, 5468.
119. Bumbrah, G.S.; Sharma, R.M.; *Egyptian Journal of Forensic Sciences* **2016**, *6*, 209.
120. Gutiérrez-Pineda, E.; Alcaide, F.; Rodríguez-Presa, M. J.; Bolzan, A.E.; Gervasi, C.A.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 2677.
121. Santos, M.J.L.; Brolo, A.G.; Girotto, E.M.; *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 6141.
122. Wang J.; Neoh K.; Kang E. *Thin Solid Films* **2004**, *446*, 205.

-
123. Shadi, I.T.; Chowdhry, B.Z.; Snowden, M.J.; Withnall, R.; *Chem. Commun* **2004**, 12, 1436.
124. Giroto, E. M.; Gazotti, W. A.; Tormena, C. F.; De Paoli, M.-A. *Electrochim. Acta*, **2002**, 47, 1351.
125. Chen, W.; Li, C.M.; Chen, P.; Sun, C.Q.; *Electrochim. Acta* **2007**, 52, 2845.
126. Thesing, A.; Loguercio, L. F.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. J. *Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, 16, 10080.
127. Yoon, J. H.; Lim, J.; Yoon, S. *ACS Nano* **2012**, 6, 7199–7208.
128. Jain, P. K.; El-Sayed, M. A.; *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 17451.
129. Liron, Z.; Zifman, A.; Heleg-Shabtai, V.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, 703, 234.
130. Hatzimarinaki, M.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N.; *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 428.
131. Aslanian, D.; Grot. P.; Bon, S.; Masson, P.; Négrerie, M.; Chatel, J. M.; Balkanski, M.; Taylor, P.; Massoulié, J.; *Biochimie* **1991**, 73, 1375.
132. Shinitzky, M.; Dudai, Y.; Silman, I.; *FEBS Letters* **1973**, 30, 125.
133. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussmana, J. L.; *Chem. Biol. Interact.* **2010**, 187, 10.
134. Goeldner, M. P.; Hirth, C. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1980**, 77, 6439.
135. Li, C.M.; Sun, C.Q.; Chen, W.; Pan, L.; *Surf. Coat. Technol.* **2005**, 198, 474.
136. Xie, Y.; Zhao, Y.; *Mater. Sci. Engin. C* **2013**, 33, 5028.
137. Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S.R.; Oliveira-Silva, J.J.; Riehl, C.A.S.; Figueroa-Villar, J.D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 1216.
138. Pohanka, M.; Hrabnova, M.; Kuca, K.; Simonato, J.-P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 2631.
139. Ishida, Y.; Lee, C.; Yonezawa, T.; *Sci. Rep.* **2015**, 5, 1.
140. Loguercio, L.F.; Demingos, P.; Manica, L.M.; Griep, J.B.; Santos, M.J.L.; Ferreira, J.; *Journal of Chemistry* **2016**, 2016, 1.
141. Baio, J. A. F.; Ramos, L. F.; Cavaleiro, E. T. G.; *Quim. Nova* **2014**, 37, 1078.
142. Brownson, D.A.C.; Banks, C.E. In *The Handbook of Graphene Electrochemistry*. Springer, London **2014**, p. 23.
143. Simon, I. A.; Vacaro, B. B.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Arguello, J.; *Electroanalysis* **2013**, 11, 2501.
144. Sanghavi, B.J.; Hirsch, G.; Karna, S.P.; Srivastava, A.K.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, 735, 37.
145. Zeng, Y.; Yu, D.; Yu, Y.; Zhou, T.; Shi, G.; *J. Hazard. Mater.* **2012**, 217, 315.
146. Yang, S.; Luo, S.; Liu, C.; Wei, W.; *Colloids Surf., B* **2012**, 96, 75.

-
147. Okumura, L.L.; Saczk, A.A.; Oliveira, M.F.; Fulgêncio, A.C.C.; Torrezani, L.; Gomes, P.E.N.; Peixoto, R.M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 652.
148. Chandra, R.; Kumar, V.; In Environmental Waste Management; CRC Press **2015**, p.475.
149. Mangas, I.; Vilanova, E.; Estévez, J.; França, T.C.C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 809.
150. Čolović, M.B.; Krstić, D.Z.; Lazarević-Pašti, T.D.; Bondžić, A.M.; Vasić, V.M.; *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11*, 315.
151. Fukuto, T.R.; *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245.