

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

LARA FERNANDES LOGUERCIO

**BIOSENSOR ENZIMÁTICO ELETROQUÍMICO PARA  
DETECÇÃO DO PESTICIDA CARBARIL UTILIZANDO FILME  
FUNCIONAL DE POLIPIRROL**

Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos  
Orientadora

Prof. Dr. Sherdil Khan  
Co-orientador

Porto Alegre, Janeiro/2019

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

LARA FERNANDES LOGUERCIO

**BIOSENSOR ENZIMÁTICO ELETROQUÍMICO PARA  
DETECÇÃO DO PESTICIDA CARBARIL UTILIZANDO FILME  
FUNCIONAL DE POLIPIRROL**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutora em Química

Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos  
Orientadora

Prof. Dr. Sherdil Khan  
Co-orientador

Porto Alegre, Janeiro/2019

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (Novembro/2014) e (Janeiro/2019), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora JACQUELINE FERREIRA LEITE SANTOS e Co-orientação do Professor Doutor SHERDIL KAHN. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. César Avellaneda

---

Profa. Dra. Daiane Dias

---

Prof. Dr. Alexandre Schneider

---

Profa. Dra. Roberta Bussamara

---

Profa. Dra. Jacqueline Leite Santos

---

Prof. Dr. Sherdil Khan

---

Lara Fernandes Loguercio

Dedico este trabalho e obtenção do título de Doutora em Química pela UFRGS, aos meus pais, Maria Carildes Machado Fernandes Loguercio e Raul César Azambuja Loguercio e ao meu irmão Lucas Fernandes Loguercio, por todo amor, apoio, esforço, compreensão e empenho para que eu possa realizar os meus sonhos, e ao meu namorado, companheiro Anderson Thesing, pelo amor, apoio, ajuda e compreensão.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela minha vida, proteção e saúde, que me permite escolher todos os dias ter a atitude de buscar realizar os meus sonhos.

A banca examinadora, pela disponibilidade de aceitar o convite e por contribuir com a minha formação.

A todos os professores que contribuíram para minha formação. Em especial, ao Prof. Dr. Alexandre Brolo, por ter permitido a realização do doutorado sanduíche em seu laboratório, localizado na University of Victoria, e as Profa. Dra. Roberta Bussanara e Profa. Dra. Leliz Ticona, que durante esse período procurei para esclarecer dúvidas e pedir auxílio. Obrigada.

Aos professores do grupo LAMAI (Laboratório de Materiais Aplicados e Interfaces), Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos, Prof. Dr. Marcos Leite Santos e Prof. Dr. Sherdil Khan, pelo prazer de ter convivido com vocês e pela oportunidade de ter feito parte do grupo de pesquisa.

A minha orientadora, Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos, por toda ajuda, orientação, gentileza, confiança, aprendizagem ao longo dos anos, tanto cientificamente como através da convivência, e pela paciência durante todo o processo para que todo o aprendizado fosse possível. Obrigada pela oportunidade de ter sido sua aluna, pelos ensinamentos e pela liberdade de poder escolher desenvolver diferentes trabalhos durante o período de mestrado e doutorado.

Ao meu co-orientador, Prof. Sherdil Khan, por toda ajuda e pela sua contribuição em meus trabalhos durante esse período.

Ao Prof. Marcos Leite Santos, por toda ajuda, pela contribuição em todos os meus trabalhos e pelas oportunidades concedidas a mim durante o período de doutorado para que eu pudesse colaborar em outros trabalhos do grupo LAMAI. Agradeço também, por todos os seus conselhos e pela sua generosidade em ajudar e resolver qualquer problema apresentado ao senhor. Obrigada.

Aos colegas do grupo LAMAI, pela convivência e pelos momentos de descontração em churrascos e saídas em bares da cidade baixa de Porto Alegre. Aos colegas do K123, pelo convívio agradável diariamente, pela parceria, cafés e boas risadas.

Aos colegas, Pedro Demingos, Luiza Manica e Rodrigo Morawski, que trabalharam comigo durante esse período. Foi um prazer conviver, ensinar e aprender

com vocês. Aos colegas, em especial, Anderson Thesing e Pedro Demingos que colaboraram comigo em diferentes trabalhos, incluindo este.

Ao Carlos Albuquerque, pela colaboração no tratamento de dados das análises de Espectroscopia Raman.

A professora Carolina de Matos pelas análises de condutividade dos materiais.

A minha família e amigos por toda a compreensão e carinho.

Ao Anderson Thesing, meu namorado e companheiro, pelo amor, carinho, paciência em vários momentos de estresse, ajuda, compreensão, apoio, e por toda sua colaboração em meus trabalhos. Com certeza, todo esse período vivido do doutorado foi melhor devido a sua presença ao meu lado.

A minha mãe, Maria Carildes Machado Fernandes Loguercio, ao meu pai Raul César Azambuja Loguercio e ao meu irmão Lucas Fernandes Loguercio, por todo afeto, zelo, proteção, paciência, apoio incondicional em tudo que me faz feliz e por todo sacrifício e abdicção de seus próprios sonhos e vontades para que eu pudesse ter um futuro melhor e com mais oportunidades. Vocês são meus maiores exemplos de que ser honesto e bom ao próximo independente da circunstância, sempre dignificará o meu espírito. Sou imensamente grata a Deus por ter nascido neste lar, por ser e ter vocês em minha vida.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	4
<b>2.1. Polímeros condutores</b> .....	4
<b>2.2. Polipirrol</b> .....	9
2.2.1. <i>Dopantes</i> .....	15
<b>2.3. Nanocompósitos de polipirrol e nanopartículas metálicas</b> .....	18
<b>2.4. Biossensor enzimático eletroquímico para detecção de pesticida baseado em filmes funcionais de polipirrol</b> .....	22
<b>3. Parte Experimental</b> .....	29
<b>3.1. Reagentes</b> .....	29
<b>3.2. Materiais</b> .....	30
<b>3.3. Métodos</b> .....	30
3.3.1. <i>Limpeza dos materiais</i> .....	30
3.3.2. <i>Síntese dos filmes</i> .....	30
3.3.3. <i>Caracterização dos filmes (eletrodos)</i> .....	31
3.3.4. <i>Aplicação dos eletrodos como biossensores</i> .....	34
3.3.4.1. <i>Análise da atividade da enzima AChE em solução</i> .....	34
3.3.4.2. <i>Preparação dos biossensores eletroquímicos</i> .....	35
3.3.4.3. <i>Análises dos biossensores eletroquímicos</i> .....	36
3.3.4.3.1. <i>Análises de voltametria cíclica em ATCL</i> .....	36
3.3.4.3.2. <i>Caracterização do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE</i> .....	36
3.3.4.3.3. <i>Análises de reprodutibilidade, interferentes e estabilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL</i> .....	37
3.3.4.3.4. <i>Determinação do tempo de incubação do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE na solução contendo o pesticida carbaril</i> .....	38
3.3.4.3.5. <i>Determinação eletroanalítica do pesticida carbaril (obtenção da curva de calibração) utilizando o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE</i> .....	39
3.3.4.3.6. <i>Análises de reprodutibilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE após a inibição com o pesticida carbaril</i> .....	40
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	41
<b>4.1. Caracterização dos filmes de nanocompósito</b> .....	41
4.1.1. <i>Caracterização morfológica</i> .....	41

4.1.1.1. Microscopias eletrônicas de varredura e de força atômica .....	41
4.1.1.2. Medidas de ângulo de contato .....	44
4.1.2. Caracterização óptica .....	46
4.1.3. Caracterização elétrica .....	49
4.1.4. Voltametria cíclica .....	50
4.1.5. Caracterização Estrutural .....	55
<b>4.2. Aplicação dos filmes (eletrodos) de nanocompósito como biossensores de AChE para detecção do pesticida carbaril.....</b>	<b>61</b>
4.2.1. Análise da atividade da enzima AChE em solução .....	61
4.2.2. Análise eletroquímica para a determinação do biossensor de trabalho.....	62
4.2.3. Análises de caracterização do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.....	65
4.2.4. Análises de reprodutibilidade, interferentes e estabilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL.....	70
4.2.5. Determinação do pesticida carbaril utilizando o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.....	73
4.2.5.1. Tempo de incubação.....	73
4.2.5.2. Curva analítica para determinação do pesticida carbaril.....	75
4.2.5.3. Análises de reprodutibilidade do biossensor após a inibição com o pesticida carbaril.....	79
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>83</b>



## Lista de Figuras

Figura 1. Algumas aplicações tecnológicas de PCIE e suas propriedades. ....	5
Figura 2. Estruturas química da a) polianilina, b) polipirrol, c) poliacetileno e d) politiofeno. ....	5
Figura 3. Diagrama de energia mostrando as propriedades intrínsecas do material como resultado da diferença de $E_{gap}$ . ....	7
Figura 4. Ilustração da evolução da estrutura de bandas para um PICE aromático; (a) neutro, (b) <i>polaron</i> , (c) <i>bipolaron</i> e (d) bandas <i>bipolarônicas</i> (totalmente dopado).....	8
Figura 5. Mecanismo proposto para eletropolimerização de PPI. <sup>38</sup> .....	11
Figura 6. Dois modos de acoplamentos possíveis durante a eletropolimerização do PPI. ....	12
Figura 7. Ilustração dos possíveis defeitos estruturais apresentados pelo PPI. <sup>29</sup> .....	12
Figura 8. Modelos das estruturas <i>polaron</i> e <i>bipolaron</i> no PPI. A espécie $A^-$ representa um íon dopante. ....	13
Figura 9. Ilustração da evolução da estrutura de bandas para o PPI; (a) neutro, (b) <i>polaron</i> , (c) <i>bipolaron</i> e (d) bandas <i>bipolarônicas</i> (totalmente dopado). <sup>38</sup> .....	14
Figura 10. Evolução do espectro de absorção do PPI em função do nível de dopagem. <sup>24</sup> .....	15
Figura 11. Estrutura molecular dos íons dopantes utilizados no trabalho. a) IC e b) SDS. ....	17
Figura 12. Esquema ilustrativo de um surfactante em meio aquoso com concentração a) Abaixo da CMC e b) Acima da CMC. ....	18
Figura 13. Curva clássica da teoria de percolação, relacionando a condutividade de uma mistura polimérica versus a fração volumétrica do aditivo condutor. <sup>72</sup> A) região não percolativa, B) região de percolação e C) não há mais mudança na condutividade da mistura. <sup>74</sup> .....	20
Figura 14. Reação entre a enzima AChE e seu substrato ATCL. Hidrólise do ATCL... 23	
Figura 15. Hidrólise do ATCL através do resíduo de serina presente no sitio ativo da enzima AChE. <sup>82</sup> .....	24
Figura 16. Mecanismo de inibição da enzima AChE pelo pesticida carbaril.....	24
Figura 17. Representação esquemática de um biossensor eletroquímico. ....	25
Figura 18. Reação de oxidação e redução da tiocolina. ....	26

Figura 19. Foto dos filmes de nanocompósito eletropolimerizados. DS0, DS1 e DS2 correspondem aos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente. ....	31
Figura 20. Esquema Reacional do Ensaio Colorimétrico. <sup>108</sup> .....	35
Figura 21. Imagens de MEV (a, b e c) e AFM (a1, b1 e c1) para os filmes de nanocompósito. (a-a1) PPI-IC-NPAu, (b-b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c-c1) PPI-IC-DS2-NPAu.....	42
Figura 22. Espectros EDX dos filmes. (a) PPI-IC-NPAu, (b) PPI-IC-DS1-NPAu e (c) PPI IC-DS2-NPAu. ....	43
Figura 23. Imagens de MEV da seção transversal dos filmes. a) PPI-IC-NPAu, b) PPI IC-DS1-NPAu e c) PPI-IC-DS2-NPAu. ....	44
Figura 24. Ângulo de contato dos filmes de nanocompósito. <i>Inset</i> : Imagens das gotas sobre a superfície dos filmes e do substrato de ITO (n = 3).....	46
Figura 25. Espectros de absorção UV-Vis dos filmes de nanocompósito. ....	47
Figura 26. Gráficos de $(\alpha h\nu)^2$ versus $h\nu$ a partir dos espectros UV-Vis dos filmes; a) PPI-IC-NPAu, b) PPI-IC-DS1-NPAu e c) PPI-IC-DS2-NPAu.....	49
Figura 27. Resistividade dos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu.....	50
Figura 28. Voltamogramas dos filmes em solução de 0,1 mol.L <sup>-1</sup> de KCl. Velocidade de varredura de 50 mV.s <sup>-1</sup> . <i>Inset</i> : aproximação do voltamograma na faixa de potencial entre -1,0 e 0,4 V. ( <i>polaron</i> , n = 1; <i>bipolaron</i> , n = 2).....	51
Figura 29. Voltamogramas correspondentes ao par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> utilizando eletrodos de PPI. Velocidade de varredura de 10 mVs <sup>-1</sup> .....	53
Figura 30. Voltamogramas correspondentes ao par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> em diferentes velocidades de varredura (a, b, c). Gráficos de I <sub>p</sub> vs. v <sup>1/2</sup> (a1, b1, c1). (a - a1) PPI-IC-NPAu, (b - b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c - c1) PPI-IC-DS2-NPAu. ....	55
Figura 31. Espectros Raman dos filmes de PPI. a) PPI-IC, b) PPI-IC-NPAu, c) PPI-IC-DS1-NPAu e d) PPI-IC-DS2-NPAu. ....	56
Figura 32. Espectros Raman obtidos <i>in situ</i> com aplicação de potencial. (a-a1) PPI-IC-NPAu; (b-b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c-c1) PPI-IC-DS2-NPAu.....	59
Figura 33. a) Espectros de absorção UV-Vis correspondente a hidrólise enzimática. <i>Inset</i> : intensidade de absorção em 412 nm em função do tempo. b) Hidrólise enzimática em função da concentração de AChE. ....	62

Figura 34. Voltamogramas dos eletrodos na presença (roxos) e ausência (pretos) de 3 mmol.L <sup>-1</sup> de ATCL. a) Pt-PPI-IC-NPAu-AChE, b) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE e c) Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE. ....	64
Figura 35. Imagens de MEV dos eletrodos, a) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e b) Pt-PPI IC DS1 NPAu-AChE. ....	66
Figura 36. Espectros Raman para os eletrodos de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE. ....	66
Figura 37. Voltamogramas correspondentes ao par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> . Velocidade de varredura de 10 mV.s <sup>-1</sup> . ....	68
Figura 38. Voltamogramas correspondentes ao par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> em diferentes velocidades de varredura (a e b). Gráficos de I <sub>p</sub> vs. v <sup>1/2</sup> (a1 e b1). (a - a1) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e (b - b1) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE. ....	69
Figura 39. Resposta cronoamperométrica de 5 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL. ....	71
Figura 40. Resposta do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL na ausência e presença de interferentes. ....	72
Figura 41. Resposta da corrente de 4 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL, em relação ao tempo de armazenamento em ambiente refrigerado. (G = geladeira, ca. 4 °C) e (F = freezer, ca. -15 °C). ....	73
Figura 42. a) Porcentagem de inibição da enzima AChE em função do tempo de permanência do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em solução contendo 50 ng.mL <sup>-1</sup> de pesticida carbaril. b) Atividade residual da enzima AChE em diferentes tempos de incubação do biossensor em solução contendo pesticida carbaril. ....	74
Figura 43. a) Resposta cronoamperométrica do biossensor em ATCL antes e após a incubação em diferentes concentrações de carbaril. b) Porcentagem de inibição da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril. c) Curva analítica correspondente a corrente do biossensor após a inibição da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril. ....	77
Figura 44. Atividade residual da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril. ....	79
Figura 45. Percentual de inibição da enzima AChE para 3 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em solução de 0,25 ng.mL <sup>-1</sup> de carbaril. ....	80

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação da superfície em função do ângulo de contato. <sup>122,123</sup> .....	45
Tabela 2. Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 28. .....	51
Tabela 3. Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 29. .....	53
Tabela 4. Atribuição dos modos de vibraçõais correspondente aos espectros dos filmes de PPI.....	57
Tabela 5. Variação da razão da área entre as bandas do espectro Raman. <sup>147,149,150</sup> .....	58
Tabela 6. Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 37. .....	68
Tabela 7. Comparação dos parâmetros analíticos com outros biossensores eletroquímicos reportados na literatura para detecção do pesticida carbaril. ....	78

## Símbolos e Abreviaturas

---

AA	ácido ascórbico
AChE	acetilcolinesterase
AFM	microscopia de força atômica
ATCL	cloreto de acetiltiocolina
Au	eletrodo de ouro
BC	banda de condução
BV	banda de valência
$C_{12}H_{11}NO_2$	carbaril
$C_2H_3N$	acetonitrila
CMC	concentração micelar crítica
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EC	Comissão de enzimas
$E^0_{redox}$	potencial redox padrão
EDX	energia dispersiva em raio-X
$E_{gap}$	energia de <i>band gap</i>
$E_{pa}$	potencial de pico anódico
$E_{pc}$	potencial de pico catódico
e-pGON	rede porosa de óxido de grafeno
G	grafeno
GC	eletrodo de carbono vítreo
Gli	glicose
GLUT	glutaraldeído
h	hora
$H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
$H_2Pt_2Cl_6 \cdot 6H_2O$	ácido cloroplatínico hexahidratado
$H_2SO_4$	ácido sulfúrico
$HAuCl_4$	ácido tetracloroáurico
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
IC	indigo carmin
IDIE	microeletrodo de filme de platina
$I_p$	corrente de pico
$I_{pa}$	corrente de pico anódico

---

---

$I_{pc}$	corrente de pico catódico
ITO	vidro recoberto com óxido de índio dopado com estanho
$K_3Fe(CN)_6$	ferrocianeto de potássio
KCl	cloreto de potássio
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MEV	microscopia eletrônica de varredura
M-NPs	nanopartículas metálicas
MPS	3-mercaptopropil-trimetoxisilano
MWCNT	nanotubos de carbono de paredes múltiplas
n	número de elétrons
NA	abertura numérica
$Na_2HPO_4$	fosfato de sódio dibásico
$NaH_2PO_4$	fosfato de sódio monobásico
NF	negro de fumo
NPAg	nanopartícula de prata
NPAu	nanopartículas de ouro
PAMAM-G4	poli(amidoamina) com um núcleo de cistamina
PANI	polianilina
PBS	tampão fosfato de sódio
PDA-Gr	polidopamina-grafeno
Pi	pirrol
PICe	polímero intrinsecamente condutor eletrônico
PPI	polipirrol
PPyNWs	nanofios de polipirrol
PTSA	ácido p-toluenossulfônico
s	segundos
$S.cm^{-1}$	siemens por centímetro
SDS	dodecilsulfato de sódio
TNB	ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
U	unidade de enzima
UV-Vis	ultra violeta-visível

---

---

V	volts
V.s <sup>-1</sup>	volts por segundo
VC	voltametria cíclica
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\Delta E$	diferença de potencial
$\Omega$	ohm

---

## Resumo

**Título: Biossensor enzimático eletroquímico para detecção do pesticida carbaril utilizando filme funcional de polipirrol**

Autora: Lara Fernandes Loguercio

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Sherdil Khan

Palavras Chave: polipirrol, nanocompósito, dodecilsulfato de sódio, biossensor eletroquímico, biossensor enzimático, acetilcolinesterase, carbaril.

Este trabalho teve como objetivo estudar as propriedades ópticas, morfológicas, estruturais e eletroquímicas de filmes de nanocompósitos de polipirrol contendo nanopartículas de ouro e como dopantes simultâneos índigo carmim e dodecilsulfato. Afim de obter uma superfície favorável para a imobilização da enzima acetilcolinesterase para aplicar como biossensor eletroquímico para detecção do pesticida carbaril, diferentes filmes de nanocompósitos foram sintetizados variando a concentração de dodecilsulfato abaixo e acima da sua concentração micelar crítica. Os eletrodos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, ângulo de contato, voltametria cíclica, espectroscopia de ultravioleta visível, espectroscopia Raman e por análises de espectroscopia Raman *in situ*. A presença de dodecilsulfato contribuiu para o aumento da rugosidade, hidrofobicidade, grau de oxidação, condutividade e área superficial eletroativa do polímero, que facilita o transporte e a difusão de carga durante o processo redox. As análises eletroquímicas de voltametria cíclica sugeriram que o filme sintetizado com concentração de dodecilsulfato abaixo da concentração micelar crítica foi o mais adequado para a aplicação como biossensor. Esta técnica eletroquímica também foi utilizada para determinar os parâmetros experimentais para a detecção do pesticida carbaril. O biossensor foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman, demonstrando sucesso na imobilização da enzima acetilcolinesterase. A detecção do pesticida carbaril, baseada na inibição da enzima, foi realizada através de medidas de cronoamperometria. O biossensor apresentou um limite de detecção de 0,06 ng.mL<sup>-1</sup>, estando abaixo da concentração de limite máximo permitido para o uso



desse pesticida em águas salinas. Este limite de detecção apresentou menor valor quando comparado a outros trabalhos reportados na literatura.

## Abstract

**Title: Enzymatic electrochemical biosensor for detection carbaryl pesticide using a functional polypyrrole film**

Author: Lara Fernandes Loguercio

Supervisor: Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Co-supervisor: Prof. Dr. Sherdil Khan

Keywords: polypyrrole, nanocomposite, sodium dodecyl sulfate, electrochemical biosensor, enzymatic biosensor, acetylcholinesterase, carbaryl.

In this work we have investigated the optical, morphological, structural and electrochemical properties of polypyrrole nanocomposite films containing gold nanoparticles and as simultaneous dopants indigo carmine and dodecylsulfate. In order to achieve a suitable surface for immobilization of acetylcholinesterase enzyme to apply as electrochemical biosensor for detecting the pesticide carbaryl, different nanocomposites films were synthesized by changing the concentration of dodecylsulfate below and above its critical micellar concentration. The electrodes were characterized by scanning electron microscopy, atomic force microscopy, contact angle, cyclic voltammetry, ultraviolet visible spectroscopy, Raman spectroscopy and in situ Raman spectroscopy. The presence of dodecyl sulfate contributed to an increase in roughness, hydrophobicity, oxidation degree, conductivity and electroactive surface area of the polymer, which facilitates the transport and diffusion of charge during the redox process. The electrochemical analysis suggested that synthesized film with dodecylsulphate below the critical micellar concentration are more suitable for the application as biosensors. This electrochemical technique was also used to determine the experimental parameters for the detection of the pesticide carbaryl. The biosensor was characterized by scanning electron microscopy and Raman spectroscopy, showing success in the immobilization of the acetylcholinesterase enzyme. Detection of the pesticide carbaryl, based on the inhibition of acetylcholinesterase enzyme, was performed by chronoamperometry measurements. The biosensor presented a detection limit of  $0.06 \text{ ng.mL}^{-1}$ , below the maximum concentration allowed in salt water for this pesticide. This detection limit is lower than that in other works reported in the literature.

## 1. Introdução

O Brasil tem grande parte de sua economia baseada na atividade agrícola, sendo um dos maiores produtores agropecuários do mundo. Para manter a produção, têm sido utilizados sementes transgênicas e insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos (pesticidas) para o controle de pragas e plantas daninhas. No entanto, se a concentração de pesticidas, como organofosforados e carbamatos, ultrapassarem os limites estabelecidos, isso pode prejudicar o meio ambiente e comprometer a segurança alimentar devido as suas elevadas toxicidades.<sup>1</sup> Pesticidas que permanecem em alimentos ou na água podem causar danos à saúde dos seres humanos em longo prazo, ocasionando problemas neurológicos, motores, distúrbios de comportamento, infertilidade, má formação fetal, aborto, doença de Parkinson e diferentes tipos de câncer.<sup>2,3</sup>

Dentre os diferentes pesticidas, o metilcarbamato de naftila (carbaril), pertencente à classe dos carbamatos é um dos pesticidas mais tóxicos atualmente utilizado. O carbaril foi registrado para uso como pesticida desde 1959 e atualmente está presente em mais de 190 produtos registrados, que se apresentam na forma de sprays, pós ou grânulos solúveis em água. O carbaril é comumente usado em culturas agrícolas, hortas, árvores frutíferas e gramados, para controlar pulgões, formigas, carrapatos, aranhas e muitas outras pragas presentes ao ar livre.<sup>4</sup> A exposição de humanos ao pesticida pode ocorrer de duas principais formas: (i) através da respiração, contato com a pele ou com os olhos, que pode ocorrer devido ao manuseio do pesticida na forma de spray ou pó sem proteção adequada e (ii) por via oral aguda ou crônica a partir da dieta, ou seja, devido ao consumo de alimentos e bebidas contaminados.<sup>5,6</sup>

De acordo com Conselho Nacional do Meio Ambiente - Conama, o limite máximo permitido de uso do pesticida carbaril em águas salinas é  $0,32 \text{ ng.mL}^{-1}$ , e em águas doces de classe 1 e 3, é  $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$  e  $70 \text{ ng.mL}^{-1}$ , respectivamente.<sup>7</sup> Em especial, as águas salinas, são destinadas à proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), aquicultura e à atividade de pesca. Além dos efeitos adversos causados pelo contato ou consumo desse pesticida, o uso de compostos como pralidoxima e obidoxima (que são utilizados para o tratamento de pessoas que estiveram em contato direto com pesticidas em geral) mesmo em concentrações terapêuticas, podem também agravar e aumentara intoxicação pelo

carbaril, sendo portanto, não recomendado o uso em seres humanos envenenados por esse pesticida, tornando ainda mais preocupante o contato direto com esse.<sup>8,9</sup>

Sendo assim, há a necessidade de um controle rigoroso da concentração desse pesticida, que pode ser feito através da utilização de biossensores eletroquímicos baseados na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).<sup>10,11</sup> Muitos materiais têm sido utilizados na construção dos biossensores, por exemplo o polipirrol (PPI), que se destaca devido a sua facilidade de síntese, baixo custo, possibilidade de obtenção de materiais flexíveis e excelentes propriedades, tais como: alta condutividade, eletroatividade, biocompatibilidade e boa estabilidade química,<sup>12,13</sup> que são fortemente dependentes das condições experimentais de síntese.<sup>14</sup>

Durante décadas vêm se estudando as propriedades do PPI dopado com ânions anfifílicos, como, por exemplo, o surfactante dodecilsulfato (DS). Através desses estudos, observou-se que a inserção de DS à matriz polimérica torna-se benéfica devido ao fato do surfactante permanecer imobilizado à cadeia do polímero, como consequência de sua alta massa molecular e de seu caráter anfifílico, tornando assim o polímero mais estável, eletroativo e condutor.<sup>15,16</sup> Ao mesmo tempo, a obtenção de PPI utilizando moléculas de corantes como contra-íons durante a síntese indicam que a presença do corante como dopante proporciona um maior ordenamento da cadeia do polímero, fornecendo “nano-canais” que facilitam o transporte de massa e elétrons na interface polímero/eletrólito.<sup>17</sup> Segundo Giroto e cols.,<sup>15,18</sup> a inserção da molécula de corante índigo carmim (IC) à matriz de PPI dopado com DS aumenta a condutividade e melhora as propriedades eletroquímicas do polímero. Adicionalmente, PPI dopado apenas com IC<sup>19</sup> ou DS<sup>20</sup> apresentaram boa seletividade e sensibilidade a neurotransmissores, demonstrando que PPI dopado com esses contra-íons podem ser aplicados como materiais para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. Recentemente foram sintetizados eletroquimicamente *in-situ* filmes de nanocompósito de PPI dopado com IC e nanopartículas metálicas,<sup>21,22</sup> e foi observado que a presença de nanopartículas metálicas à matriz do polímero aumenta sua condutividade, eletroatividade e o comprimento de conjugação da cadeia polimérica. Além disso, essa combinação provoca há diminuição na energia de *gap*, melhorando as propriedades ópticas e eletroquímicas do material. Dessa forma, de acordo com esses trabalhos, essas matrizes de PPI são consideradas funcionais, pois podem ser aplicadas para diferentes finalidades a partir de suas propriedades.

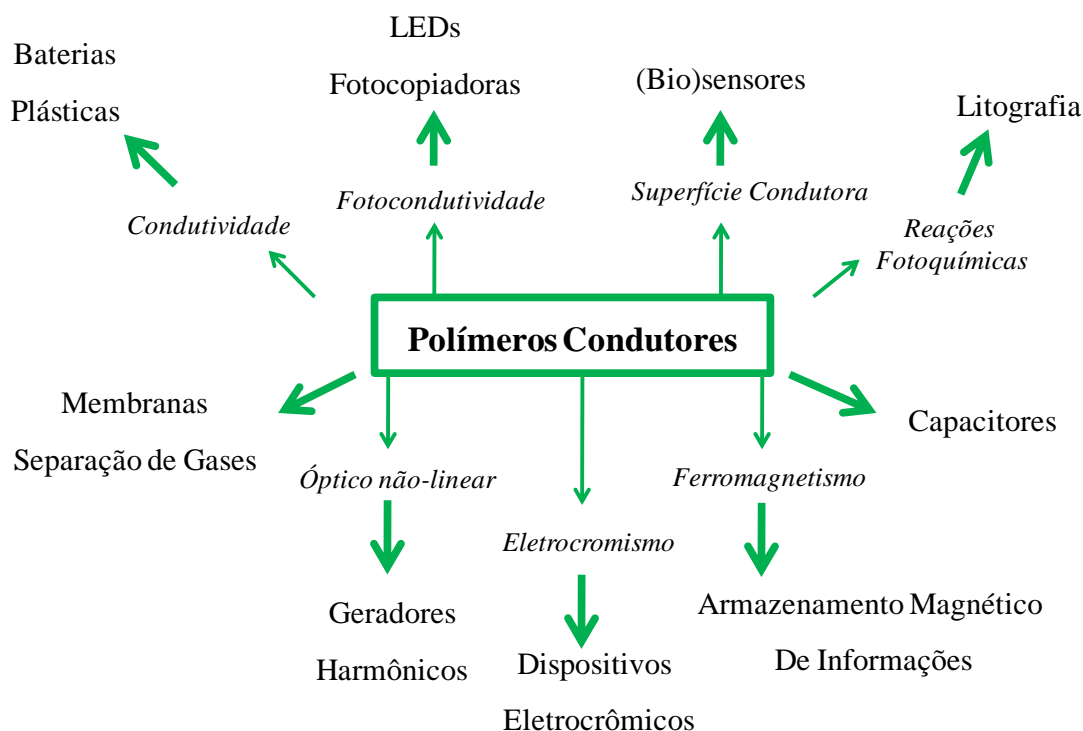
Em virtude disso, com o intuito de obter eletrodos de PPI com propriedades físico-químicas melhoradas para serem utilizados na fabricação de biossensores enzimáticos eletroquímicos, estudou-se neste trabalho as propriedades de filmes de PPI contendo três componentes (IC, DS e nanopartículas de ouro (NPAu)) em um único material, variando-se a concentração de DS acima e abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC),<sup>16</sup> objetivando obter uma superfície eletroativa favorável para a imobilização da enzima AChE. Foram avaliadas as propriedades morfológicas, topográficas, ópticas, elétricas, estruturais e eletroquímicas dos materiais obtidos, e posteriormente, sua aplicação como biossensor enzimático eletroquímico para detecção do pesticida carbaril. Este trabalho vem de encontro com a busca em se desenvolver novos materiais através de métodos simples de obtenção, com baixo custo, elevada sensibilidade, rápida resposta e confiáveis para serem aplicados em dispositivos portáteis para detecção de pesticida.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Polímeros condutores

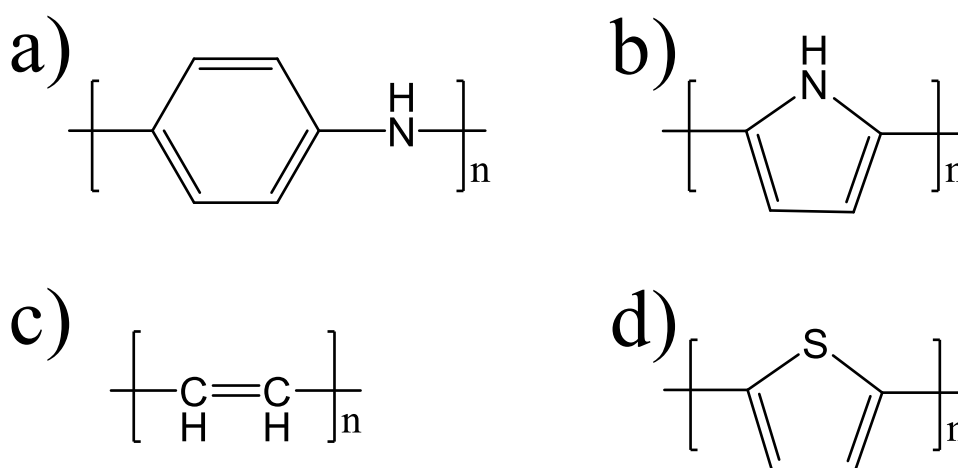
Foi na década de 70 que Shirakawa e cols.,<sup>23</sup> observaram que o poliacetileno ao ser tratado com ácido ou base de Lewis tinha sua condutividade aumentada em até dez ordens de grandeza, mostrando a possibilidade de preparar filmes auto-suportados de poliacetileno através da polimerização direta do acetileno. Esse trabalho resultou em um artigo publicado em 1977, despertando o interesse de diversos pesquisadores em estudara síntese de novos polímeros conjugados, surgindo assim, uma nova área conhecida como “PCIe”, também chamados de “polímeros conjugados”, “polímeros condutores”, ou ainda, de “metais sintéticos”. Como consequência desse trabalho, o prêmio Nobel de Química em 2000 foi concedido aos Drs. H. Shirakawa (Universidade de Tsukuba, Japão), A. G. MacDiarmid (Universidade da Pensilvânia, EUA) e A. J. Heeger (Universidade da Califórnia, EUA).

Os polímeros condutores representam uma importante classe de materiais orgânicos funcionais para a próxima geração de dispositivos ópticos eletrônicos, pois os elétrons deslocalizados em sistemas  $\pi$  ao longo da cadeia dos PICe permitem que esta classe de polímeros tenha propriedades condutoras e habilidade para suportar portadores de carga positivos e/ou negativos com alta mobilidade ao longo da sua cadeia, possibilitando a obtenção de uma variedade de novos materiais com propriedades melhoradas.<sup>24,25</sup> Dessa forma, é possível obter materiais com propriedades eletrônicas (condutoras, magnéticas e ópticas) semelhantes a dos metais e, ao mesmo tempo, manter as propriedades mecânicas e de processabilidade de polímeros convencionais. Isso permite o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados, portáteis, de baixo custo e fácil manuseio, e até mesmo flexíveis.<sup>26-28</sup> A Figura 1 mostra algumas propriedades dos PCIe e suas aplicações.



**Figura 1.** Algumas aplicações tecnológicas de PCe e suas propriedades.<sup>29</sup>

Apesar do poliacetileno ainda ser estudado, este polímero apresenta algumas limitações, como dificuldade de processamento e elevada instabilidade ao ar, diferentemente dos polímeros condutores aromáticos, como o polipirrol, polianilina, politiofeno e seus derivados (Figura 2), que são os popularmente mais estudados por possuírem boa estabilidade, alta condutividade e serem de fácil de obtenção.<sup>26</sup>

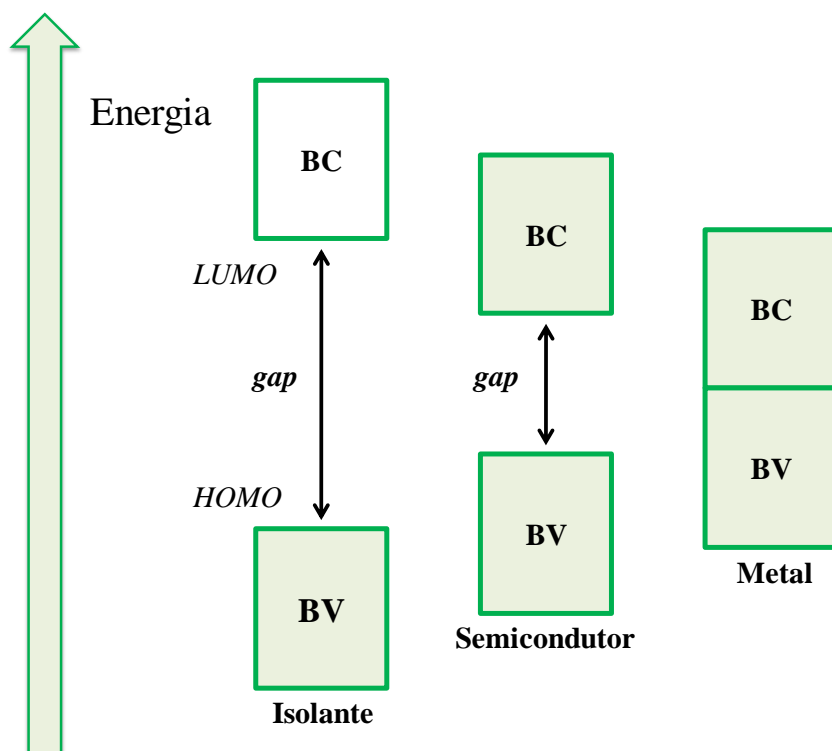


**Figura 2.** Estruturas química da a) polianilina, b) polipirrol, c) poliacetileno e d) politiofeno.<sup>30</sup>

Os PICE possuem longos sistemas  $\pi$  conjugados, com ligações duplas e simples alternadamente ao longo da cadeia polimérica, e a sua condutividade advém da mobilidade dos portadores de carga introduzidos no sistema  $\pi$  (orbitais  $p_z$ ) através da dopagem.<sup>24,31</sup> Durante a dopagem, esses polímeros passam de isolantes a condutores após processos reversíveis de oxidação e/ou redução do sistema  $\pi$  conjugado. A dopagem mais comumente utilizada é a “dopagem redox” que é realizada por meio de métodos químicos ou eletroquímicos de oxidação (dopagem tipo- $p$ ) ou redução (dopagem tipo- $n$ ), adquirindo cargas positivas ou negativas, respectivamente. A eletroneutralidade do material como um todo é preservada pela incorporação de dopantes na matriz polimérica que estão presentes em solução durante a síntese.<sup>32,33</sup> Durante a dopagem, os dopantes (contra-íons) são dispersos aleatoriamente ou agregados em toda a cadeia do polímero, causando deformações e/ou defeitos na cadeia polimérica. Essas deformações e defeitos causados pela inserção de dopantes estão diretamente relacionados com as propriedades físico-químicas do polímero.<sup>34</sup>

As propriedades intrínsecas dos polímeros condutores surgem da sobreposição dos orbitais  $p_z$  provenientes das ligações insaturadas e são explicadas em termos de alguns conceitos físicos, como *polarons* e *bipolarons*, sendo esses utilizados desde o início dos anos 80.<sup>24,34</sup> O modelo *polaron/bipolaron* consiste em uma extensão do *Modelo de Bandas*, sendo o modelo teórico mais empregado para explicar a condução elétrica nos PICE aromáticos. A sobreposição de orbitais  $p_z$  proveniente das ligações insaturadas sobre vários sítios resulta na formação de bandas de valência (BV)  $\pi$  e bandas de condução (BC)  $\pi^*$ , com um pequeno *gap* de energia entre elas (condição necessária para o comportamento semicondutor, Figura 3). A BV abrange os níveis eletrônicos ocupados, sendo designado como HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) o estado eletrônico no topo da BV, ou seja, o de maior energia. A BC é constituída pelos níveis não ocupados, sendo designado LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) o estado eletrônico no fundo da BC, ou seja, o de menor energia. A diferença de energia entre a BV e a BC é conhecida como energia de *band gap* ( $E_{\text{gap}}$ ), e determina as propriedades ópticas e elétricas intrínsecas do material.<sup>33,35</sup>



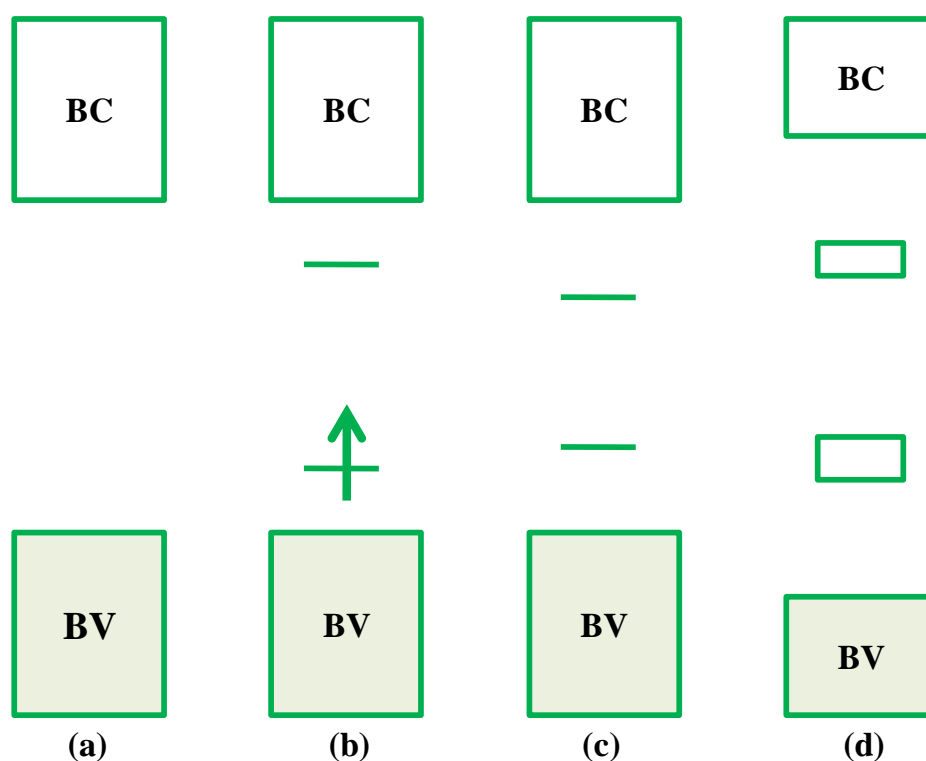


**Figura 3.** Diagrama de energia mostrando as propriedades intrínsecas do material como resultado da diferença de  $E_{\text{gap}}$ .

Tomando a dopagem tipo-*p* como exemplo, quando a cadeia polimérica com ligações duplas sofre um processo de oxidação, induzindo a formação de cargas positivas localizadas por um processo energeticamente favorecido, ocorre à formação de estados eletrônicos intermediários (*polarons* e *bipolarons*) localizados na região da  $E_{\text{gap}}$  (Figura 4), causando um deslocamento energético acima da BV e abaixo da BC. Estes estados ionizados podem ser parcialmente estabilizados por uma distorção geométrica local e/ou pela inserção de contra-íons dopantes que possuem a função de neutralizar essas cargas positivas geradas em cadeias poliméricas oxidadas durante a síntese.<sup>36</sup> A formação desses estados eletrônicos intermediários promovem diferentes transições eletrônicas e conseqüentemente, induzem a notáveis mudanças ópticas e elétricas no polímero.

Quando o polímero é oxidado, ocorrendo a remoção de um elétron, a cadeia sofre uma relaxação em torno da carga gerada e os anéis aromáticos se convertem a forma quinóide. Essa remoção inicial de um elétron leva a formação de um cátion radical (buraco) com spin  $\frac{1}{2}$  chamado de *polaron* (Figura 4b), que está associado à presença de um estado eletrônico localizado na região de  $E_{\text{gap}}$ . A formação de *polaron* produz uma perda da conjugação (as ligações C=C tornam-se menos deslocalizadas). Quando um

segundo elétron é retirado da cadeia polimérica, podem ocorrer duas situações: (i) em níveis baixos de oxidação o elétron pode ser retirado de outro segmento da cadeia polimérica, levando a formação de outro *polaron*, ou (ii) o elétron é retirado de um nível polarônico já existente (remoção do elétron desemparelhado), levando à formação de um dicátion radical com spin igual a zero, chamado de *bipolaron* (Figura 4c). A formação de *bipolarons* está associada a uma forte distorção do retículo e é termodinamicamente mais estável e favorável do que à formação de dois *polarons* porque compreende somente quatro ou cinco unidades monoméricas de um segmento polimérico, resultando em um ganho de energia (0,45 eV) em comparação a dois estados *polarons*. A formação de *bipolarons* produz portanto um grande decréscimo da energia de ionização comparada com a formação de dois *polarons*. Em termos de energias redox, isso significa que o potencial redox ( $E_{\text{redox}}^0$ ) para a formação do *bipolaron* poderia ser menor que o  $E_{\text{redox}}^0$  para a formação do *polaron*.<sup>31,35</sup> Sendo assim, a oxidação adicional é acompanhada pela eliminação dos *polarons* e pela formação de novos estados *bipolarônicos*. Continuando o processo de dopagem, têm-se a formação de mais estados *bipolarônicos*, criando-se bandas *bipolarônicas* na região de  $E_{\text{gap}}$ , que são responsáveis pelo aumento da condutividade do polímero.<sup>24,37</sup>



**Figura 4.** Ilustração da evolução da estrutura de bandas para um PICe aromático; (a) neutro, (b) *polaron*, (c) *bipolaron* e (d) bandas *bipolarônicas* (totalmente dopado).<sup>38</sup>

A condutividade em um sólido é causada pelo número de portadores de carga (elétrons/buracos) e pela mobilidade destes portadores. Para os PICe, o transporte pode ocorrer via mobilidade ao longo dos segmentos da cadeia polimérica conjugada e por saltos intercadeias (*hopping*), sendo o fator limitante da condutividade a mobilidade do portador de carga e não a concentração. Apesar dos portadores de carga poderem se mover através do polímero, estes portadores distorcem a cadeia em certa magnitude causando um grande número de defeitos estruturais, como reticulação e desordenamento das cadeias, e por isso a mobilidade do íon dopante dentro da matriz polimérica é baixíssima. Os três principais elementos que contribuem para a mobilidade dos portadores são: o transporte intracadeia, transporte intercadeia e contato interpartícula.<sup>39</sup> Estes elementos compreendem uma complicada e resistiva rede, a qual determina a mobilidade efetiva dos portadores. Por meio do ajuste controlado do nível de dopagem, que é dado a partir da escolha de dopantes e parâmetros experimentais, as propriedades de um PICe, como por exemplo a condutividade eletrônica, pode atingir diferentes valores devido as mudanças morfológicas atribuídas as interações interpartículas, e conseqüentemente, conformacionais das cadeias poliméricas, afetando as interações intercadeia.<sup>40,41</sup>

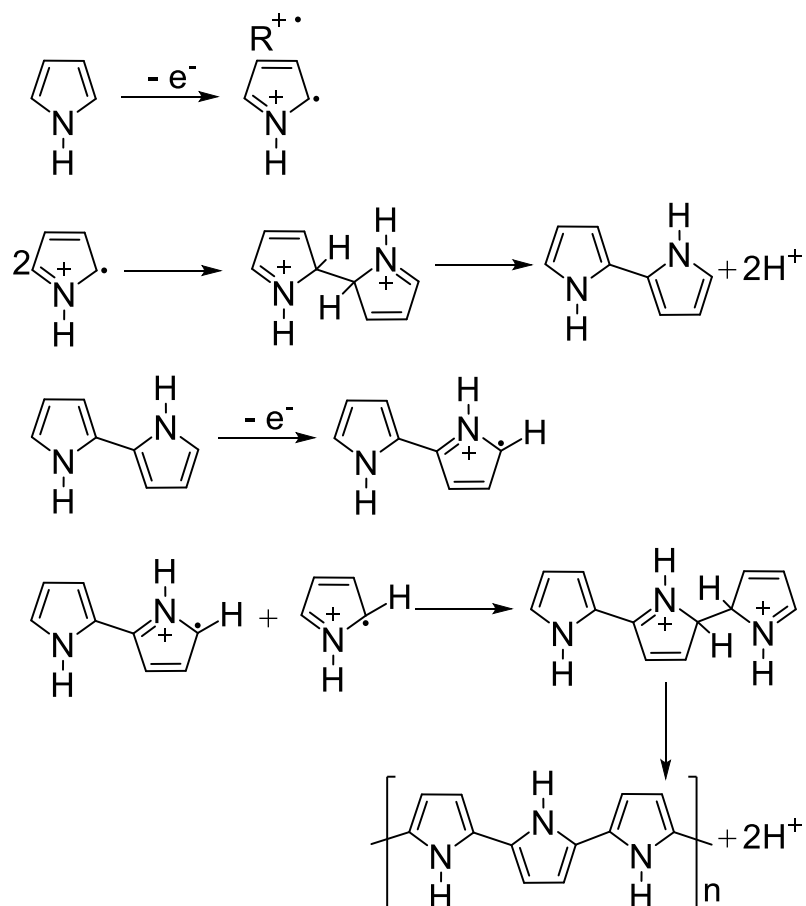
## 2.2. Polipirrol

Dentre os diferentes PICe, o PPI é o mais extensivamente estudado, devido a sua facilidade de síntese, uma vez que o monômero de pirrol (Pi) é facilmente oxidado, comercialmente disponível com baixo custo, apresenta estabilidade ambiental moderada, capacidade de fornecer altas condutividades elétricas e maior compatibilidade em sistemas aquosos. Essas propriedades e características do PPI é o que o torna desejável para inúmeras aplicações, como por exemplo, em supercapacitores, baterias, (bio)sensores eletroquímicos, atuadores mecânicos, células solares, blindagem contra interferência eletromagnética, sistemas de distribuição de drogas e dispositivos ópticos eletrônicos.<sup>14,15,29,33,38</sup>

PPI é comumente obtido a partir do processo de oxidação (dopagem tipo-*p*) utilizando métodos de polimerização química ou eletroquímica. Entretanto, os métodos eletroquímicos de síntese apresentam vantagens como: obtenção de filmes eletroativos sobre a superfície de eletrodos com alta condutividade e o rendimento em termos de carga é de quase 100%, o que possibilita controlar a massa e a espessura do filme.<sup>33</sup> O uso extensivo de métodos eletroquímicos para obtenção de PPI e de outros polímeros

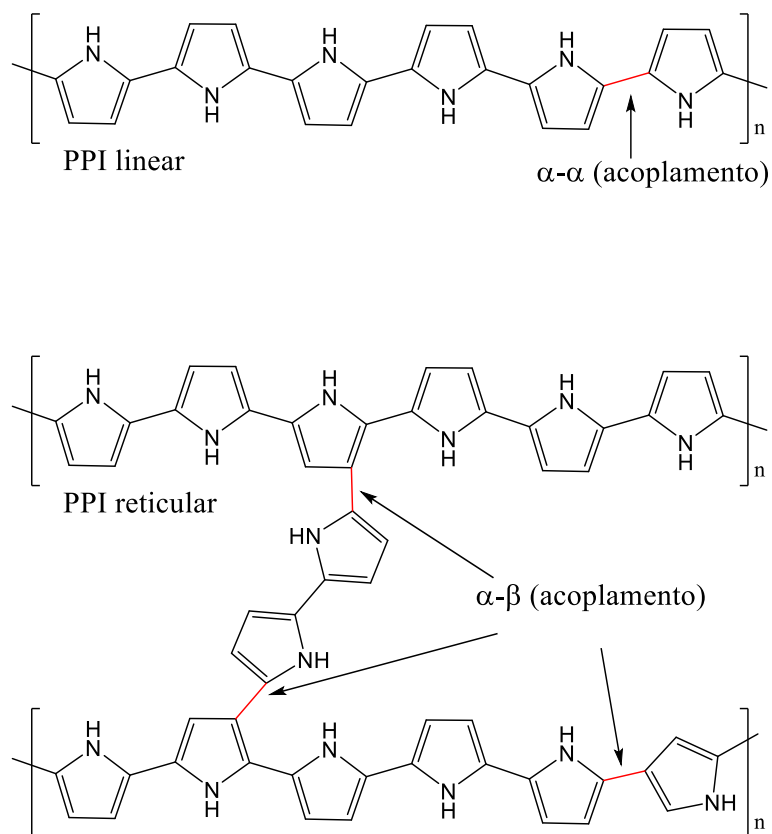
condutores advêm de um estudo realizado em 1979 por Diaz e cols.,<sup>42</sup> que relata a síntese de filmes flexíveis de PPI com condutividade de  $100\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , obtidos através da eletropolimerização em solução aquosa contendo o monômero de Pi.<sup>42-44</sup> Diferentes métodos eletroquímicos podem ser usados para obtenção do material, como o potenciostático (potencial constante), galvanostático (corrente constante) e potenciodinâmico (varredura de potencial, ou seja, VC).

O mecanismo de eletropolimerização do PPI encontrado com maior frequência na literatura é o descrito por Diaz e cols. (Figura 5).<sup>38,45,46</sup> O mecanismo é dado através de uma sucessão de reações químicas e por reações de transferência de elétrons. Inicialmente, com aplicação de potencial, as moléculas monoméricas próximas ao eletrodo encontram-se no seu estado oxidado, formando um cátion-radical ( $R + \bullet$ ), resultando em uma alta concentração de monômeros oxidados mantidos pela difusão contínua dos monômeros em direção ao eletrodo. Como a reação de transferência de elétrons é mais rápida do que a difusão do monômero da solução para a superfície do eletrodo, este  $R + \bullet$ , que possui uma densidade eletrônica maior não pareada na posição  $\alpha$ , se liga a outro cátion radical na posição  $\alpha$  formando um dímero dihidro dicátion. Consecutivamente, ocorre a etapa química, que leva à formação de um dímero seguido pela perda de dois prótons e rearomatização. Devido à conjugação estendida ao longo de dois anéis, o potencial de oxidação é menor comparado ao do monômero, e com isso o dímero é oxidado mais facilmente para formar o cátion radical, que se liga a outro radical monomérico. O mecanismo da síntese eletroquímica propõe que essas etapas eletroquímicas e químicas ocorrem de forma consecutiva até que os oligômeros se tornem insolúveis e precipitem na superfície do eletrodo, formando assim o filme de PPI.<sup>38,46</sup> Ao longo das cadeias existem ligações covalentes fortes que possuem alguns elétron-volts em termos de força de ligação. Entretanto, as interações entre as cadeias são interações de baixa energia, como as forças de Van der Waals, e, portanto, moléculas podem difundir facilmente entre elas, facilitando o processo de dopagem do polímero.<sup>41</sup>

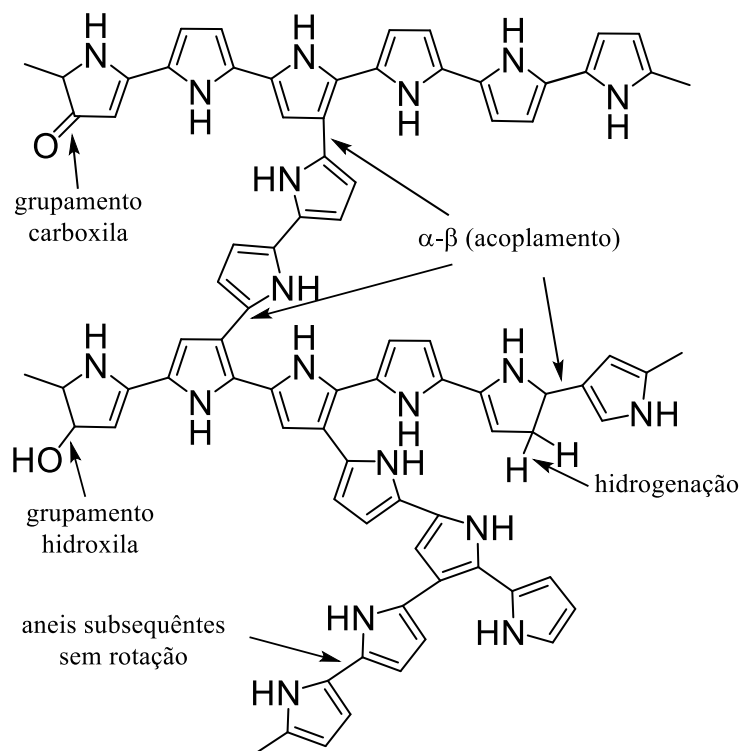


**Figura 5.** Mecanismo proposto para eletropolimerização de PPI.<sup>38</sup>

A configuração química exata das cadeias de PPI é desconhecida, devido principalmente à complexidade do processo de formação do filme, uma vez que a organização molecular é altamente desordenada. Apesar de estudos espectroscópicos indicarem que a proporção substancial de polimerização ocorre através dos acoplamentos  $\alpha - \alpha$ ,<sup>47</sup> também sugere-se a presença de cadeias altamente defeituosas com reticulação e polimerização a partir das posições  $\beta$  (Figura 6). Além disso, durante a síntese podem ocorrer outras reações competitivas que estão relacionadas com a natureza suscetível dos cátions radicais intermediários em relação à nucleofilicidade do meio da polimerização. Isso pode resultar em acoplamentos aleatórios, defeitos estruturais e falta de orientação entre as cadeias,<sup>29,40,46,48</sup> conforme ilustrado na Figura 7.

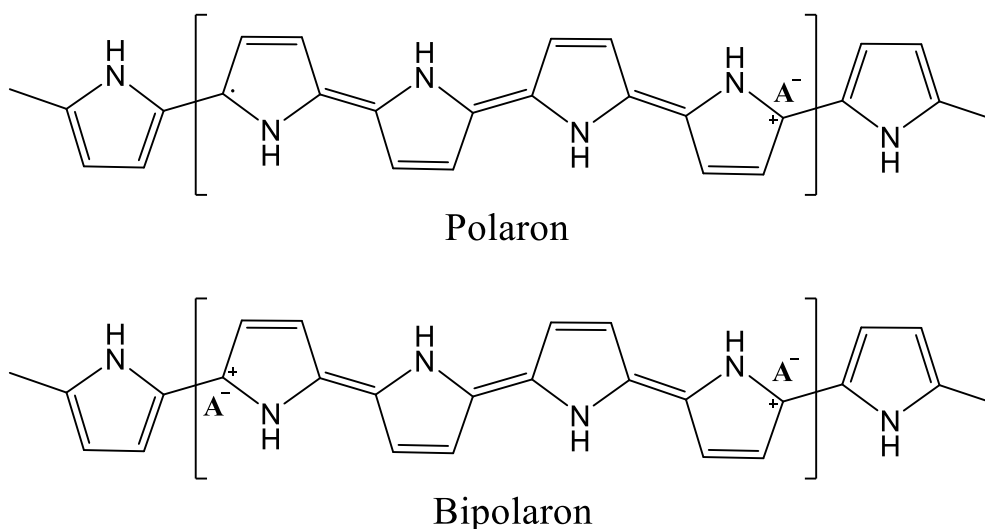


**Figura 6.** Dois modos de acoplamentos possíveis durante a eletropolimerização do PPI.<sup>49</sup>



**Figura 7.** Ilustração dos possíveis defeitos estruturais apresentados pelo PPI.<sup>29</sup>

As propriedades intrínsecas do PPI são fortemente dependentes das condições de eletropolimerização, que estão relacionadas com a escolha do meio eletrolítico (solvente e pH), concentração do monômero, método e temperatura de síntese, além da natureza e concentração do dopante.<sup>17,18,50</sup> Durante a síntese, com oxidação do PPI ocorre à formação de espécies *polarônicas* paramagnéticas. Aumentando-se o grau de dopagem, estes *polarons* são convertidos a *bipolarons*, os quais se estendem cada um sobre quatro anéis pirrólicos.<sup>26,40</sup> As estruturas esquematizadas do *polaron* e *bipolaron* no polipirrol estão representadas na Figura 8.



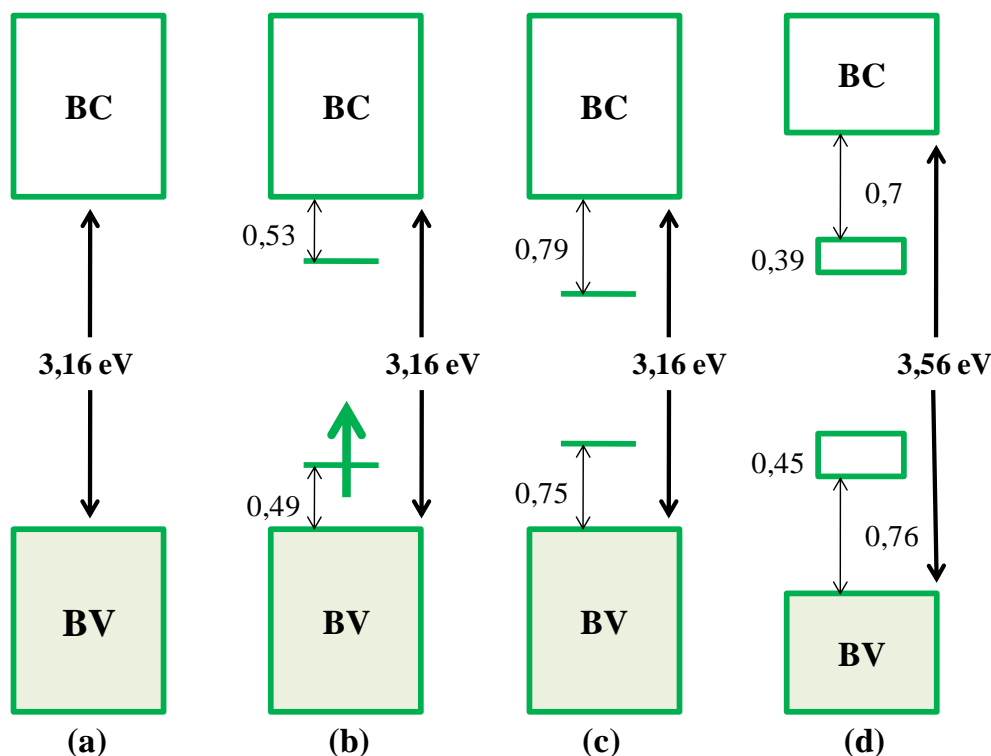
**Figura 8.** Modelos das estruturas *polaron* e *bipolaron* no PPI. A espécie  $A^-$  representa um íon dopante.

Devido às duplas ligações alternadas no esqueleto do polímero conjugado, as espécies carregadas formadas após a dopagem são capazes de se mover ao longo da cadeia (deslocalização), permitindo o transporte de elétrons, obtendo-se assim um material eletronicamente condutor.<sup>46</sup> A Figura 9 mostra a evolução da estrutura das bandas para o PPI em diferentes níveis de dopagem, proposta por Bredas e cols.<sup>35</sup> A formação de *polarons* e *bipolarons* na cadeia do polímero leva à introdução de estados eletrônicos intermediários localizados na região de  $E_{\text{gap}}$ , que permitem que as transições eletrônicas ocorram entre a BV e a BC. Quando ocorre a formação do *polaron*, que possui energia de ligação de 0,12 eV, dois estados eletrônicos são introduzidos na região do *gap*: um estado *polaron* ligante ocupado com um elétron e localizado em 0,49 eV acima da BV; e um estado *polaron* antiligante vazio localizado em 0,53 eV abaixo da BC.

Com o aumento do nível de oxidação ocorre a formação do *bipolaron*, causando uma menor deformação da cadeia quando comparado a formação de *polarons*.<sup>33</sup> A

formação de *bipolaron* introduz dois estados de transição na região de  $E_{\text{gap}}$ , um em 0,75 eV acima da BV e um em 0,79 eV abaixo da BC. O estado *bipolaron* ligante, ao contrário do *polaron* ligante, encontra-se vazio.

Em altos níveis de dopagem, a  $E_{\text{gap}}$  é ca. 3,6 eV, ou seja, ca. 0,4 eV maior quando comparado ao polímero não dopado ou em menores níveis de oxidação, devido a formação de bandas *bipolarônicas* na região de  $E_{\text{gap}}$ .

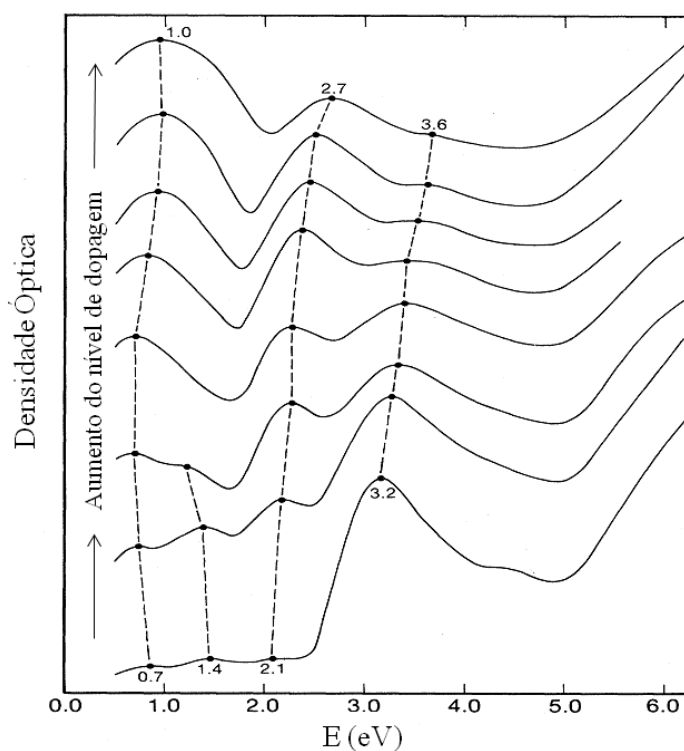


**Figura 9.** Ilustração da evolução da estrutura de bandas para o PPI; (a) neutro, (b) *polaron*, (c) *bipolaron* e (d) bandas *bipolarônicas* (totalmente dopado).<sup>38</sup>

A partir da formação dos estados eletrônicos *polaron* e *bipolaron* que ocorre durante o processo de dopagem, é possível observar através de análises de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) quais transições eletrônicas ocorrem na região de  $E_{\text{gap}}$ , e conseqüentemente, avaliar o nível de dopagem dos filmes de PPI. A Figura 10 mostra a evolução do espectro de absorção do PPI em função do nível de dopagem, proposta por Bredas e cols.<sup>24</sup> Em baixos níveis de dopagem (estado parcialmente neutro, reduzido), o PPI apresenta um máximo de absorção intenso em ca. 3,16 eV (400nm), que corresponde a  $E_{\text{gap}}$  associada com a transição  $\pi-\pi^*$ . Dentro desta região de  $E_{\text{gap}}$  é possível observar três bandas de absorção, que estão relacionadas a diferentes transições eletrônicas. Abanda em 0,7 eV (1771 nm) é atribuída à transição da BV para o estado *polaron* ligante. A banda em 1,4 eV (886 nm) está associada com a



transição do estado *polaron* ligante para o *polaron* antiligante e a banda em 2,1 eV (590 nm) corresponde à transição da BV para o estado *polaron* antiligante. Com o aumento do nível de oxidação e formação dos estados *bipolarons*, ocorre o desaparecimento da banda em 1,4 eV e as demais transições se deslocam para maiores valores de energia. Em altos níveis de dopagem é possível observar uma banda de absorção com baixa intensidade em ca.3,6 eV (344 nm), devido a formação das bandas *bipolarônicas* a cada 6 anéis de Pi. A existência de duas bandas *bipolarônicas* formadas na  $E_{gap}$  pode ser evidenciada pela presença de duas bandas de absorção intensas, em 1,0 eV (1240 nm) e em 2,7 eV (459 nm). Sendo assim, a partir da escolha dos parâmetros de síntese, como por exemplo, a natureza do dopante, é possível modular as propriedades do PPI para obtenção de materiais com propriedades físico-químicas desejáveis e melhoradas para as diferentes aplicações.



**Figura 10.** Evolução do espectro de absorção do PPI em função do nível de dopagem.<sup>24</sup>

### 2.2.1. Dopantes

A natureza do contra-íon aniônico utilizado como dopante desempenha um papel importante na estabilidade, morfologia, porosidade, rugosidade, espessura, hidrofobicidade e no nível de dopagem, além de alterar o potencial de comutação eletroquímico e o grau de ordenamento da cadeia polimérica.<sup>18,26,34,38</sup> Diferentes

contra-íons podem ser utilizados como dopantes durante a eletropolimerização do Pi, uma vez que se pode utilizar meios aquosos, incluindo por exemplo tanto ânions pequenos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) quanto grandes (corantes e surfactantes).

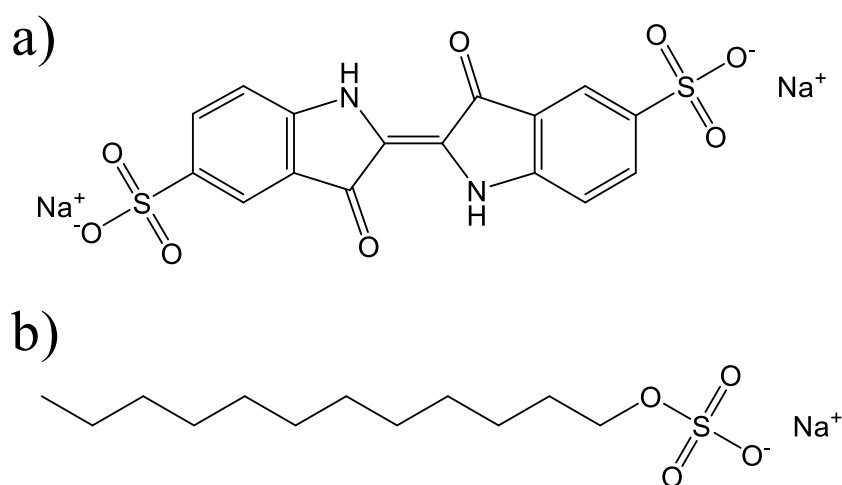
Os íons pequenos têm a desvantagem de poderem ser transportados para fora da matriz do polímero e/ou permitirem troca destes com os íons presentes no eletrólito durante sucessivas análises eletroquímicas de redução e oxidação. Isso faz com que durante o processo de redução, os contra-íons aniônicos presente na matriz do polímero difundam para fora (causando um encolhimento inicial do material) antes que os cátions presentes no eletrólito migrem para contrabalancear as cargas, evitando o encolhimento inicial e causando o inchaço no material. Esse fenômeno causa um aumento da tensão e do estresse na cadeia do polímero, que conseqüentemente prejudica a integridade química e a estabilidade eletroquímica do PPI.<sup>36</sup> Em contrapartida, contra-íons grandes tendem a ficar imobilizados na cadeia do polímero, podendo os cátions presentes no eletrólito migrarem mais facilmente para a matriz durante o processo de redução. Como resultado, há um inchaço inicial consistente e significativo, que no processo subsequente de oxidação, é mecanicamente e eletroquimicamente restaurado.<sup>36</sup> Em virtude disso, muitos pesquisadores têm utilizado ânions orgânicos anfifílicos e/ou corantes orgânicos como dopantes.<sup>51</sup>

A utilização da mistura de dopantes também tem sido investigada por permitirem efeitos sinérgicos. Por exemplo, moléculas de corantes de IC e moléculas de surfactante como o DS, podem facilitar o transporte de massa e elétrons devido a um aumento do grau de ordenamento da cadeia polimérica. Adicionalmente, podem proporcionar um aumento da densidade de fotocorrente sob iluminação policromática e um menor tempo de resposta óptica e eletroquímica comparado a outros sistemas.<sup>15,18</sup>

O IC é um corante indigóide, que apresenta cor azul e é conhecido formalmente como sal dissódico do ácido 5,5 índigo dissulfônico.<sup>52</sup> O IC possui estrutura molecular plana de cadeia curta e grupos lipofílicos e hidrofílicos, conforme apresentado na Figura 11a. A escolha do corante IC em diferentes trabalhos se deve ao fato desse corante apresentar eletrocromismo inerente, mecanismo redox bem conhecido, alto coeficiente de extinção e caráter dianiônico.<sup>53,54</sup> Gao e cols.,<sup>19</sup> verificaram que filmes de PPI dopado com IC melhoram a seletividade e sensibilidade a neurotransmissores, como a dopamina. O grande sistema conjugado desse corante pode promover interações eletrônicas com o sistema  $\pi$  do PPI, resultando em uma série de mudanças nas propriedades eletrônicas.<sup>22,53,55</sup> Acredita-se, também, que o IC pode atuar como uma

espécie de ponte entre cadeias paralelas do polímero, permitindo uma maior mobilidade de elétrons inter-cadeia.<sup>15</sup>

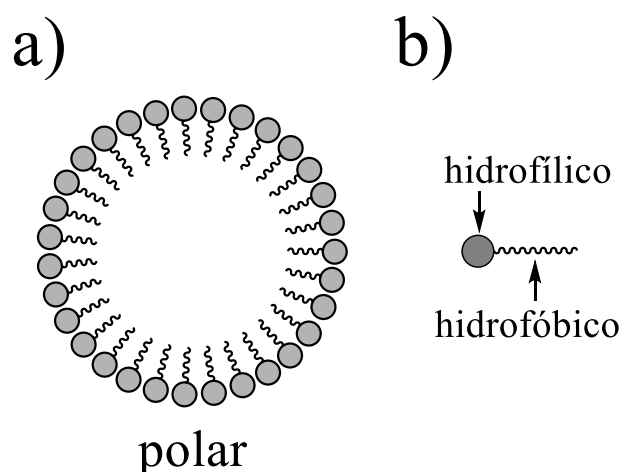
Por outro lado, o surfactante DS é uma molécula aniônica anfifílica, ou seja, apresenta uma extremidade polar e outra extremidade apolar em sua estrutura, conforme apresentado na Figura 11b. Devido ao seu caráter anfifílico e elevada massa molecular, o DS tende a ficar aprisionado na matriz do PPI durante sucessivas aplicações eletroquímicas de redução e oxidação,<sup>53,56</sup> resultando em uma melhoria nas propriedades mecânicas e eletroquímicas, que estão associadas à condutividade elétrica e eletroatividade do material.<sup>16</sup> O DS, por se tratar de uma molécula aniônica anfifílica, também pode desempenhar o importante papel de carregar moléculas funcionais catiônicas para a cadeia do PPI, podendo essas interagirem com o PPI via ligação com o DS.<sup>57</sup> Além disso, comparando filmes de PPI dopados com diferentes surfactantes, Amparat e cols.,<sup>58</sup> relataram que filmes de PPI dopados com DS exibiram maior condutividade, por exemplo, dos que dopados com ácido sulfônico dodecilbenzeno, e dessa forma proporciona a obtenção de materiais de PPI com propriedades condutoras melhoradas.



**Figura 11.** Estrutura molecular dos íons dopantes utilizados no trabalho. a) IC e b) SDS.

Um parâmetro importante a ser investigado na síntese de filmes de PPI dopado com DS, é a sua concentração, pois pode causar mudanças significativas nas propriedades do polímero.<sup>59</sup> O DS em solução aquosa, dada a suas propriedades anfifílicas, tende a formar micelas a partir de uma determinada concentração (Figura 12), conhecida como CMC. A CMC do DS à 25°C em solução aquosa é 8,1 mmolL<sup>-1</sup>,

mantendo-se constante até a temperatura de 10°C.<sup>60</sup> Quando a concentração de DS está acima da CMC em solução, ocorre agregação espontânea de moléculas de surfactante formando micelas esféricas, cilíndricas e hexagonais estáveis, dependendo da concentração de surfactante em solução. Alguns trabalhos reportam a síntese de PPI usando DS como um “molde”, mostrando que a concentração de DS afeta a morfologia do polímero. Ao variar a concentração de DS entre 5 e 30 mmol.L<sup>-1</sup>, Ralwal e cols.,<sup>61</sup> obtiveram PPI com morfologia elíptica e esférica, respectivamente. Hazarika e cols.,<sup>62</sup> obtiveram nanopartículas de PPI sólidas esféricas com concentrações de DS entre 0,01e 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e nanopartículas de PPI cilíndricas com concentração de DS de 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. Sendo assim, é evidente que o tamanho e a forma das estruturas de DS em solução são fatores críticos que podem afetar a morfologia do polímero, uma vez que podem atuar como “nanoreatores”.<sup>50,59,62</sup>



**Figura 12.** Esquema ilustrativo de um surfactante em meio aquoso com concentração a) Abaixo da CMC e b) Acima da CMC.<sup>63</sup>

### 2.3. Nanocompósitos de polipirrol e nanopartículas metálicas

Cada vez mais se busca desenvolver materiais com baixo custo e que possuam uma combinação de propriedades, sejam elas elétricas, ópticas, biológicas ou magnéticas.<sup>64</sup> Neste contexto, os nanocompósitos emergem uma área de intenso interesse devido ao seu potencial de combinar propriedades desejáveis de dois ou mais materiais diferentes, sendo pelo menos um desses componentes obtido em escala nanométrica.<sup>65</sup>

Nanocompósitos de polímeros condutores, como os de PPI, têm recebido atenção considerável por apresentarem grande aplicabilidade em diversas áreas de interesse

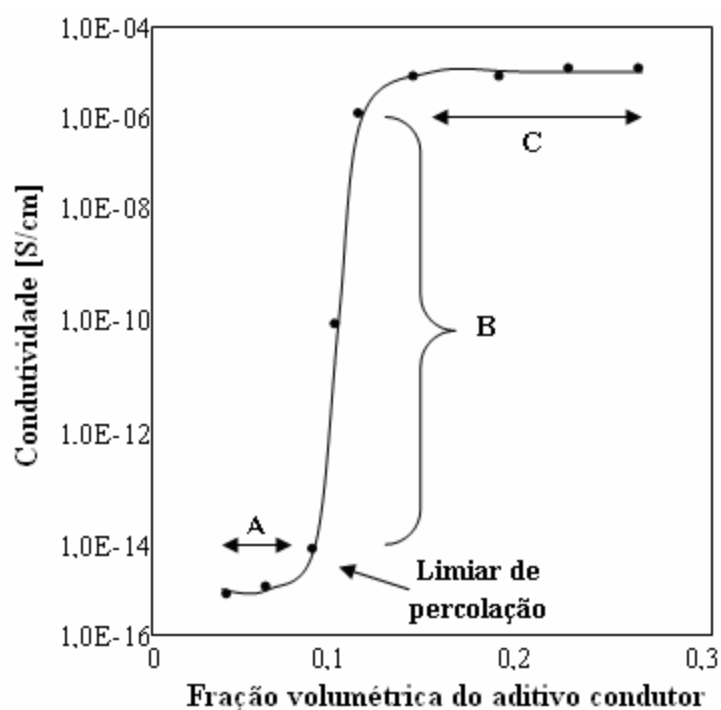
tecnológico e científico, como em (bio)sensores eletroquímicos, diodos de emissores de luz orgânicos, eletro-catalisadores, dispositivos eletrocromicos, células solares, supercapacitores, entre outras.<sup>64-67</sup> Em geral, são materiais em que partículas inorgânicas, possuindo entre 10 e 100 nm em pelo menos uma dimensão, são dispersas na matriz polimérica orgânica para melhorar drasticamente as propriedades de desempenho do polímero, dado a partir do efeito sinérgico entre os materiais.<sup>68</sup> Dentre os diferentes materiais, as nanopartículas metálicas (M-NPs) são os candidatos mais promissores para essa tarefa, pois possuem a função de facilitar a transferência de elétrons em reações eletroquímicas, aumentar a condutividade, área superficial e a imobilização de biomoléculas em matrizes poliméricas, podendo atuar também na marcação de biomoléculas.<sup>69</sup> Acredita-se que a atividade catalítica das M-NPs se origine do efeito do tamanho em nanoescala, e seja atribuída à grande razão superfície-volume, onde um grande número de átomos está em contato direto com o ambiente e prontamente disponível para que as reações ocorram.<sup>67</sup>

É importante destacar que existe ainda uma dificuldade em se obter informações detalhadas sobre a concentração, agregação e dispersão das M-NPs nos filmes poliméricos, uma vez a formação pode ocorrer aleatoriamente na matriz do polímero.<sup>65,67,70</sup> De acordo com Biswas e cols.,<sup>71</sup> as propriedades elétricas dos nanocompósitos de polímeros condutores contendo M-NPs dependem significativamente da sua morfologia e das proporções entre as M-NPs e as contrapartes orgânicas.

Para explicar a dependência da natureza do mecanismo de condução desses nanocompósitos sobre a concentração das nanopartículas, é essencial introduzir os conceitos básicos sobre a teoria da percolação.<sup>72,73</sup> A teoria da percolação foi proposta em 1957 para descrever a passagem de um fluido em um meio desordenado, com caminhos aleatoriamente bloqueados. Esta teoria é utilizada na compreensão de um grande número de fenômenos de transição, principalmente das propriedades físicas e químicas de sistemas. A teoria da percolação descreve fenômenos pertencentes aos chamados “fenômenos críticos”, caracterizados por um “ponto crítico”, nos quais algumas propriedades de um determinado sistema mudam de maneira drástica neste ponto. O “ponto crítico”, também chamado de limiar de percolação, é o limiar entre dois comportamentos distintos do sistema.

A teoria da percolação pode ser usada somente para descrever sistemas heterogêneos.<sup>74</sup> A Figura 13 mostra um fenômeno de percolação para um sistema onde

partículas condutoras são adicionadas a uma matriz polimérica. De acordo com a Figura 13, podemos observar que na presença de baixas concentrações do aditivo condutor a condutividade do material é essencialmente aquela da matriz polimérica. Ao aumentar a concentração do aditivo condutor, é possível observar uma variação brusca na condutividade do material, atingindo, dessa forma, o limiar de percolação. A partir deste ponto, com o aumento da concentração do aditivo condutor, ocorre uma mudança significativa na condutividade do material, devido ao aumento da fase condutora (aditivo condutor) na matriz polimérica. Esta região em que ocorre o aumento de condutividade é conhecida como região de percolação. Com o aumento contínuo da fase condutora na matriz polimérica, atinge-se um valor máximo de condutividade, sendo este um valor próximo ao da condutividade do aditivo condutor. Qualquer aumento de concentração do aditivo condutor além deste limite não ocasionará aumentos na condutividade do material.



**Figura 13.** Curva clássica da teoria de percolação, relacionando a condutividade de uma mistura polimérica versus a fração volumétrica do aditivo condutor.<sup>72</sup> A) região não percolativa, B) região de percolação e C) não há mais mudança na condutividade da mistura.<sup>74</sup>

No conceito clássico de percolação, é necessário aproximadamente entre 50 a 60% em peso de M-NPs na matriz polimérica para que ocorra a formação de vias

condutoras metálicas tridimensionais, isto é, para que ocorra o limiar de percolação, onde a condutividade torna-se muito alta. Abaixo do limiar de percolação, as nanopartículas dispersas dentro da matriz polimérica condutora desempenham o papel de conduzir através de *hopping* ou tunelamento de *polaron* e/ou *bipolarons* entre sítios localizados no polímero condutor.<sup>71</sup> Neste caso, o efeito interfacial, devido à presença de barreiras isolantes (defeitos na cadeia) entre ambas as fases condutoras, desempenha um papel muito importante nas propriedades elétricas globais dos nanocompósitos. Nesses sistemas poliméricos conjugados, tanto o distúrbio energético quanto o espacial podem atuar como centros de aprisionamento de carga, o que essencialmente leva à diminuição da mobilidade de portadores. Com isso, um dos parâmetros importantes que determina o desempenho de dispositivos baseados em nanocompósitos de polímeros condutores é a mobilidade dos portadores de carga.<sup>75</sup>

Entre as M-NPs, as nanopartículas de prata (NPAg) e NPAu são as que despertam maior interesse para obtenção desses materiais nanocompósitos, devido as suas propriedades ópticas, elétricas e biológicas.<sup>22,64,76</sup> Porém, as NPAu apresentam maior inércia química e portanto maior estabilidade ao longo do tempo em condições ambientes e alta condutividade.<sup>21</sup>

Os nanocompósitos têm sido obtidos em forma de colóides, filmes e em *bulk*, através de métodos de síntese de polimerização química e/ou eletroquímica, sol-gel e por fotopolimerização.<sup>71</sup> Como várias aplicações requerem materiais sobre eletrodos, métodos eletroquímicos de síntese tem sido amplamente utilizados para obter *in situ* filmes de PPI contendo M-NPs em sua matriz, pois permitem obter esses materiais de forma mais rápida, simples e com baixo custo, aumentando a possibilidade de aplicações.<sup>21,76,77</sup>

Segundo De Oliveira,<sup>78</sup> a escolha de dopantes, como por exemplo o DS, pode minimizar os processos de agregação das NPAu durante a síntese química promovendo uma maior homogeneidade de partículas distribuídas na matriz polimérica. Através da síntese de oxidação química, Huang e cols.,<sup>79</sup> obtiveram um nanocompósito de PPI dopado com o surfactante ácido p-toluenossulfônico (PTSA) e NPAu. Segundo os autores, os monômeros de Pi em solução aquosa contendo PTSA formam micelas supramoleculares por interação hidrofóbica, com a adição de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>), a polimerização do PPI e a nucleação e crescimento das NPAu ocorre simultaneamente na interface água/micela devido à hidroflicidade dotetracloroáurico (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>). Sugerem, também, que as micelas supramoleculares de

PPI-PTSA podem atuar como “molde” e controlar cineticamente as taxas de crescimento de várias fases das NPAu. Entretanto, tais micelas supramoleculares de PPI-PTSA podem ser destruídas quando a concentração de PTSA aumenta ou diminui, e assim, modificar a morfologia dos nanocompósitos. Além disso, Shi e cols.,<sup>65</sup> a partir de análises de condutividade utilizando o quatro pontas, observaram que a presença de NPAu a matriz de polipirrol, polianilina e politiofeno proporcionou um aumento na condutividade de aproximadamente duas ordens de magnitude comparado aos polímeros individualmente. Goswami e cols.,<sup>68</sup> relataram que o aumento da condutividade iônica de nanocompósitos de PPI e NPAu é atribuído ao aumento da concentração de NPAu, observando um aumento na condutividade iônica de até 40% em relação ao PPI puro.

Dessa forma, é irrefutável que a presença de NPAu à matriz do PPI pode aumentar a eficiência eletrocatalítica, facilitando a transferência de elétrons. Isso está atribuído a difusão de espécies eletroativas através de poros ou por trocas de elétrons entre os pares vizinhos de locais redox, aumentando o “tempo de vida” do polímero quando submetido a sucessivas análises eletroquímicas. Outra vantagem na incorporação de NPAu é o aumento de locais para a imobilização de anticorpos e/ou enzimas sobre a superfície dos nanocompósitos.<sup>21,77,80</sup> Portanto, fica evidente a versatilidade e o potencial que os filmes de nanocompósitos de PPI contendo NPAu possuem para serem aplicados em diversas áreas.

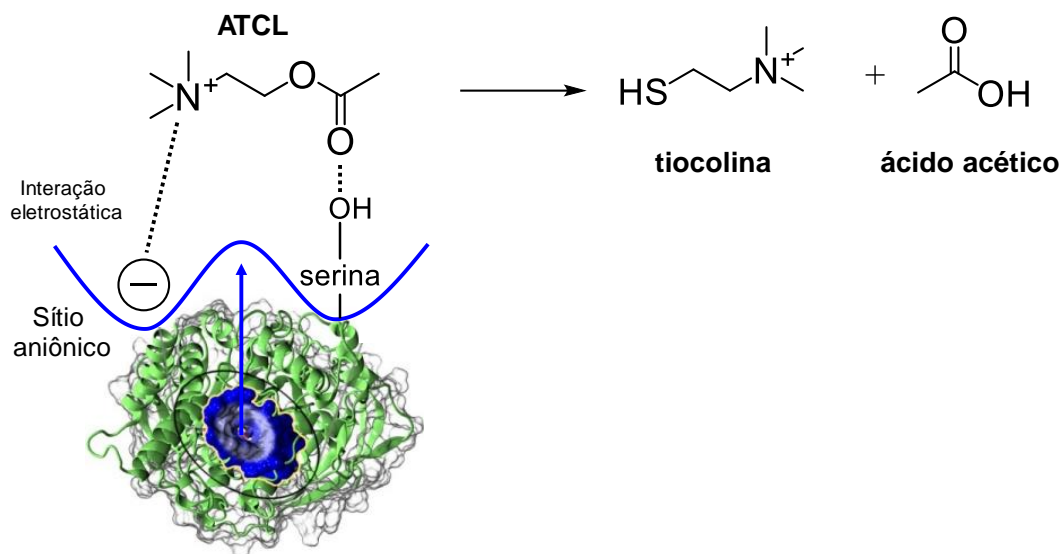
#### **2.4. Biossensor enzimático eletroquímico para detecção de pesticida baseado em filmes funcionais de polipirrol**

A toxicidade de pesticidas carbamatos e organofosforados baseia-se na inibição da enzima AChE (EC 3.1.1.7), que é uma enzima essencial para o funcionamento do sistema nervoso central de humanos e insetos. A enzima AChE apresenta alta atividade catalítica em meio aquoso na presença de ATCL. Estima-se que cada molécula de AChE degrada ca. 25.000 moléculas de cloreto de acetilcolina (ATCL) por segundo, em tiocolina e ácido acético.<sup>5</sup> A tiocolina produzida é transportada de volta para os terminais nervosos para ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ATCL.

A enzima AChE pertence à família das hidrolases, cujo sítio ativo é caracterizado por uma tríade catalítica coordenada de três aminoácidos: histidina, serina e ácido aspártico.<sup>81</sup> A catálise enzimática ocorre quando o sítio da ligação aniônica da tríade atrai o grupo amônio quaternária do ATCL que está carregado positivamente, e o

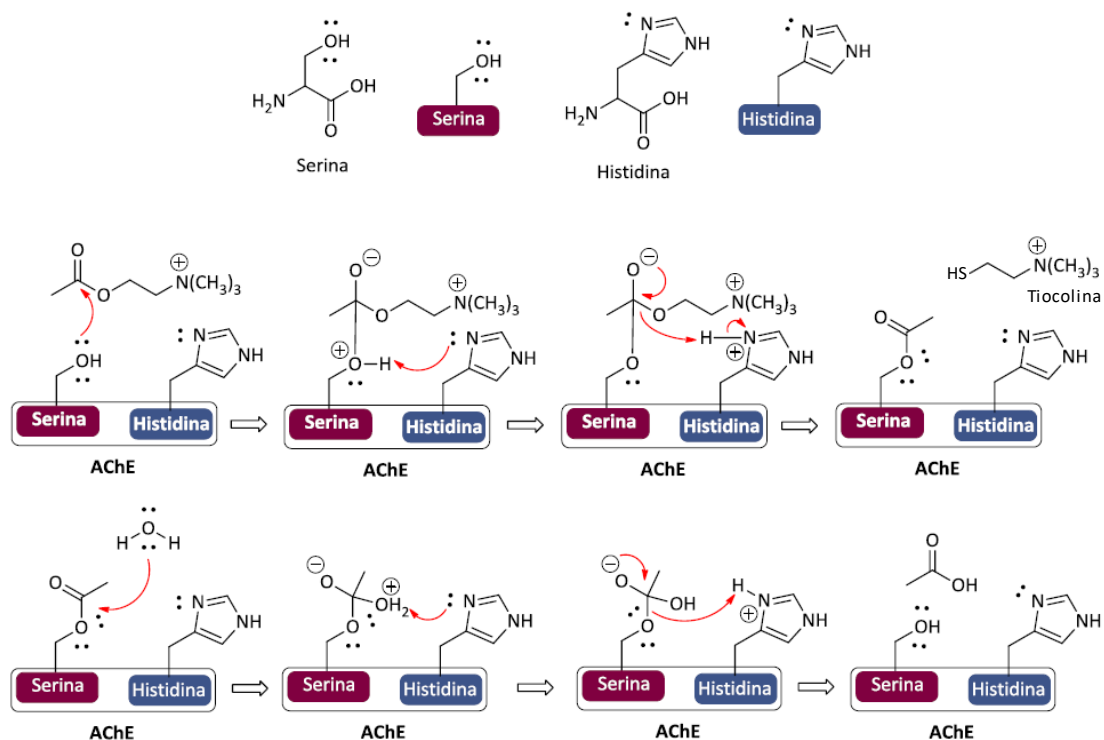


grupo hidroxila pertencente ao resíduo de serina localizado no sítio ativo da enzima, ataca e cliva o éster após sua desprotonação, formando os produtos tiocolina e ácido acético,<sup>3</sup> conforme ilustrado na Figura 14.



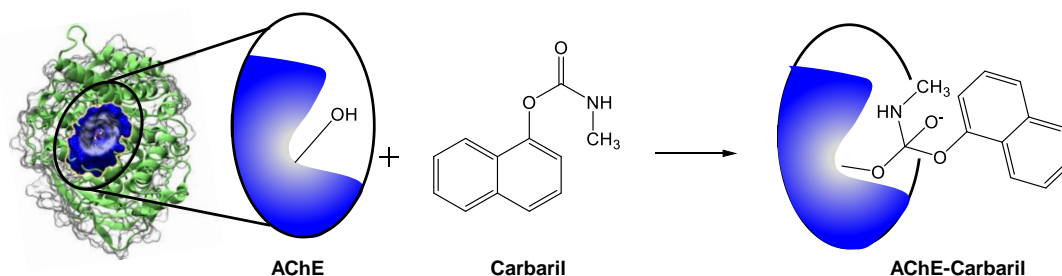
**Figura 14.** Reação entre a enzima AChE e seu substrato ATCL. Hidrólise do ATCL.

Entretanto, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster e com isso a histidina exerce um papel importante na catálise. A histidina age como um catalisador ácido-base e serina como um nucleófilo (Figura 15). Após a chegada do ATCL ao sítio ativo da enzima, a carbonila do neurotransmissor é atacada pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina e a histidina atua como uma base retirando um próton do íon hidroxônio formado. Posteriormente, a histidina protonada atua como um ácido, doando um próton para a porção tiocolina do ATCL, que é então liberada. Neste momento, a enzima AChE encontra-se acetilada, e para que a enzima retorne a ter atividade, essa sofrerá hidrólise com a água atuando como um nucleófilo. Nesse processo o ácido acético é formado e o resíduo de serina liberado, fazendo com que a enzima esteja pronta para atuar novamente.<sup>82</sup>



**Figura 15.** Hidrólise do ATCL através do resíduo de serina presente no sítio ativo da enzima AChE.<sup>82</sup>

Contudo, na presença de um inibidor, como o pesticida carbaril, o grupo nucleofílico da enzima, que é o grupo hidroxila presente no resíduo de serina localizado no sítio ativo, se liga covalentemente ao oxigênio do pesticida. Como consequência, a atividade biocatalítica da enzima AChE é inibida, deixando-a inativa (Figura 16). Portanto, o efeito tóxico do pesticida advém de sua capacidade de se ligar ao sítio ativo da enzima AChE, impedindo a hidrólise do seu substrato ATCL. Essa inibição progressiva resulta em um acúmulo de ATCL que leva a um grave comprometimento da transmissão de impulsos nervosos, podendo levar à morte.

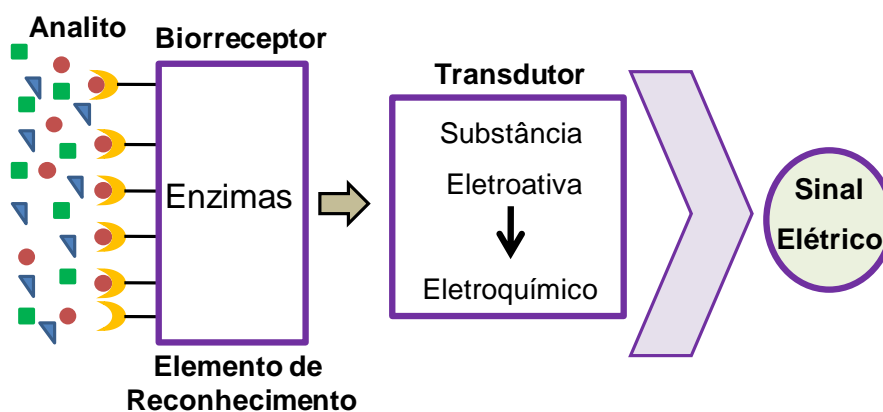


**Figura 16.** Mecanismo de inibição da enzima AChE pelo pesticida carbaril.

O pesticida carbaril é um pesticida de uso geral e de amplo espectro, controlando mais de 100 espécies de insetos. Sua coloração varia de incolor a cinza dependendo da pureza do composto e sua ação ocorre através da ingestão ou contato direto. Os sintomas de toxicidade dado pelo contato direto da pele ou olhos pode se manifestar na forma de queimaduras, sudorese, embaçamento da visão e incoordenação. Já a inalação e ingestão resultam em náuseas, cólicas estomacais, diarreia, salivação excessiva e convulsão, podendo levar a morte. Trabalhadores que manuseiam este pesticida têm o maior potencial de exposição por inalação ou pelo contato com a pele. Entretanto, o maior risco de exposição da população em geral é através da ingestão de alimentos contaminados, ou seja, que contenham carbaril além do limite de uso permitido.<sup>5,83</sup>

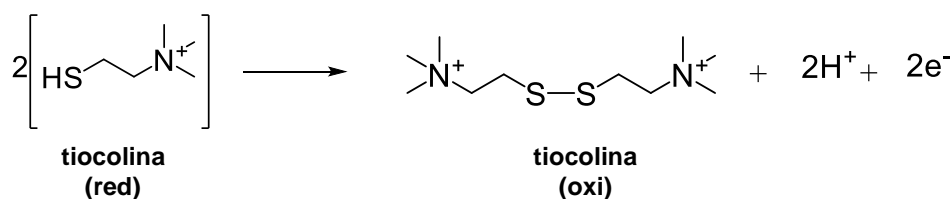
Em função disso, biossensores enzimáticos eletroquímicos têm sido desenvolvidos nos últimos anos como uma alternativa promissora para detecção desse pesticida. Enzimas imobilizadas sobre materiais suporte, como eletrodos, apresentam uma série de vantagens quando comparada as enzimas na forma livre, como elevada sensibilidade e possibilidade de desenvolvimento de dispositivos móveis para detectar no campo essas substâncias em níveis de traço, de forma rápida, simples, confiável e com baixo custo.<sup>59,84</sup>

Um biossensor enzimático é um dispositivo analítico utilizado para detecção de um analito, que combina um componente biológico com um detector físico-químico (um transdutor). O biossensor enzimático eletroquímico baseado na inibição da AChE é basicamente constituído de dois componentes: (i) o elemento de reconhecimento biológico (que no caso é a enzima AChE) e (ii) o transdutor, que converte o sinal resultante da interação entre o analito ATCL e o elemento biológico em um outro tipo de sinal (como o elétrico), que pode ser medido e quantificado,<sup>59</sup> conforme ilustrado na Figura 17.



**Figura 17.** Representação esquemática de um biossensor eletroquímico.

O método de cronoamperometria é um dos métodos mais utilizados para detecção de pesticidas. Quando o biossensor de AChE está imerso em uma solução contendo o substrato ATCL, o substrato é hidrolisado, formando os produtos tiocolina e ácido acético, conforme apresentado na Figura 14. Por sua vez, tiocolina é um produto eletroativo, ou seja, pode ser oxidado ou reduzido (Figura 18) por um determinado potencial aplicado, gerando uma corrente elétrica.



**Figura 18.** Reação de oxidação e redução da tiocolina.

Porém, quando o biossensor de AChE é imerso em solução contendo o inibidor, como por exemplo o pesticida carbaril (Figura 16), a conversão de ATCL em tiocolina é diminuída ou é até mesmo nula e dessa forma, a corrente anódica ou catódica diminui. Sendo assim, a corrente registrada é inversamente proporcional à concentração de pesticidas na amostra.

É importante mencionar contudo que quando a inibição da enzima AChE é dada pelo pesticida carbaril, pode ocorrer a formação do intermediário acil-enzima, que é lentamente hidrolisado para reativar a enzima, geralmente após algumas horas. Como análises em campo utilizando biossensores requerem curtos tempos de análise (menos de 1 hora), o pesticida carbaril pode ser considerado um inibidor pseudo-reversível competitivo.<sup>85</sup> Sendo assim, é importante medir a atividade da enzima AChE imediatamente após a inibição quando se utiliza esse pesticida, assegurando uma resposta do biossensor reprodutível baseada na cinética de reação, que pode ser verificada previamente através de análises de tempo de incubação do biossensor. Se a recuperação da atividade da enzima for muito rápida, duas abordagens podem ser aplicadas: tomar apenas o primeiro sinal no cálculo da porcentagem de inibição ou considerar que o sistema é inútil para a análise desse inseticida em particular.<sup>86</sup>

Dentre os diferentes materiais, o PPI apresenta uma série de vantagens para aplicação como biossensor: pode ser facilmente obtido na forma de filmes, com baixos custos e por diferentes métodos, apresenta boa estabilidade, pode ser modificado através da inserção de M-NPs ou por grupos funcionais (como amino, carboxila e mercapto,

que são utilizados como ligantes para biomoléculas),<sup>87</sup> e por sua rede polimérica ser ramificada, o que aumenta a área superficial do eletrodo, resultando em mais locais para a imobilização de biomoléculas. Adicionalmente, o PPI é estável em meio neutro ou alcalino e isso o torna ainda mais promissor para aplicação como biossensor.<sup>10,80</sup>

A etapa de imobilização da enzima AChE é crucial para o funcionamento do biossensor, uma vez que tem relação direta com a integridade, disponibilidade do sítio ativo da enzima, e conseqüentemente, com a sua atividade catalítica. Existem diferentes métodos de imobilização física e química, que consistem em: adsorção física, aprisionamento, ligação covalente, ligações cruzadas e eletropolimerização.<sup>88</sup> A escolha do método de imobilização desempenha um papel importante na interação entre a enzima e o material depositado sobre o eletrodo suporte, pois pode afetar as propriedades como sensibilidade, tempo de resposta, reprodutibilidade e tempo de vida que estão relacionados com a estabilidade da enzima.

O método de *drop casting* tem sido bastante utilizado por ser um método simples e que apresenta baixo custo, não causando danos a enzima e nem ao material, além de permitir a regeneração da enzima. Esse método consiste em depositar uma solução contendo a enzima sobre a superfície do material, seguido da evaporação do solvente. Por esse método, a enzima pode ser imobilizada sobre o material por adsorção física através de ligações fracas, como as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.<sup>88,89,90</sup>

Uma das diferentes estratégias que tem sido estudada para melhorar a imobilização da enzima AChE e eficiência do biossensor é inserção de NPAu a matriz do PPI. Tem sido observado em (bio)sensores eletroquímicos, que a presença de NPAu na rede polimérica do PPI permite aumentar os pontos de imobilização de enzimas quando comparado à matrizes convencionais de PPI,<sup>67,80,87,91</sup> proporcionando uma maior adesão e estabilidade para biomolécula.<sup>92,93</sup> No entanto, em alguns casos, a imobilização orientada da enzima na superfície hidrofóbica apresentou uma melhor atividade enzimática. Neste contexto, Wu e cols.,<sup>94</sup> mostraram que é possível ajustar a hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície do eletrodo para uma adsorção controlada da enzima AChE, apenas ajustando a proporção de NPAu na matriz. Eles observaram que diferentes proporções de NPAu promovem mudança de conformação, alterando o ângulo de contato na superfície devido disponibilidade de grupos diferentes hidrofílicos e/ou hidrofóbicos.

Singh e cols.,<sup>77</sup> mostraram que a presença de NPAu na matriz polimérica resultou em um aumento da condutividade, intensidade de corrente e no coeficiente de difusão. O nanocompósito de PPI-NPAu forneceu grande área superficial para imobilização de enzimas e facilitou a transferência de elétrons, podendo ser evidenciado com um aumento de quase 10% na resposta do biossensor com a presença de NPAu. Yang<sup>95</sup> e Gong<sup>96</sup> também observaram que a inserção de NPAu em nanofios de PPI e em nanocompósitos de PPI e óxido de grafeno reduzido, respectivamente, proporcionou um ambiente mais biocompatível para manter a bioatividade da enzima AChE e que o efeito sinérgico entre os materiais melhorou as propriedades para uma detecção rápida de pesticidas organofosforados. Apesar dos avanços no desenvolvimento de biossensores enzimáticos eletroquímicos para determinação de pesticidas baseados em nanocompósitos de PPI, há poucos relatos sobre a obtenção dessas matrizes sintetizadas eletroquimicamente na forma de filmes finos sobre eletrodos condutores para essa aplicação. Além disso, esses biossensores reportados ainda apresentam algumas limitações que incluem alto limite de detecção, resposta lenta e baixa seletividade.<sup>97</sup> Portanto, há a necessidade do estudo e desenvolvimento de novas matrizes de PPI com interfaces eficientes, a partir da interação entre os componentes para obtenção de biossensores eletroquímicos com melhor desempenho e que possam ser utilizados em análise de campo.

### 3. Parte Experimental

Parâmetros experimentais como método, temperatura de síntese e concentração dos reagentes durante as sínteses eletroquímicas de filmes de nanocompósito de PPI(dopado com IC e DS) e NPAu foram determinados a partir de trabalhos reportados na literatura.<sup>21,98</sup> Com o intuito de avaliar o efeito da presença e da concentração do DS nas propriedades ópticas, estruturais, morfológicas, condutoras e eletroquímicas desses filmes de nanocompósito de PPI, variou-se a concentração do DS acima e abaixo da CMC. Após as análises de caracterização dos filmes de nanocompósito, estudou-se a aplicação desses como uma plataforma para o desenvolvimento de um biossensor enzimático eletroquímico para detecção do pesticida carbaril.

#### 3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos abaixo. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto o pirrol que foi previamente destilado para o preparo das soluções de síntese. O pirrol destilado foi purgado com nitrogênio e armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C.

- Pirrol (Pi) (Sigma Aldrich p.a);
- Índigo Carmim (IC) (Sigma Aldrich p.a);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Synth p.a);
- Ácido Tetracloro Aurato Triidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma Aldrich p.a.);
- Cloreto de Potássio (KCl) (Sigma Aldrich p.a.);
- Ácido cloro platínico hexahidratado ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma Aldrich p.a);
- Ferrocianeto de Potássio (III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (Sigma Aldrich p.a);
- Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma Aldrich p.a);
- Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma Aldrich p.a);
- Acetilcolinesterase Tipo VI-S obtida de *electrophoruselectricus* (Poraquê), (Sigma Aldrich p.a);
- Cloreto de Acetilcolina (Sigma Aldrich p.a.);
- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), (Sigma Aldrich p.a.);
- Carbaril ( $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ) (Sigma Aldrich. p.a.);
- Acetonitrila ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) (Synth p.a);
- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Vetec, p.a.);
- Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Synth p.a);

- Água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Milli-Q) foi utilizada para a preparação das soluções.

### 3.2. Materiais

Para a realização da síntese e análises eletroquímicas, foram utilizados os seguintes materiais: cela eletroquímica de vidro com controle de temperatura, eletrodo de trabalho de vidro recoberto com um filme fino de óxido de estanho dopado com índio (ITO), Delta Technologies, resistência de 8 - 12 Ω; eletrodo de referência (Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup>) (sat) LabSolutions com diâmetro de 0,4 cm; e contra-eletrodo de placa de platina de 1,0 x 1,5 cm acoplada a um fio de platina com diâmetro de 2 mm, PlatilabLtda com 99% de pureza. Foram utilizadas vidrarias para destilação e preparo de soluções. Para o armazenamento das soluções utilizou-se tubos de centrifugação de 2 e 15 mL e vidros âmbar. Em especial, para a realização das medidas espectroeletroquímicas Raman *in situ*, foi utilizada uma cela eletroquímica de teflon contendo um fio platina com espessura de 2 mm como contra-eletrodo e um fio de prata com espessura de 2 mm como pseudo-referência.

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Limpeza dos materiais

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com solução piranha (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3:1 v/v)) afim de remover qualquer resíduo orgânico. Em seguida, foram utilizado para a limpeza, detergente comercial, acetona, etanol e água ultrapura. Por fim, as vidrarias foram colocadas na estufa a 50 °C.

A limpeza dos eletrodos de trabalho utilizados para a síntese dos filmes foi realizada colocando-os em um béquer contendo solução aquosa de detergente comercial e deixando-os no ultrassom por 15 minutos. Em seguida, os eletrodos foram imersos em um béquer contendo acetona, sendo novamente colocados em banho de ultrassom por 15 minutos. Logo após, repetiu-se o procedimento com etanol. Antes de cada etapa os eletrodos foram lavados com água ultrapura. Por fim, os eletrodos foram colocados na estufa a 50 °C.

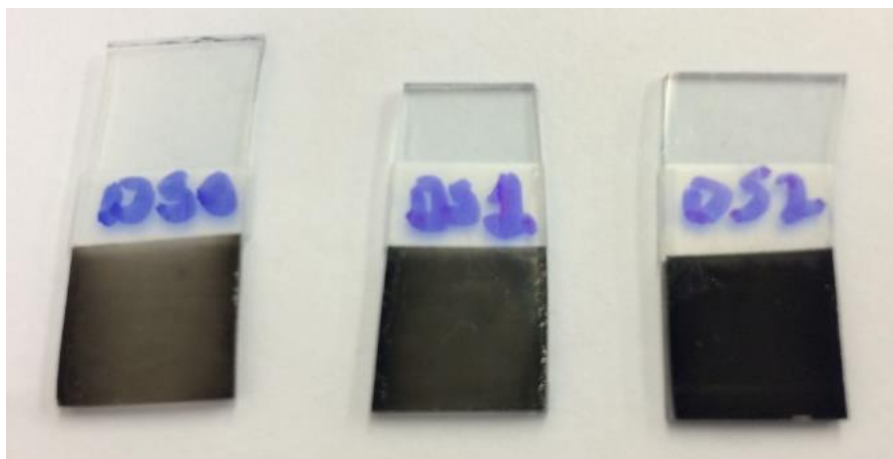
#### 3.3.2. Síntese dos filmes

A eletropolimerização dos filmes de nanocompósito de PPI foi realizada à temperatura de 10°C utilizando uma cela eletroquímica contendo três eletrodos (eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência) conectados a um



potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo 302N. A temperatura de síntese foi controlada utilizando um banho termostático, Termoscientific. O eletrodo de trabalho utilizado foi ITO, sendo os filmes sintetizados sobre uma área delimitada de ca. 1 cm<sup>2</sup>.

Os filmes foram eletropolimerizados através do método de VC, faixa de potencial entre -0,3 V e 1,3 V por 2 ciclos com velocidade de 30 mVs<sup>-1</sup>,<sup>21</sup> utilizando uma solução aquosa contendo Pi (0,1mol.L<sup>-1</sup>), IC (5 mmol.L<sup>-1</sup>), DS (4 mmol.L<sup>-1</sup> ou 16 mmol.L<sup>-1</sup>) e HAuCl<sub>4</sub> (2 mmol.L<sup>-1</sup>). A CMC do DS em água é 8,1 mmol.L<sup>-1</sup>.<sup>62</sup> Os filmes sintetizados foram nomeados como PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu (Figura 19). DS1 e DS2 correspondem a concentração de 4 mmol.L<sup>-1</sup> e 16 mmol.L<sup>-1</sup> de DS, respectivamente.



**Figura 19.** Foto dos filmes de nanocompósito eletropolimerizados. DS0, DS1 e DS2 correspondem aos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente.

### 3.3.3. Caracterização dos filmes (eletrodos)

As caracterizações morfológicas dos filmes foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (EDX), Microscopia de Força Atômica (AFM) e Ângulo de Contato. As imagens de MEV foram obtidas utilizando um microscópio HITACHI S-4800 FESEM com tensão de aceleração de 2 kV. A topografia dos filmes foi analisada utilizando um microscópio de força atômica Agilent 5500. As imagens de AFM foram adquiridas em temperatura ambiente. A Rugosidade Média Quadrática ( $R_{ms}$ ) foi estimada utilizando o software Gwydeon<sup>®</sup>. As medidas de Ângulo de Contato foram realizadas utilizando um equipamento KRAUS DSA 30. Três gotas de água deionizada (2 $\mu$ L) foram

consideradas em cada superfície. Os ângulos foram registrados imediatamente após a disposição das gotas, sendo todas as medidas registradas automaticamente. As propriedades ópticas dos filmes foram estudadas através de análises de UV-Vis utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2450PC. A energia de gap óptica direta foi calculada utilizando o modelo de Tauc,<sup>99,100</sup> de acordo com a Equação 1.

$$\alpha h\nu = (h\nu - E_{gap})^n$$

Equação 1

Onde,  $\alpha$  é o coeficiente de absorção,  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  é frequência do fóton,  $E_{gap}$  é a energia de gap e o parâmetro  $n$  é um número associado a diferentes tipos de transições eletrônicas. O  $\alpha$  pode ser calculado de acordo com a Equação 2.<sup>21</sup>

$$\alpha(\nu) = \frac{2,303 A(\nu)}{d}$$

Equação 2

Onde,  $A(\nu)$  corresponde absorvância e  $d$  à espessura do filme. Plotando  $(\alpha h\nu)^{1/n}$  versus  $(h\nu)^{101-103}$  é possível determinar os valores de  $E_{gap}$  extrapolando a porção linear da curva no eixo  $h\nu$  para valores de  $\alpha = 0$ . Para transição direta,  $n$  é igual a  $1/2$ .

As transições eletrônicas podem ser diretas ou indiretas. Porém, a probabilidade que ocorra a transição direta entre bandas é maior do que a indireta.<sup>104</sup> A transição eletrônica do tipo direta, ocorre uma vez que o nível mais alto da BV e o nível mais baixo da BC estão associados ao mesmo vetor de onda ou momento ( $k$ ), permitindo a transição direta apenas pela absorção do fóton, enquanto que a transição indireta ocorre quando os níveis das bandas mencionados estão associados a diferentes momentos, envolvendo a energia de fótons e fônons.<sup>99,104</sup>

A resistividade elétrica dos filmes foi medida pela técnica de quatro pontas usando uma sonda JANDEL Universal. A distância entre os pontos foi fixado em 1,0 mm e uma pressão de 15g/ponta. As resistividades elétricas obtidas pelo método de quatro pontas foram calculadas de acordo com a Equação 3.

$$\rho = R_f t$$

Equação 3

Onde,  $\rho$  é a resistividade elétrica ( $\Omega \cdot \text{cm}$ ),  $t$  é a espessura do filme ( $\text{cm}$ ) e  $R_f$  é a resistência elétrica da folha (é o valor medido no equipamento)( $\Omega$ ).<sup>105,106</sup>

Análises eletroquímicas dos filmes foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo 302N. Os eletrodos foram caracterizados por VC, aplicando a faixa de potencial entre -1,0 e 1,0 V, com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  e como eletrólito uma solução aquosa contendo  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de KCl. A eficiência eletrocatalítica e a área superficial eletroativa dos eletrodos foram avaliadas e estimadas através de análises de VC, aplicando a faixa de potencial entre -0,2 e 0,8 V, com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , e em diferentes velocidades de varredura, variando entre 10 e  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Como eletrólito utilizou-se uma solução aquosa contendo  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de KCl.

Para estimar a área superficial eletroativa foi utilizada a equação de Randles-Sevcik<sup>107</sup> (Equação 4), conforme descrita abaixo:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

Equação 4

Onde,  $I_p$  pode ser o valor correspondente a  $I_{pa}$  ou  $I_{pc}$  (A),  $n$  é o número de elétrons envolvidos ( $n = 1$  no sistema redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ),  $A$  é a área superficial eletroativa/efetiva ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  ( $D_{ox} = 7,6 \times 10^{-6}$  e  $D_{red} = 6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $C$  é a concentração de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  utilizada em solução ( $C = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $0,01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ ).<sup>108,109</sup> Para calcular a área superficial eletroativa dos eletrodos foi utilizado o valor da  $I_{pa}$ (A) e  $D_{ox}$ .

Os filmes foram caracterizados estruturalmente por análises de espectroscopia Raman e espectroeletróquímica Raman *in situ*. Os espectros Raman foram obtidos através de um microscópio Renishaw utilizando um laser He-Ne (Melles Griot) com emissão em 633 nm e uma objetiva de 50x ( $NA = 0,75$ , Leyca Microsystems). Trabalhou-se no modo reflexão, ou seja, a mesma lente objetiva foi utilizada para incidir e coletar a radiação. Para essas análises foi utilizado um detector CCD (Andor) termoeletricamente resfriado. A caracterização por espectroeletróquímica Raman *in situ* foi realizada usando um potenciostato/galvanostato BIO-LOGIC SP-240. O equilíbrio elétrico do sistema foi alcançado com a estabilização da corrente correspondente a um potencial específico antes de coletar cada espectro Raman. Os potenciais (+ 0,5, + 0,3, + 0,1, - 0,1 - 0,4, - 0,6 e - 0,8V) foram aplicados por um tempo total de 110 s. Como

eletrólito foi utilizado uma solução de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl. Os espectros Raman obtidos a partir das análises espectroeletróquímicas *in situ* foram tratados pelo método trapezoidal.

As análises de MEV, AFM, Raman e espectroeletróquímicas Raman *in situ* foram realizadas na University of Victoria, no laboratório de pesquisa do professor Dr. Alexandre Brolo durante o período de doutorado sanduíche. As demais análises foram realizadas na UFRGS, como por exemplo, as análises de UV-Vis no prédio do Lamoca, análises eletroquímicas no prédio da química inorgânica (sala D109) do instituto de química e as medidas de ângulo de contato no laboratório de multiusuário de análise de superfícies (LAMAS).

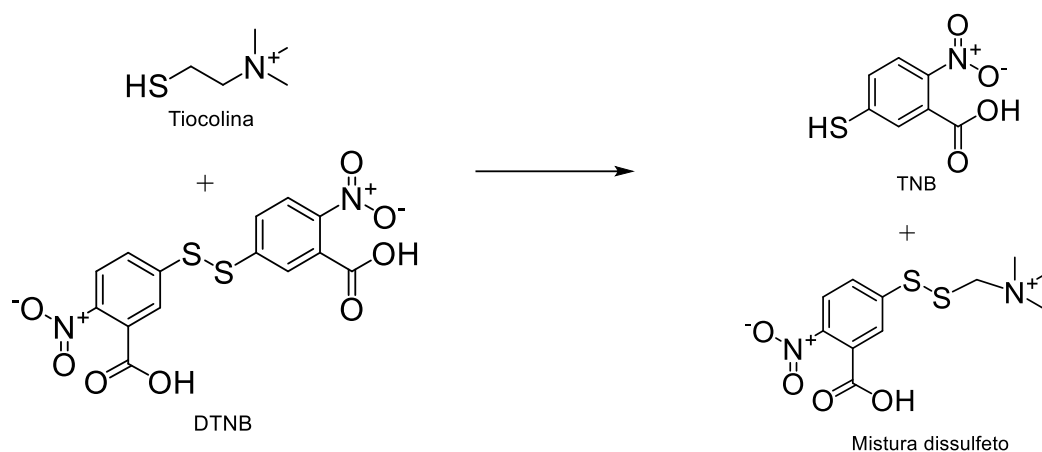
#### *3.3.4. Aplicação dos eletrodos como biossensores*

Com o intuito de avaliar a performance dos filmes de nanocomposito como biossensores eletroquímicos para detecção de pesticidas carbamatos, os materiais sintetizados foram utilizados como uma plataforma para imobilização da enzima AChE para detecção do pesticida carbaril. Todas as análises foram realizadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4, por ser o pH ótimo de atuação da enzima.

##### *3.3.4.1. Análise da atividade da enzima AChE em solução*

Com a finalidade de verificar a atividade da enzima AChE antes da imobilização sobre a superfície dos eletrodos para confecção dos biossensores eletroquímicos, foram realizadas análises colorimétricas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Essa análise consiste em avaliar a capacidade da enzima AChE em hidrolisar o ATCL, levando a formação de ácido acético e tiocolina.<sup>110</sup> A formação da tiocolina pode ser detectada indiretamente através da sua reação com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB)), que leva a formação do produto amarelo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), conforme apresentado na Figura 20. A formação do produto TNB pode ser confirmada através da absorbância em 412 nm.<sup>110,111</sup>

Para a realização das análises foram preparadas soluções de 3 mL de PBS, contendo  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ATCL,  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  de DTNB e AChE. A concentração de AChE variou entre 2,2 e  $17,6 \text{ mU.mL}^{-1}$ . Para todas as análises foi utilizado como branco a mesma solução na ausência da enzima AChE.



**Figura 20.** Esquema Reacional do Ensaio Colorimétrico.<sup>111</sup>

### 3.3.4.2. Preparação dos biossensores eletroquímicos

Para melhorar a aderência dos filmes de nanocompósito ao eletrodo de ITO para serem aplicados como biossensores, foi eletrodepositado um filme fino de platina sobre o ITO. A eletrodeposição ocorreu através do método de cronopotenciometria, aplicando -2 mA por 30 s. Como eletrólito, utilizou-se uma solução aquosa contendo  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Após a eletrodeposição dos filmes finos de platina, os filmes de nanocompósito foram sintetizados como descrito na seção 3.2.2.

Para imobilização da enzima AChE, primeiramente foi preparada uma solução estoque (A) de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de PBS e  $33 \text{ U.mL}^{-1}$  de AChE. A solução estoque A foi distribuída em 100 tubos de centrifugação de 2 mL e armazenadas em ambiente refrigerado a ca.  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ , para evitar a desnaturação da enzima. A partir da solução A, foi preparada uma solução (B), retirando uma alíquota de  $20 \mu\text{L}$  da solução estoque A e diluindo em  $980 \mu\text{L}$  de PBS, obtendo-se  $0,66 \text{ U.mL}^{-1}$  de AChE em solução. Em seguida, foi realizada a imobilização da enzima AChE sobre a superfície dos eletrodos pelo método de *drop casting*. Para isso, utilizou-se uma alíquota de  $50 \mu\text{L}$  da solução B, correspondendo à  $33 \text{ mU}$  de AChE, deixando-a por 30 minutos sobre a superfície dos eletrodos. Após, removeu-se o excesso de solução e os eletrodos contendo a AChE imobilizada foram armazenados em ambiente refrigerado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . A determinação do tempo de imobilização da AChE foi determinada de acordo com a literatura.<sup>112,113</sup>

Os eletrodos/biossensores foram preparados e armazenados a  $4^\circ\text{C}$  com no mínimo 24 horas antes da realização das análises. Os biossensores obtidos foram nomeados como Pt-PPI-IC-NPAu-AChE, Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE e Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE.

### 3.3.4.3. Análises dos biossensores eletroquímicos

As análises eletroquímicas para a caracterização e aplicação dos biossensores foram realizadas utilizando uma cela eletroquímica contendo três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho o biossensor, o contra-eletrodo uma placa de platina e eletrodo de referência de (Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup>) (sat).

Todas as análises eletroquímicas, exceto a análise eletroquímica para determinação do tempo de armazenamento dos biossensores em ambiente refrigerado, foram realizadas após 24 h de imobilização da enzima AChE. Antes de cada análise eletroquímica, os biossensores foram lavados com 200 µL de uma solução 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS a fim de remover a enzima não imobilizada.

#### 3.3.4.3.1. Análises de voltametria cíclica em ATCL

Com a finalidade de desenvolver um biossensor amperométrico baseado na inibição da enzima AChE para detecção do pesticida carbaril, primeiramente foram realizadas análises de VC. As análises de VC foram realizadas aplicando a faixa de potencial entre 0 e 1,0 V, com velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. Como eletrólito, utilizou-se uma solução de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS contendo 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATCL. Os biossensores de Pt-PPI-IC-NPAu-AChE, Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE e Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE foram avaliados através desta análise com o objetivo de selecionar o eletrodo mais adequado para a aplicação como biossensor.

#### 3.3.4.3.2. Caracterização do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE

Com o objetivo que verificar a presença e a conformação da enzima AChE imobilizada, foram realizadas análises de MEV com tensão de aceleração de 1 kV e espectroscopia Raman. A área superficial eletroativa do biossensor e a concentração da enzima AChE eletroativa foram estimadas através de análises de VC, aplicando a faixa de potencial entre -0,2 e 0,8 V, com velocidade de varredura de 10 mV.s<sup>-1</sup>, e em diferentes velocidades de varredura, variando entre 10 a 100 mV.s<sup>-1</sup>. Como eletrólito utilizou-se uma solução aquosa contendo 5 mmol.L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. O eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu também foi caracterizado para fins de comparação.

Para estimar a área superficial eletroativa foi utilizada a Equação 4. A concentração de espécies eletroativas na superfície do eletrodo foi calculada através da Equação 5.<sup>99,114</sup>

$$\tau = \frac{Q}{nFA}$$

Equação 5

Onde,  $\tau$  é a concentração de espécies eletroativas na superfície do eletrodo ( $\text{mol.cm}^{-2}$ ),  $Q$  é a carga total do voltamograma referente a oxidação da tiocolina ( $4,44 \times 10^{-3} \text{ C}$ , *inset* da Figura 34b),  $n$  é o número de elétrons participando da reação redox ( $n= 2$ ),  $F$  é a constante de Faraday ( $96485,3329 \text{ C.mol}^{-1}$ ) e  $A$  é a área superficial eletroativa ( $0,5 \text{ cm}^2$ ).

#### 3.3.4.3.3. Análises de reprodutibilidade, interferentes e estabilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DSI-NPAu-AChE em ATCL

Todo as análises foram realizadas pelo método de cronoamperometria, aplicando + 0,6 V por 80 s (sendo o potencial definido a partir dos resultados da VC, Figura 34b) e utilizando como eletrólito uma solução de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de PBS contendo  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ATCL. A reprodutibilidade, a presença de interferentes e a estabilidade do biossensor, foram verificadas através da resposta da corrente correspondente a oxidação da tiocolina. A discussão dos resultados a partir de análises de cronoamperometria foram realizadas avaliando a resposta da corrente do biossensor no tempo de 80 s, uma vez que após 60 s não se observou mudanças significativas nos valores das correntes. A definição do tempo para avaliar a resposta da corrente está de acordo com a literatura.<sup>115,116</sup>

Para a análise de reprodutibilidade inter-eletrodo foram obtidos 5 biossensores sob as mesmas condições e analisados em dias diferentes. Os 5 biossensores foram armazenados por 24 h em ambiente refrigerado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O coeficiente de variância ou desvio padrão relativo (DPR) foi calculado através da Equação 6.<sup>117</sup>

$$DRP(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 6

Onde,  $s$  é o desvio padrão e  $\bar{x}$  é a média das medidas. A média e o desvio padrão podem ser calculados a partir da Equação 7 e Equação 8.<sup>104</sup>

$$\bar{x} = \frac{\sum i}{n}$$

Equação 7

$$S = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})}{n}}$$

Equação 8

Onde,  $\sum i$  é a soma das densidades de corrente no tempo de 80 s,  $n$  é o número de eletrodos e  $xi$  é a densidade de corrente de cada eletrodo.

A análise de interferentes foi realizada na ausência e presença de interferentes. Como interferentes foram utilizados 1 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 1 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose, que são moléculas presentes em amostras biológicas.

A estabilidade do biossensor foi verificada em relação ao tempo de armazenamento dos biossensores por 1, 7 e 30 dias em ambiente refrigerado a 4 °C. Para verificar o efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade do biossensor, este também foi armazenado por 7 dias em ambiente refrigerado à ca. -15 °C.

#### 3.3.4.3.4. Determinação do tempo de incubação do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE na solução contendo o pesticida carbaril

Para determinação do tempo de incubação do biossensor para detecção eletroquímica do pesticida carbaril, foram realizadas análises de cronoamperometria, aplicando + 0,6 V por 80 s, sendo a resposta da corrente do biossensor avaliada no tempo de 80 s. Como eletrólito foi utilizado uma solução de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS contendo 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATCL. Para a realização dessa análise, primeiramente, foi registrada a resposta do biossensor frente a oxidação da tiocolina. Em seguida, o biossensor foi imerso em uma solução aquosa de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS contendo 50 ng.mL<sup>-1</sup> de carbaril. Então, a resposta da corrente frente a oxidação da tiocolina passou a ser registrada a cada 1 minuto após a imersão do biossensor na solução contendo o carbaril, por um tempo total de 16 minutos.

A detecção eletroquímica do pesticida carbaril pode ser dada através da porcentagem de inibição da atividade catalítica da enzima AChE (I (%)) (Equação 9)) em função da concentração do pesticida e através da porcentagem da atividade residual da enzima AChE (ARE (%)) em função do tempo ou da concentração do pesticida (Equação 10).<sup>175,118</sup>



$$I(\%) = \frac{J_0 - J_i}{J_0} \times 100$$

Equação 9

$$ARE (\%) = \frac{J_i}{J_0} \times 100$$

Equação 10

Onde,  $J_0$  e  $J_i$  representam a densidade de corrente do biossensor antes e após a incubação do biossensor na solução inibidora, respectivamente.

#### 3.3.4.3.5. Determinação eletroanalítica do pesticida carbaril (obtenção da curva de calibração) utilizando o biossensor de Pt-PPI-IC-DSI-NPAu-AChE

Para a determinação do pesticida carbaril, primeiramente foi preparada uma solução estoque do pesticida utilizando como solvente acetonitrila e 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS (3:7 (v/v)). A partir da solução estoque foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações do pesticida carbaril em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS. A faixa de concentração do pesticida carbaril variou entre 0,05 ng.mL<sup>-1</sup> e 5 ng.mL<sup>-1</sup>, que corresponde a 0,2 nmol.L<sup>-1</sup> e 25 nmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A determinação eletroquímica do pesticida carbaril foi realizada através do método de cronoamperometria, aplicando + 0,6 V por 80 s, sendo a resposta da corrente do biossensor avaliada no tempo de 80 s. O eletrólito utilizado foi uma solução de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PBS contendo 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATCL. A resposta do biossensor foi verificada em ATCL antes e após a imersão (inibição) do biossensor por 8 minutos em cada solução contendo diferentes concentrações do pesticida carbaril (0,05, 0,17, 0,25, 0,42, 0,60, 0,77, 3,0, e 5,0 ng.mL<sup>-1</sup>).

A curva analítica foi obtida considerando a resposta da corrente do biossensor em ATCL após a inibição versus a concentração do pesticida. A partir da obtenção da curva analítica, foi possível calcular o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). O LD e LQ podem ser calculados através da Equação 11 e Equação 12.<sup>119</sup>

$$LD = \frac{3\sigma S_b}{b}$$

Equação 11

$$LQ = \frac{10xS_b}{b}$$

Equação 12

Onde  $S_b$  ( $6,57 \times 10^{-7} A$ ) é calculado de acordo com a Equação 8, que corresponde ao desvio padrão da média aritmética das correntes dos cronoamperogramas do branco e  $b$  ( $3,32 \times 10^{-5}$ ) é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

A porcentagem de inibição da atividade catalítica da enzima AChE e atividade residual da enzima AChE em função da concentração de pesticida, foram calculadas utilizando a Equação 9 e Equação 10, respectivamente.

#### 3.3.4.3.6. Análises de reprodutibilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DSI-NPAu-AChE após a inibição com o pesticida carbaril

A reprodutibilidade dos biossensores para a detecção eletroquímica do pesticida carbaril foram determinadas realizando experimentos inter-eletrodo, utilizando o método de cronoamperometria, aplicando + 0,6 V por 80 s, sendo a resposta da corrente do biossensor avaliada no tempo de 80 s. As análises foram realizadas em solução de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de PBS contendo  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ATCL antes e após a incubação do biossensor por 8 minutos em uma solução de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de PBS contendo  $0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$  de carbaril.

A reprodutibilidade inter-eletrodo foi determinada através do desvio padrão relativo, calculado de acordo com a Equação 13. Para essa análise foi utilizado três biossensores preparados sob as mesmas condições e avaliados em dias diferentes (Figura 45).

$$DRP = \frac{S_b}{\bar{x}}$$

Equação 13

Onde  $S_b$  é o desvio padrão da média dos valores de inibição obtidos (Equação 8), e  $\bar{x}$  é a média da inibição (Equação 7).<sup>119,120</sup>

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização dos filmes de nanocompósito

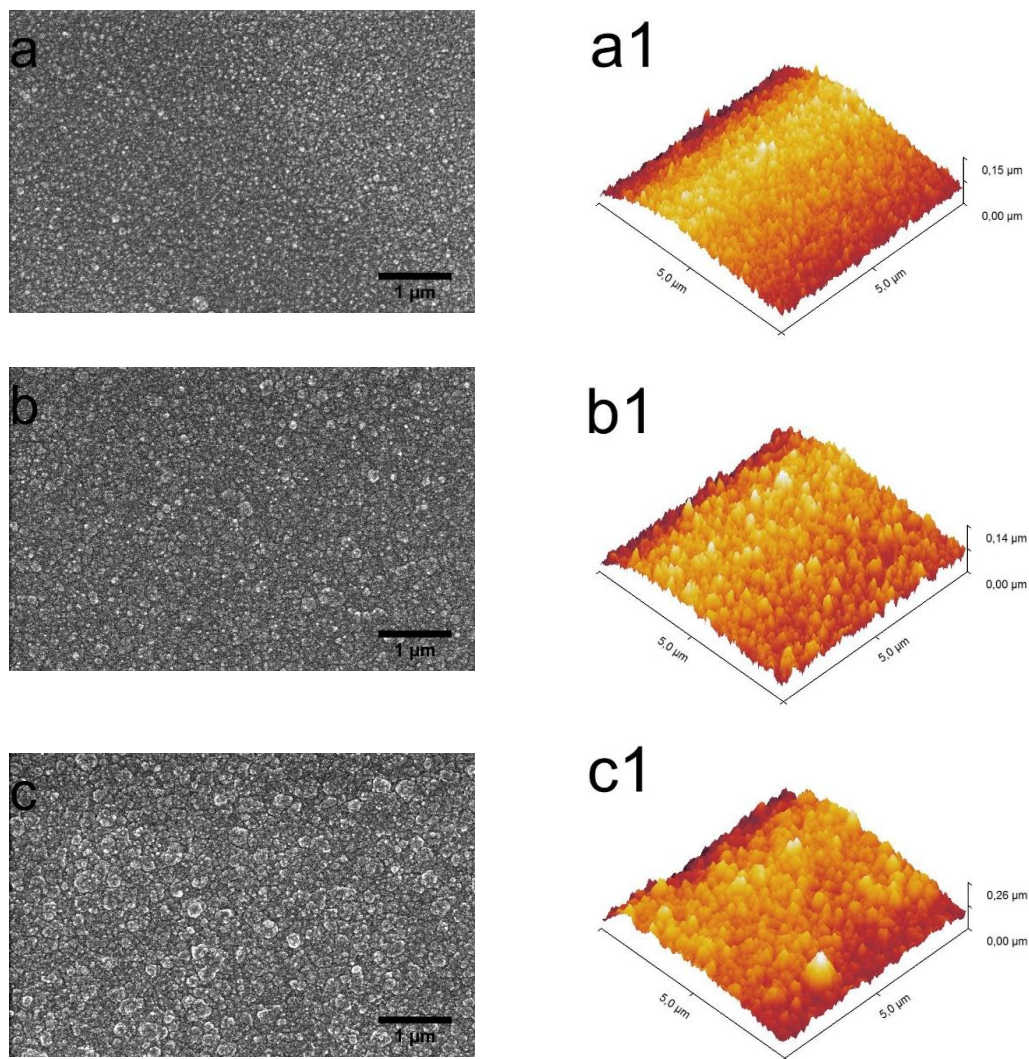
As propriedades físicas, químicas e eletroquímicas dos filmes de PPI podem sofrer grandes modificações com a mínima variação em seus processos de síntese, como por exemplo, devido a utilização de diferentes dopantes. Com o intuito de avaliar essas propriedades dos filmes de nanocompósitos de PPI sintetizados, foram realizadas algumas análises de caracterização, conforme discutidas nessa seção.

#### 4.1.1. Caracterização morfológica

##### 4.1.1.1. Microscopias eletrônicas de varredura e de força atômica

A morfologia e uniformidade das superfícies dos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu depositados sobre ITO foram caracterizadas por análises de MEV e AFM. A Figura 21 apresenta as imagens de MEV e AFM dos filmes de nanocompósito. Observe que quando o filme é sintetizado utilizando apenas IC como dopante (Figura 21 a-a1), ocorre a formação de filmes mais homogêneos contendo pequenos grânulos, da mesma forma que já visualizado em outros trabalhos da literatura, que retratam a dependência das propriedades morfológicas do filme com o tipo de dopante.<sup>18,21</sup> Na presença de DS (Figura 21(b-b1 e c-c1)), os filmes apresentam algumas modificações na morfologia, sendo possível observar a formação de grânulos maiores, com uma distribuição menos homogênea, quando comparado ao filme de PPI-IC-NPAu. Esta diferença se torna mais evidente nos filmes sintetizados contendo DS acima da CMC (Figura 21c).

Avaliando as imagens de AFM Figura 21 (a1, b1 e c1), foi possível determinar a rugosidade média ( $R_{ms}$ ) dos filmes, sendo 11,53, 12,44 e 18,51 nm para PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente. Estes resultados corroboram com o aumento do tamanho dos grânulos na presença de DS, como observado por MEV e podem também estar associados com a formação de filmes mais espessos, resultante da maior concentração final de dopante na solução.



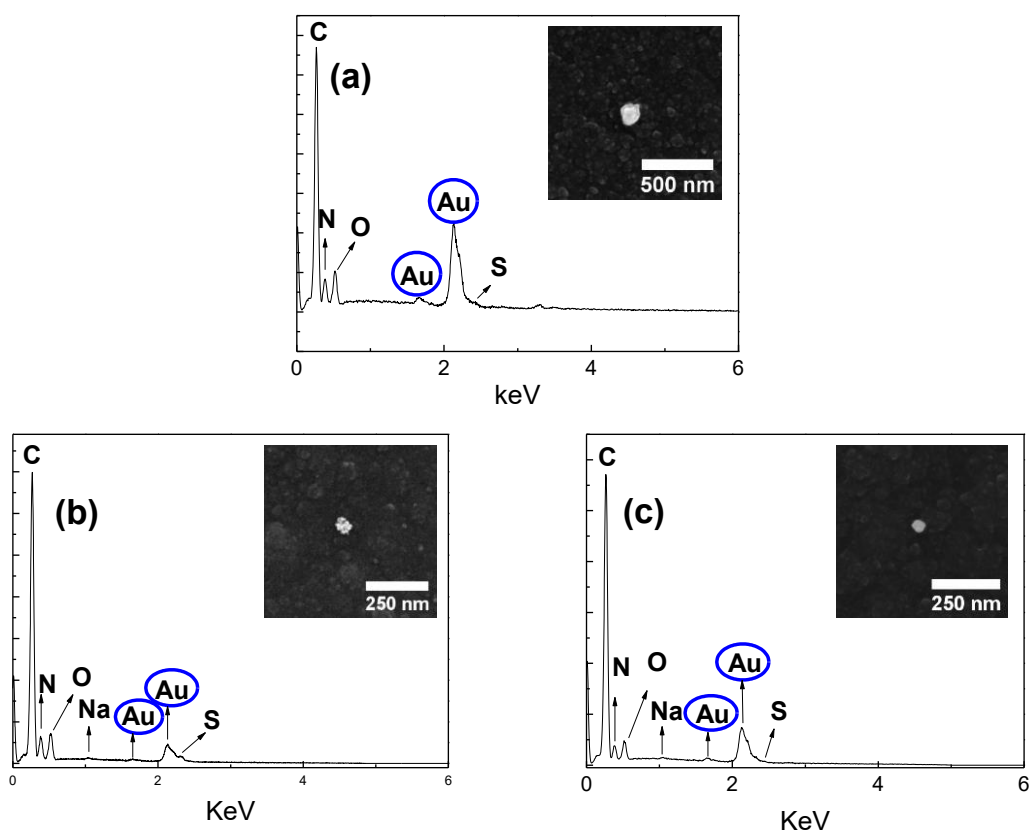
**Figura 21.** Imagens de MEV (a, b e c) e AFM (a1, b1 e c1) para os filmes de nanocompósito. (a-a1) PPI-IC-NPAu, (b-b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c-c1) PPI-IC-DS2-NPAu.

A morfologia é resultante do mecanismo de eletropolimerização do PPI. Durante a polimerização eletroquímica, o monômero de Pi é oxidado formando um cátion radical, que pode reagir com outro cátion radical ou com um monômero. A formação de cátions é energeticamente favorecida na presença dos contra-íons, neste caso moléculas de IC e DS, que são inseridos no filme para fornecer a neutralização da carga, ou seja, agem como dopantes devido às suas cargas negativas. No processo de síntese, moléculas de DS e IC podem “competir” entre si para intercalarem-se ao polímero.<sup>15,21</sup> Ao mesmo tempo, os íons de ouro são reduzidos, podendo atuar como centros de adsorção para os monômeros oxidados e oligômeros de Pi, devido ao grande número de elétrons ao redor dos átomos de ouro.<sup>21,121</sup> Apesar das moléculas de IC poderem atuar como uma ponte

dianiônica entre as cadeias de PPI, o que induz a um certo grau de ordenamento na cadeia polimérica, a presença do surfactante DS acima da CMC durante a polimerização pode também atuar como um “molde” para o crescimento do PPI.<sup>59</sup>

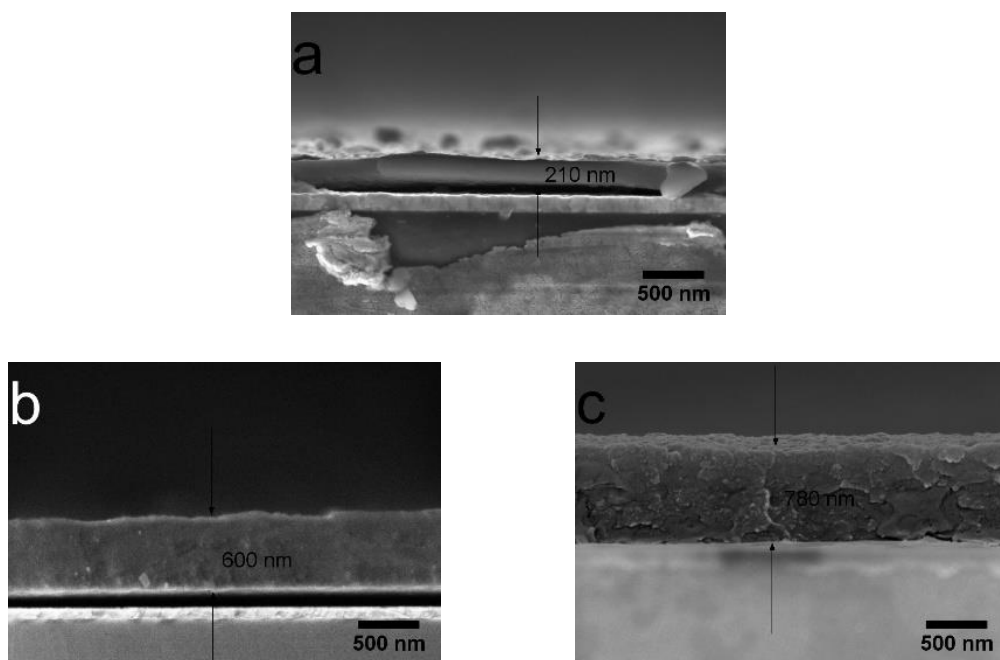
A molécula aniônica de DS possui uma “cabeça” hidrofílica e uma “cauda” hidrofóbica. Quando em solução aquosa, as moléculas do surfactante formam uma monocamada na interface água/ar, mantendo a cauda em contato com o ar. Com o aumento da concentração do surfactante acima da CMC, essas moléculas começam a se aglomerar em solução na forma de esferas e/ou micelas, permitindo que os monômeros oxidados sejam adsorvidos ao redor dessas micelas, dando sequência a formação do polímero.<sup>122</sup>

Para analisar a composição elementar dos nanocompósitos, foram realizadas análises de EDX. Nos espectros de EDX apresentados na Figura 22 estão evidentes os picos correspondentes ao ouro, confirmando a presença de NPAu nos filmes. O pico de enxofre nos espectros é devido inserção das moléculas de IC e DS na cadeia do polímero. A baixa intensidade se deve à concentração bem menor que do monômero no meio.



**Figura 22.** Espectros EDX dos filmes. (a) PPI-IC-NPAu, (b) PPI-IC-DS1-NPAu e (c) PPI IC-DS2-NPAu.

Um dos parâmetros importantes a serem avaliados após a síntese de polímeros condutores é a espessura dos filmes obtidos, uma vez que a espessura influencia diretamente nas propriedades ópticas e eletroquímicas dos materiais. A espessura dos filmes de nanocompósito foi determinada através de análises de MEV, obtendo a imagem da secção transversal dos filmes, apresentados na Figura 23. As espessuras obtidas foram 210, 600 e 780 nm para os filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente. Pode-se observar que os filmes de nanocompósito sintetizados na presença de DS são mais espessos do que o filme de PPI-IC-NPAu. Esse fato é devido a uma maior concentração de contra-íons (dopantes) disponíveis em solução durante o processo de polimerização. Além disso, a formação de micelas em solução atuando como dopante, pode contribuir para o aumento da espessura do filme, uma vez que ocorre a formação de grânulos maiores, como observado na Figura 21.



**Figura 23.** Imagens de MEV da secção transversal dos filmes. a) PPI-IC-NPAu, b) PPI-IC-DS1-NPAu e c) PPI-IC-DS2-NPAu.

#### 4.1.1.2. Medidas de ângulo de contato

O ângulo de contato ou ângulo de molhabilidade é uma medida relativa à energia de superfície.<sup>123</sup> Essa análise está relacionada com a interação molecular entre sólidos e líquidos em contato direto na interface entre eles, ou seja, é o reconhecimento existente entre as forças coesivas e as forças atrativas entre o sólido e líquido. A água em contato com uma superfície sólida, por possuir um caráter polar, quando apresenta um ângulo de

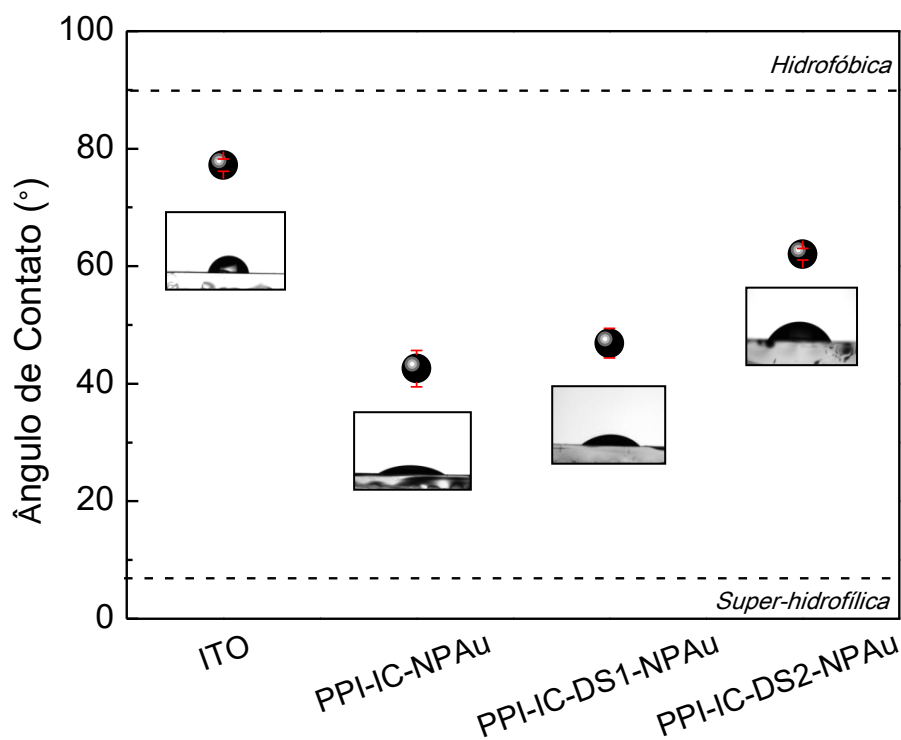
contato menor que  $90^\circ$  é considerada hidrofílica. Porém, se este ângulo de contato for maior que  $90^\circ$ , o material é considerado hidrofóbico.<sup>124</sup> Segundo as classificações propostas por Dreliche<sup>125</sup> e Tomas,<sup>126</sup> a superfície dos filmes pode ser definida de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação da superfície em função do ângulo de contato.<sup>125,126</sup>

Ângulo de Contato	Superfície
$\sim 0^\circ$	Super-hidrofílica
$\theta < 30^\circ$	Hidrofílica
$30^\circ < \theta < 56^\circ$	Levemente Hidrofílica
$56^\circ < \theta < 90^\circ$	Levemente Hidrofóbica
$90^\circ \leq \theta < 140^\circ$	Hidrofóbica
$\theta > 140^\circ$	Super-hidrofóbica

Para avaliar a superfície dos filmes quanto a sua hidrofiliidade, foram determinados os valores de ângulo de contato. Através da Figura 24 observa-se que a superfície de todos os filmes, inclusive a do substrato de ITO, classificam-se como intermediárias. O ângulo de contato da água com a superfície dos filmes foi  $77,2^\circ$ ,  $42,6^\circ$ ,  $46,7^\circ$  e  $62,0^\circ$  para o ITO, PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente. O valor de ângulo de contato da água em ITO está de acordo com a literatura,<sup>127</sup> demonstrando a confiabilidade da análise realizada.

A partir desse resultado é possível constatar que no filme de nanocompósito sintetizado com DS abaixo da CMC, não ocorreu mudanças significativas em relação ao filme de PPI-IC-NPAu demonstrando que a presença de DS nessa concentração não afeta a molhabilidade do filme. Entretanto, com o aumento da concentração de DS acima da CMC, observa-se um aumento significativo no valor do ângulo de contato, indicando um aumento do caráter hidrofóbico do filme, como indicado na Tabela 1. Esses resultados podem ser decorrentes da maior rugosidade dos filmes na presença do DS (Figura 21).

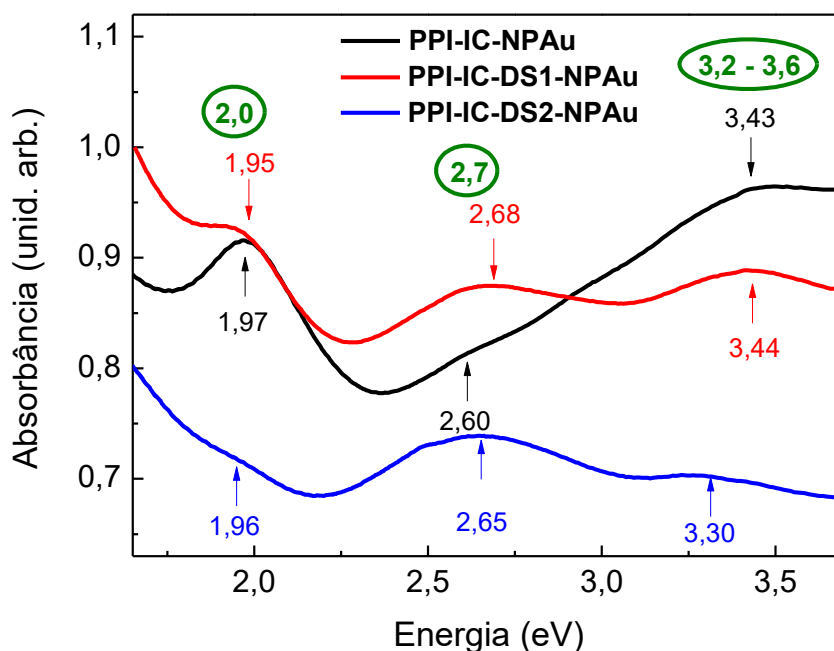


**Figura 24.** Ângulo de contato dos filmes de nanocompósito. *Inset:* Imagens das gotas sobre a superfície dos filmes e do substrato de ITO (n = 3).

#### 4.1.2. Caracterização óptica

A Figura 25 apresenta os espectros de absorção UV-Vis dos filmes de nanocompósito de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu. Podemos observar a presença de bandas e ombros em ca. 1,97, 2,60 e 3,43 eV (629, 477 e 361 nm) para PPI-IC-NPAu; 1,95, 2,68 e 3,44 eV (636, 463 e 360 nm) para PPI-IC-DS1-NPAu; e 1,96, 2,65 e 3,30 eV (633, 468 e 380 nm) para PPI-IC-DS2-NPAu.





**Figura 25.** Espectros de absorção UV-Vis dos filmes de nanocompósito.

As bandas de absorção entre 3,2 e 3,6 eV para filmes de PPI estão atribuídas a transição entre a banda de valência e a banda de condução ( $\pi - \pi^*$ ).<sup>22,24</sup> As bandas de absorção em ca. 2,1 e 2,7 eV correspondem a transição da banda de valência para o estado *polaron* antiligante e a transição da banda de valência para o estado *bipolaron* antiligante, respectivamente.<sup>128,129</sup>

As bandas em ca. 2,0 eV também sugerem a inserção de IC à matriz do PPI, uma vez que a molécula do corante apresenta um máximo de absorção em ca. 2,03 eV (610 nm), atribuído as transições dos elétrons não ligantes do nitrogênio com o grupo antiligante das duplas ligações ( $n-\pi^*$ ), devido ao grupo indigoide presente em sua estrutura.<sup>130,131</sup> Esta banda está sobreposta pela banda de absorção do PPI, que se encontra em quantidade significativamente maior em relação ao IC. Contudo, para o filme de PPI-IC-DS2-NPAu é possível observar uma diminuição da intensidade dessa banda, corroborando com a discussão realizada na seção 4.1.1., em que pode ocorrer uma competição entre os dopantes, resultando em uma concentração efetiva de IC menor nos filmes contendo DS.

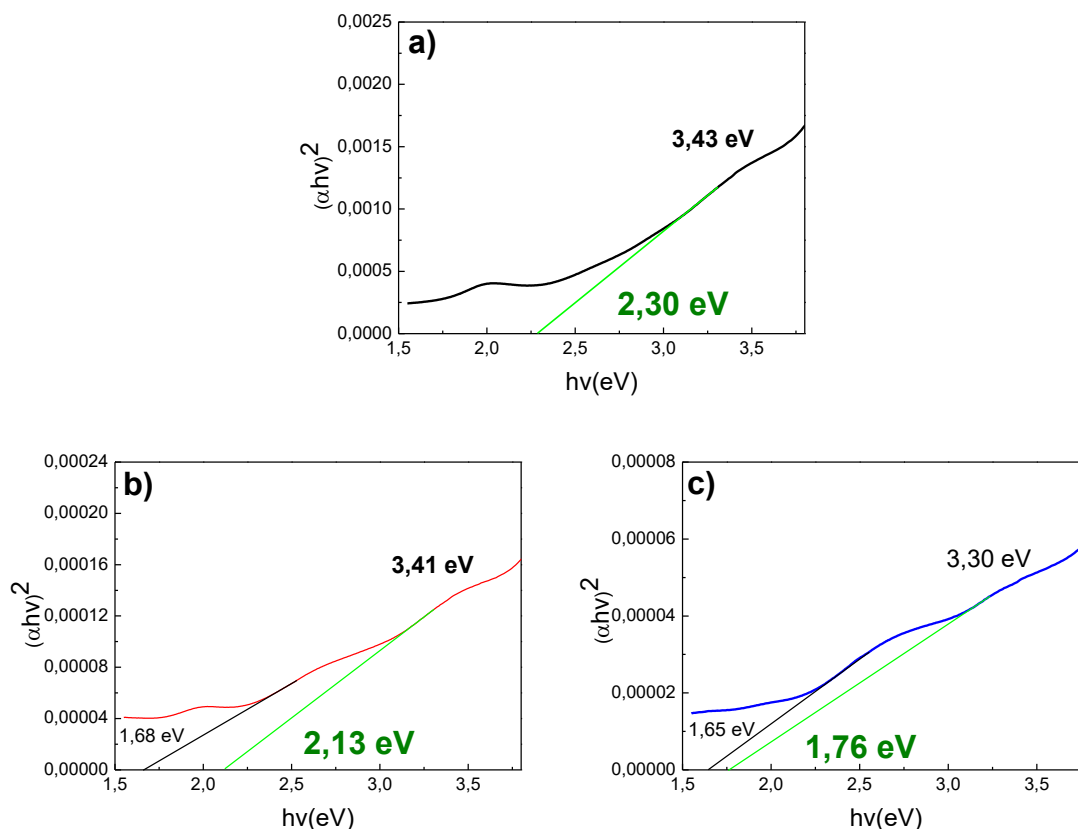
De acordo com trabalhos previamente reportados pelo nosso grupo, o filme de PPI-IC sintetizado a 10 °C apresenta um máximo de absorção em ca. 2,02 eV (614 nm),<sup>21,22</sup> que se desloca para menores energias na presença das NPAu à matriz

deste filme. Este comportamento pode ser resultante da interação das moléculas de IC com a superfície das NPAu.<sup>21</sup>

As posições e intensidades das bandas na região entre 3,2 - 3,6 eV, em ca. 2,7 eV e ca. 2,0 eV indicam o nível de dopagem dos filmes poliméricos, sendo que apenas a banda em 2,7 eV está associada com maior grau de dopagem e por isso se torna mais evidente, enquanto as demais diminuem suas intensidades com o maior grau de dopagem. De acordo com Bredas<sup>24</sup> (Figura 10) a presença da banda com intensa absorção em ca. 2,7 eV indica a existência de banda *bipolarônica*. Sendo assim, o aumento das intensidades das bandas em ca. 2,68 eV para os filmes de PPI-IC-DS1-NPAu e 2,65 eV para o PPI-IC-DS2-NPAu em comparação à banda em ca. 2,60 eV para o PPI-IC-NPAu, sugerem que a inserção de moléculas de DS à matriz do polímero pode aumentar o nível de dopagem do nanocompósito de PPI.<sup>62</sup> Adicionalmente, o deslocamento desta banda para maiores energias corrobora com esta hipótese.

Os deslocamentos dessas bandas associadas com o grau de dopagem estão atribuídas à mudanças dos níveis de energia na região do *gap* eletrônico.<sup>35,52</sup> Com o intuito de avaliar quantitativamente o efeito da presença e concentração de DS nas propriedades ópticas dos nanocompósito de PPI, foi estimada a  $E_{gap}$  óptica direta dos filmes (Figura 26), através da aplicação do modelo de Tauc (Equação 1). A espessura dos filmes foi determinada a partir das análises de MEV (Figura 23). A  $E_{gap}$  calculada foi 2,30, 2,13 e 1,76 eV para os filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, respectivamente. Com base nos resultados apresentados, a presença de DS como dopante resulta em uma diminuição da  $E_{gap}$  óptica direta, facilitando dessa forma a transição eletrônica. A presença de DS à matriz do polímero abaixo e acima da CMC diminuem a  $E_{gap}$  em 8 % e 23 %, respectivamente, quando comparado ao filme de PPI-IC-NPAu.

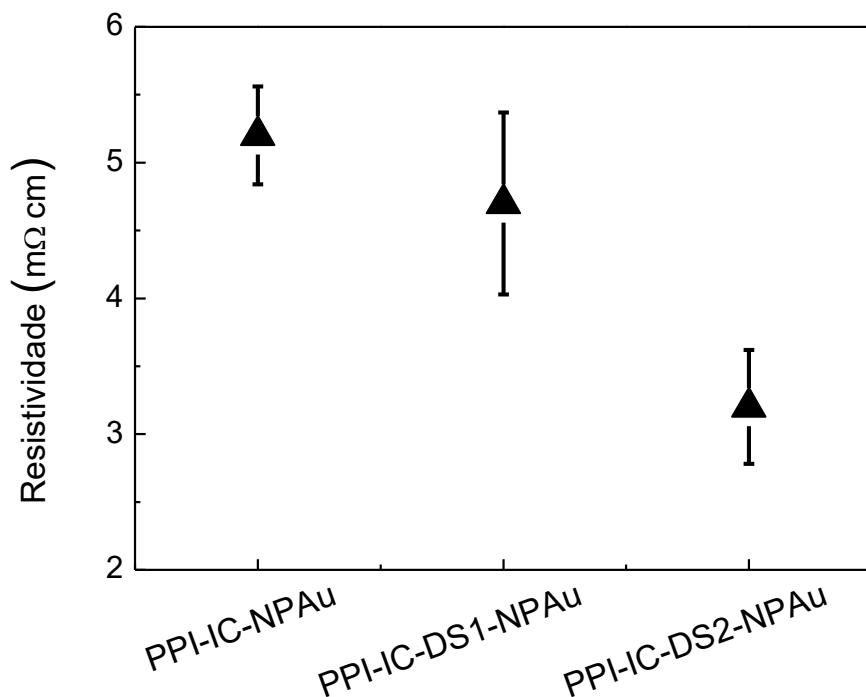
Os resultados observados nas Figura 25 e Figura 26 indicam que a maior parte das transições são menos energéticas para os filmes contendo DS. Esses resultados sugerem que a inserção de DS, assim como a maior concentração final de dopante podem contribuir para um aumento no comprimento da conjugação da cadeia do polímero e da condutividade, como consequência de um maior nível de dopagem.<sup>104,102</sup>



**Figura 26.** Gráficos de  $(\alpha hv)^2$  versus  $hv$  a partir dos espectros UV-Vis dos filmes; a) PPI-IC-NPAu, b) PPI-IC-DS1-NPAu e c) PPI-IC-DS2-NPAu.

#### 4.1.3. Caracterização elétrica

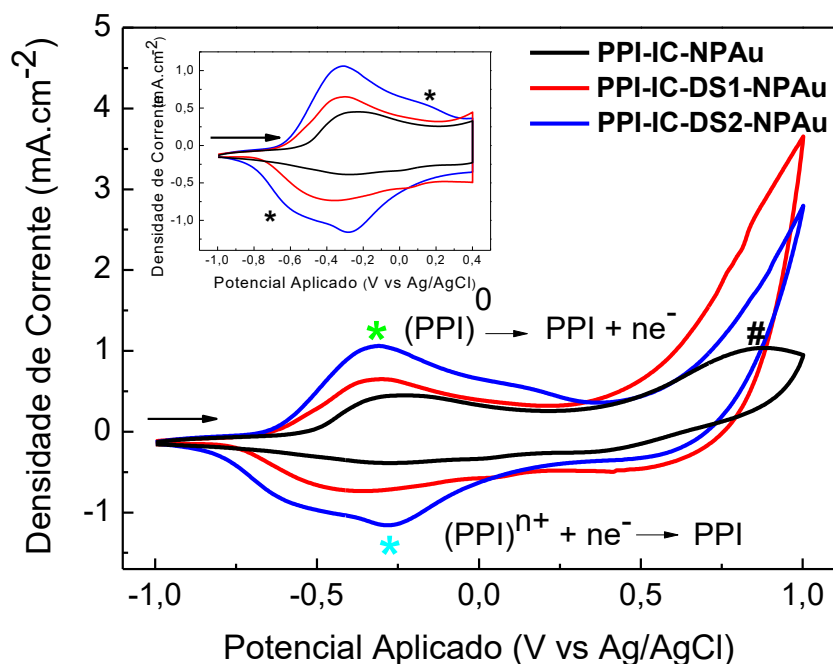
Os valores de resistividade elétrica obtidos para os filmes (Figura 27) foram calculadas de acordo com a Equação 3, e estão consistentes com outros trabalhos reportados. No entanto, apresentam a vantagem de serem obtidos a partir de uma metodologia mais simples.<sup>106,132,133</sup> O filme de PPI-IC-NPAu mostrou-se ligeiramente mais resistivo comparado aos demais nanocompósitos. A presença e o aumento da concentração do dopante DS contribui para o aumento da condutividade do polímero, estando de acordo com os resultados observados na Figura 25 e Figura 26, em que DS nas diferentes concentrações aumenta o nível de oxidação do polímero (nível de dopagem).



**Figura 27.** Resistividade dos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu.

#### 4.1.4. Voltametria cíclica

Na Figura 28 encontram-se os voltamogramas dos filmes de PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu. A partir dos voltamogramas, verifica-se a presença de picos redox bem definidos (indicados com asteriscos, (\* e \*)) atribuídos a oxidação e redução do PPI respectivamente, em solução de KCl, e consequentemente, correspondendo a inserção/extração do cátion e do ânion do eletrólito durante o processo redox. Estes picos redox estão próximos aos valores observados na literatura, em que é visto um pico de potencial catódico ( $E_{pc}$ ) e um pico de potencial anódico ( $E_{pa}$ ) em ca. -0,23 V e -0,44 V para o filme de PPI-IC-NPAu,<sup>21</sup> ca. -0,63 V e -0,25 V para o filme de PPI-DS, e ca. -0,50 V e -0,25 V para o filme de PPI-IC-DS, respectivamente.<sup>16,134</sup> Alguns dos picos de potencial redox aparecem deslocados nos voltamogramas quando comparados aos estudos realizados anteriormente, uma vez que são utilizados diferentes métodos e concentrações de IC, DS e  $HAuCl_4$  durante a síntese, proporcionando um diferente grau de dopagem e ordenamento da cadeia do polímero. Ao resumirmos os parâmetros eletroquímicos extraídos a partir dos voltamogramas na Tabela 2, verificamos, entretanto, que os valores de pico de potencial são próximos a esses descritos acima, indicando a inserção desses dopantes a matriz polimérica.



**Figura 28.** Voltamogramas dos filmes em solução de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. Velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. *Inset*: aproximação do voltamograma na faixa de potencial entre -1,0 e 0,4 V. (*polaron*, n = 1; *bipolaron*, n = 2).

**Tabela 2.** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 28.

Parâmetros	PPI-IC-NPAu	PPI-IC-DS1-NPAu	PPI-IC-DS2-NPAu
E <sub>pa</sub> (V)	-0,23	-0,30	-0,31
I <sub>pa</sub> (mA.cm <sup>-2</sup> )	0,45	0,65	1,06
E <sub>pc</sub> (V)	-0,27	-0,35	-0,28
I <sub>pc</sub> (mA.cm <sup>-2</sup> )	-0,39	-0,73	-1,16
ΔE (V)	0,04	0,05	0,03
I <sub>pa</sub>  / I <sub>pc</sub>	1,15	0,90	0,91
Densidade de carga (mC.cm <sup>-2</sup> )*	13,1	21,6	31,0

\*corresponde à faixa de potencial entre -0,1 e 0,4 V.

O pico adicional irreversível em ca. 0,8 V (#) para o filme de PPI-IC-NPAu pode ser devido a superoxidação do filme PPI, resultando na oxidação da camada de IC adsorvido,<sup>53</sup> e como consequência, o contra-íon aniônico move-se da matriz polimérica em direção ao eletrólito. Isso não ocorre nos filmes de nanocompósito contendo DS porque moléculas anfifílicas ficam imobilizadas à matriz do polímero.<sup>134</sup> A extremidade

apolar do surfactante é compatível com o polímero no estado neutro/reduzido, enquanto que a extremidade polar do surfactante é compatível com o polímero na forma oxidada. Esse comportamento causa a imobilidade do ânion surfactante e, portanto, os movimentos dos íons do eletrólito são preferenciais ao longo da cadeia do polímero.<sup>134,135</sup>

Com a inserção de DS à matriz do polímero, observa-se um aumento na intensidade (valores) das correntes de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) e uma diminuição do potencial de oxidação (deslocando-se para valores mais negativos) quando comparado ao filme de PPI-IC-NPAu (Tabela 2). Isso se deve ao fato de que a presença de DS facilita o transporte de carga, permitindo que os íons  $Cl^-$ , presentes no eletrólito, migrem mais facilmente para o interior da matriz polimérica com a finalidade de estabilizar as cargas geradas durante o processo de oxidação,<sup>40</sup> proporcionando dessa forma a obtenção de filmes de PPI mais eletroativos e condutores.<sup>59,136</sup>

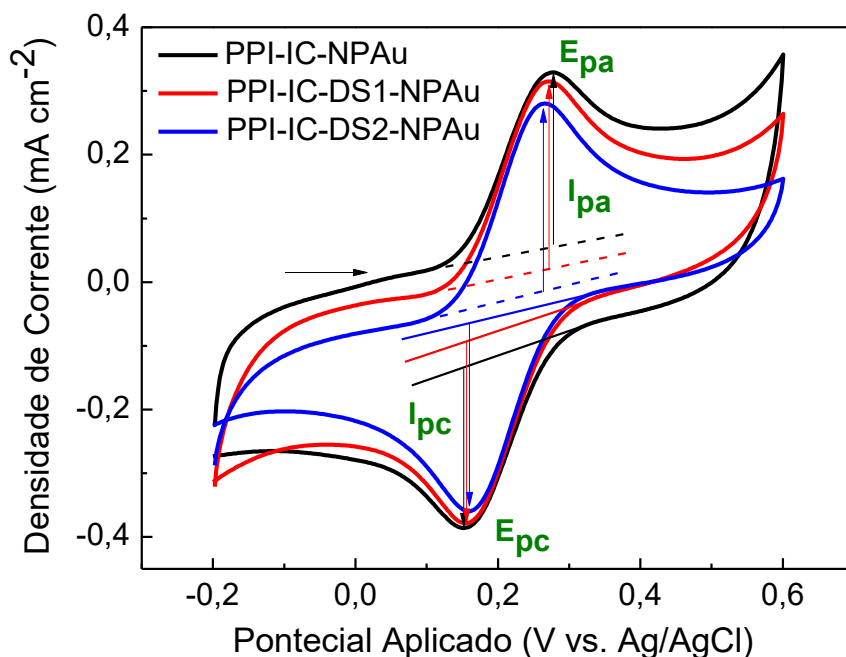
Avaliando a faixa de potencial de interesse nos voltamogramas mostrada no *inset* da Figura 28, o filme de PPI-IC-DS2-NPAu apresentou um maior valor de densidade de carga. Nessa região a densidade de carga está associada à corrente faradaica e capacitiva do PPI. No entanto, é difícil separar as contribuições faradaicas e capacitivas para avaliar a capacitância do eletrodo. O aumento da capacitância em polímeros condutores pode estar relacionado com a formação da dupla camada, envolvendo dois processos: (i) alguns íons profundamente aprisionados seriam liberados apenas a potenciais muito baixos, dando origem à histerese nos voltamogramas; (ii) a maioria dos íons fracamente ligados a superfície do polímero seriam responsáveis pela formação da dupla camada e pelo efeito da capacitância.<sup>134,137</sup>

O aumento da densidade de carga no filme de PPI-IC-DS2-NPAu, que é evidenciado pela maior área entre as curvas de VC, pode ser devido a maior concentração de DS na matriz do polímero, resultando em maiores quantidades de material polarizável, adicionalmente à maior rugosidade, que como consequência, gera um maior acúmulo de carga do eletrólito na superfície do eletrodo, contribuindo para o aumento do comportamento pseudo-capacitivo do polímero.<sup>138</sup>

De acordo com os dados na Tabela 2, ambos os filmes sintetizados com DS apresentam boa reversibilidade. No entanto, avaliando a Figura 28 (*inset*) observa-se que os filmes sintetizados com DS acima da CMC apresentam voltamogramas com um alargamento dos picos redox e o aparecimento de uma “onda” anódica em ca. 0,12 V e catódica em ca. - 0,6 V. Esse comportamento sugere que estes filmes apresentam uma

maior heterogeneidade de tamanho de cadeia, comparado aos filmes sintetizados com DS abaixo da CMC.<sup>139</sup>

Análises de VC utilizando o íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  em solução possibilita avaliar as propriedades de superfície dos eletrodos modificados. Os voltamogramas dos filmes estão apresentados na Figura 29. Os parâmetros extraídos a partir dos voltamogramas estão apresentados na Tabela 3.



**Figura 29.** Voltamogramas correspondentes ao par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  utilizando eletrodos de PPI. Velocidade de varredura de  $10 \text{ mVs}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 29.

Parâmetros	PPI-IC-NPAu	PPI-IC-DS1-NPAu	PPI-IC-DS2-NPAu
$E_{pa}$ (V)	0,28	0,27	0,27
$I_{pa}$ ( $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,26	0,31	0,30
$E_{pc}$ (V)	0,15	0,15	0,16
$I_{pc}$ ( $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,28	-0,29	-0,31
$\Delta E$ (V)	0,13	0,12	0,11
$ I_{pa} / I_{pc} $	0,93	1,07	0,97

Como pode ser observado na Figura 29, os valores de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  foram calculados descontando a corrente residual através de linhas bases traçadas manualmente.<sup>140</sup> De acordo com os dados da Tabela 3 é possível observar que a razão entre as  $I_p$  é ca. 1 para

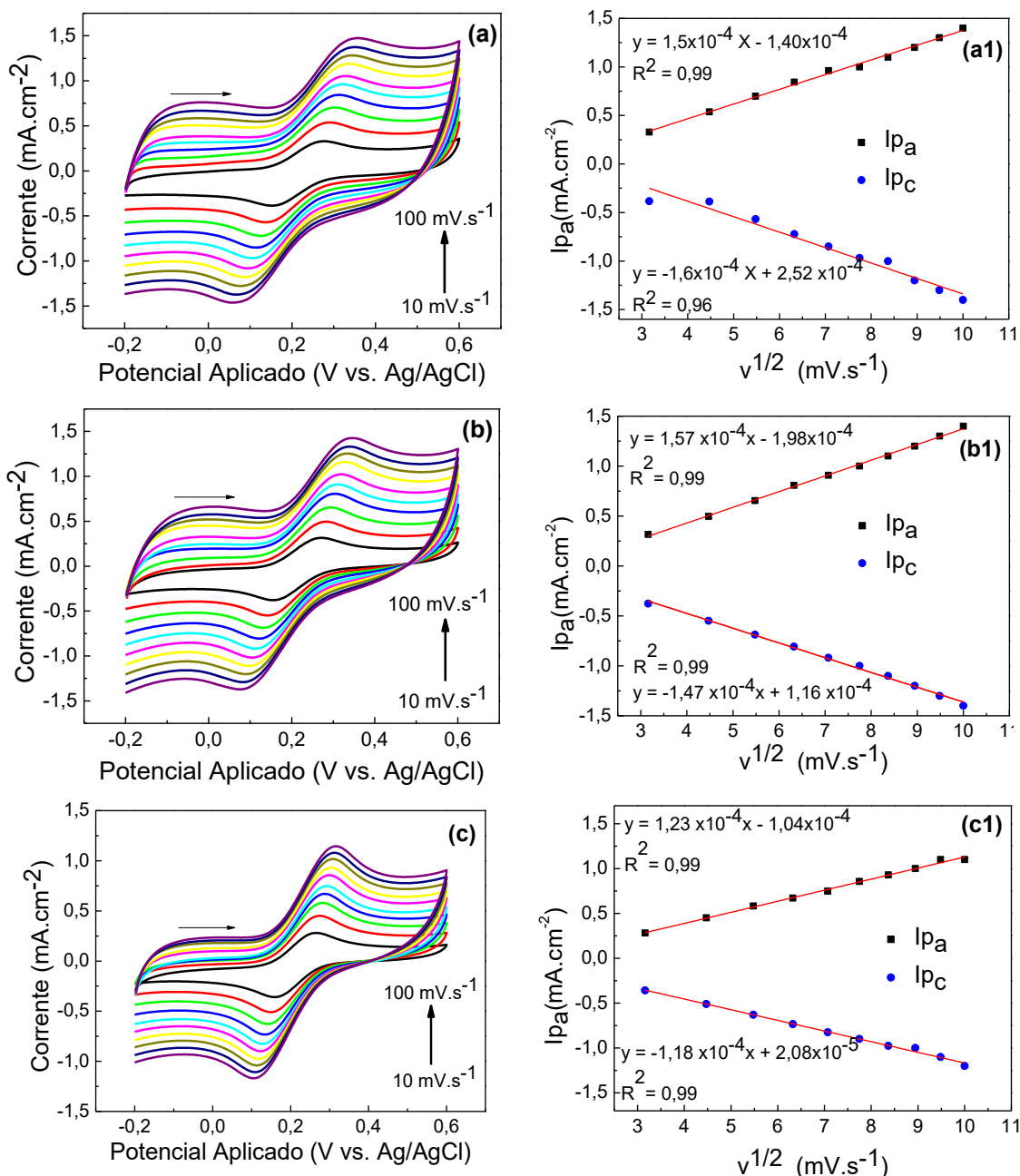
todos os filmes, no entanto, os valores das correntes de pico ( $I_p$ ) são semelhantes e a  $\Delta E$  são ligeiramente menores para os filmes contendo DS na matriz do polímero, indicando que a presença de DS pode facilitar a transferência e a difusão dos elétrons, que consequentemente aumenta a concentração de elétrons próximo do eletrodo, como observado na Figura 28.<sup>141,142</sup>

De acordo com equação de Nernst, sistemas reversíveis em que a cinética de transferência eletrônica interfacial é rápida, a diferença de potencial entre o pico anódico e catódico ( $\Delta E$ ) deve ser aproximadamente igual a  $0,059 \text{ V/n}$  e a razão entre as correntes de pico  $|I_{pa}| / |I_{pc}|$  deve ser igual a 1.<sup>143</sup> Sendo assim, esses eletrodos apresentam características típicas de sistemas *quasi*-reversível em que em que a  $\Delta E > 59 \text{ mV}$ . O comportamento *quasi*-reversível indica que a reação envolvida acontece mais lentamente em uma direção do que em outra. Nesse processo, a corrente tende a ser controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela transferência de carga.<sup>144</sup>

A variação da corrente de pico com a velocidade de varredura fornece mais informações além da reversibilidade do processo. A Figura 30 mostra a dependência dos picos anódicos e catódicos em função da velocidade de varredura e os gráficos de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Quando a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura e o coeficiente linear é próximo de zero,<sup>140</sup> como observado na Figura 30a1, b1 e c1, o mecanismo controlador é o processo difusional que ocorre nos limites da região eletródica, o qual depende da taxa de difusão do analito até o sítio ativo do eletrodo.<sup>145</sup>

Para processos *quasi*-reversíveis controlados por difusão, é possível utilizar a equação de Randles-Sevic (Equação 4) para estimar a área superficial eletroativa. A área superficial eletroativa dos eletrodos estimada foi  $0,70 \text{ cm}^2$  para PPI-IC-NPAu,  $0,83 \text{ cm}^2$  para PPI-IC-DS1-NPAu e  $0,81 \text{ cm}^2$  para PPI-IC-DS2-NPAu. Não houve mudanças significativas entre os eletrodos de PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu. No entanto, pode-se sugerir que a presença de DS a matriz do polímero pode facilitar a difusão das espécies do analito em direção a matriz do polímero devido ao aumento da condutividade e por proporcionar uma maior área superficial eletroativa.



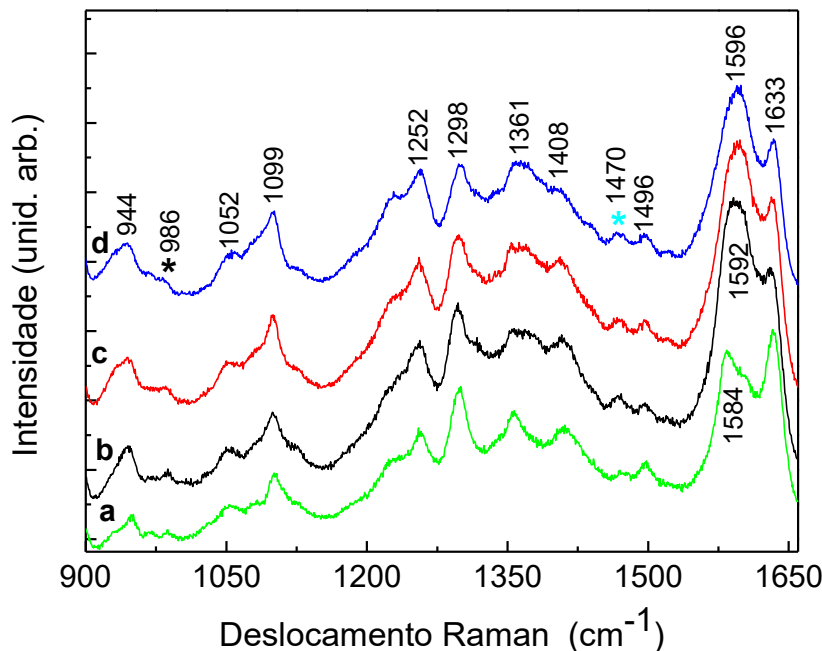


**Figura 30.** Voltamogramas correspondentes ao par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em diferentes velocidades de varredura (a, b, c). Gráficos de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  (a1, b1, c1). (a - a1) PPI-IC-NPAu, (b - b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c - c1) PPI-IC-DS2-NPAu.

#### 4.1.5. Caracterização Estrutural

O "estado de conjugação" associado à extensão do rearranjo de elétrons dá origem a bandas características no espectro Raman. A partir de análises de Raman é possível obter informações sobre o nível de dopagem, estrutura molecular e sobre a distribuição de carga no polímero. As atribuições das bandas indicadas na Figura 31 são correspondentes aos modos vibracionais característicos do estado oxidado e reduzido

dos filmes de PPI-IC, PPI-IC-NPAu, PPI-IC-DS1-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, e estão descritos na Tabela 4. O filme de PPI-IC foi sintetizado e caracterizado sob as mesmas condições dos demais filmes para fins de comparação, uma vez que ainda não há reportado na literatura análises de Raman para este filme.



**Figura 31.** Espectros Raman dos filmes de PPI. a) PPI-IC, b) PPI-IC-NPAu, c) PPI-IC-DS1-NPAu e d) PPI-IC-DS2-NPAu.

Correlacionando a razão entre as áreas de algumas bandas vibracionais descritas na Tabela 4 é possível extrair informações sobre o nível de oxidação dos filmes de PPI. A banda vibracional em ca.  $944\text{ cm}^{-1}$  está associada à forma quinóide do anel pirrólico, estado oxidado (*polaron-bipolaron*), enquanto que a banda em ca.  $986\text{ cm}^{-1}$  está associada com o anel benzóico (estado neutro). Ao mesmo tempo, a banda em  $1099\text{ cm}^{-1}$  está atribuída ao estado de oxidação (*bipolaron*) e em  $1052\text{ cm}^{-1}$  ao estado de oxidação (*polaron*). O aumento da razão entre as áreas das bandas em  $(A_{944}/A_{986})$  e  $(A_{1099}/A_{1052})$  indicam um aumento do grau de protonação do polímero.<sup>149,146</sup> Qualitativamente o comprimento da conjugação do polímero pode ser avaliado através da razão entre as áreas das bandas em  $(A_{1590}/A_{1498})$ , uma vez que a banda em ca.  $1590\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estado oxidado e a banda em  $1498\text{ cm}^{-1}$  está associada ao esqueleto da cadeia do polímero.<sup>150,151</sup> As razões entre as áreas dessas bandas que são as mais comumente discutidas na literatura estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 4.** Atribuição dos modos de vibraçõais correspondente aos espectros dos filmes de PPI.

<b>Bandas</b>		
<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>apresentadas na literatura (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição das bandas (v)</b>
1633	1610 - 1630	Mistura de vibrações C=C e C-C inter-anel de cadeia de curto comprimento de conjugação(estado oxidado/dicátion) <sup>147,148</sup>
1584-1596	1585-1610	Mistura de vibrações C=C e C-C inter-anel (estado oxidado/cátion) <sup>148,149</sup>
1496	1498	Banda referente ao esqueleto (cadeia) do PPI. <sup>150,151</sup>
1470	1473	Deformações do anel aromático atribuído ao IC. <sup>18</sup>
1408	1400	Deformação C=N no plano <sup>152</sup>
1361	1360	Vibrações de estiramento C-C do anel <sup>153</sup>
1298	1298 - 1310	Deformações C-H e C-N no plano do anel aromático <sup>154</sup>
1252 e 1099	1253 e 1070 - 1102	Deformações C-H no plano do anel aromático (estado oxidado/dicátion) <sup>147,149</sup>
1052	1051	Deformações de C-H no plano (estado oxidado/cátion) <sup>148,151</sup>
986	980 - 990	Deformação do anel associada ao (estado reduzido). <sup>147</sup>
944	940	Deformação do anel associada ao (estado oxidado/cátion - dicátion). <sup>147,150,152</sup>

A partir dos valores mostrados na Tabela 5, é possível observar que a presença de NPAu à matriz do PPI-IC contribui para um aumento do comprimento de conjugação e do nível de oxidação do polímero, bem como sugerido em trabalhos anteriores.<sup>21</sup> No entanto, o aumento da razão entre as bandas é mais pronunciado para os filmes contendo DS à matriz do polímero, sendo maior para o nanocompósito contendo DS acima da CMC. Isso significa que a polarizabilidade do sistema é maior para o filme de

PPI-IC-DS2-NPAu. Em outras palavras, o comprimento da conjugação da cadeia do polímero aumenta com a concentração de DS.<sup>150</sup> Avaliando a relação entre as bandas associadas as estruturas *bipolaron*, *polaron* e neutras, os resultados corroboram com afirmações feitas na Figura 25 e Figura 26 (análises ópticas de absorção no UV-Vis), indicando que a presença de DS contribui para um aumento do nível de dopagem, e conseqüentemente um aumento da proporção de estruturas *bipolarons* na cadeia do polímero que induzem à um aumento na condutividade, como observado na Figura 27.

**Tabela 5.** Variação da razão da área entre as bandas do espectro Raman.<sup>147,149,150</sup>

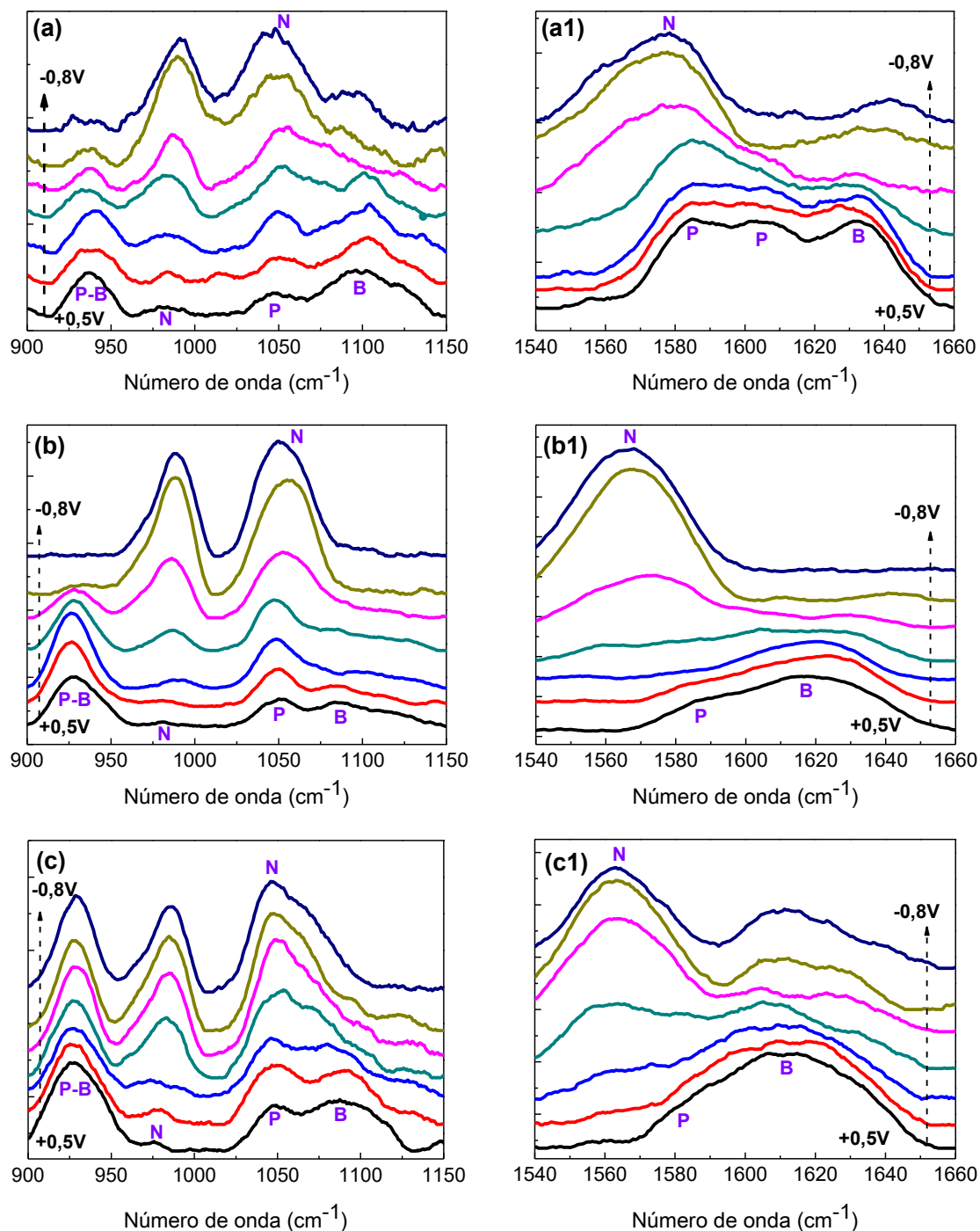
Filmes	a- $A_{944}/A_{986}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	b- $A_{1099}/A_{1052}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	c - $A_{1590}/A_{1498}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
PPI-IC	1,49	1,57	4,23
PPI-IC-NPAu	1,54	1,59	4,96
PPI-IC-DS1-NPAu	1,66	1,66	4,90
PPI-IC-DS2-NPAu	1,92	1,75	5,34

a - (cation/neutro); b - (bipolaron/cation); c - (oxidado/conjugação da cadeia).

O comportamento dos filmes de PPI durante o processo redox foi avaliado por análises de espectroscopia Raman *in situ*, aplicando potenciais entre + 0,5 e - 0,8V (Figura 32(a, b, c) e Figura 32(a1, b1, c1)), correspondendo aos espectros na região entre 900 e 1150  $\text{cm}^{-1}$  e região entre 1540 e 1660  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. As bandas vibracionais correspondentes ao estado *polaron*, *bipolaron* e neutro estão indicadas nos espectros pelas letras P, B e N, respectivamente.

Inicialmente quando o polímero é oxidado em + 0,5 V os elétrons são removidos da cadeia levando a uma deformação do arranjo, seguido pela difusão do ânion do eletrólito a fim de estabilizar as cargas geradas. A deformação do arranjo resulta na perda de planaridade das cadeias causando mudanças na força das ligações e ângulos de torção, que afetam as vibrações C=C e C-C inter-anel e o modo de deformação do anel.<sup>41</sup> Avaliando a região dos espectros entre 900 e 1150  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 32(a, b, c)) é possível verificar que a banda em ca. 986  $\text{cm}^{-1}$  (N) apresenta menor intensidade comparada as bandas vibracionais correspondentes aos estados oxidados *polarons* e *bipolarons* (P-B, P, B). De acordo com Santos e cols.,<sup>147</sup> à medida que o polímero é reduzido ocorre uma diminuição da intensidade da banda em ca. 944  $\text{cm}^{-1}$  (P-B) e um aumento na intensidade da banda N. O mesmo comportamento foi verificado por Liu<sup>149</sup>

e Vargas<sup>146</sup> para as bandas em ca. 1052 cm<sup>-1</sup> (P) e em 1099 cm<sup>-1</sup> (B). O aumento da intensidade e deslocamento da banda em 1052 cm<sup>-1</sup> para menor frequência em ca. 1044 cm<sup>-1</sup> é caracterizado como o estado reduzido do polímero.<sup>147</sup> Essas observações estão de acordo com os espectros apresentados na Figura 32, mostrando o comportamento característico de filmes de PPI.



**Figura 32.** Espectros Raman obtidos *in situ* com aplicação de potencial. (a-a1) PPI-IC-NPAu; (b-b1) PPI-IC-DS1-NPAu e (c-c1) PPI-IC-DS2-NPAu.

Observo que para os espectros dos filmes de PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu, as bandas vibracionais atribuídas às formas oxidada e reduzida do PPI coexistem para toda a faixa de potencial aplicada, enquanto que o filme de PPI-IC-DS1-NPAu encontra-se praticamente no seu estado totalmente reduzido em - 0,6 V. A coexistência dessas bandas quando o filme é condicionado ao seu estado de redução pode ser devido à presença de defeitos e do aumento da rigidez das cadeias do polímero atribuídos a reconfiguração estrutural das cadeias quando o polímero é estimulado eletroquimicamente, causando baixa mobilidade do íon dopante. Nesses casos, a taxa de redução nestes potenciais é muito baixa e apenas em potenciais muito mais negativos a inserção dos cátions do eletrólito podem ocorrer mais facilmente.<sup>41,136,155</sup>

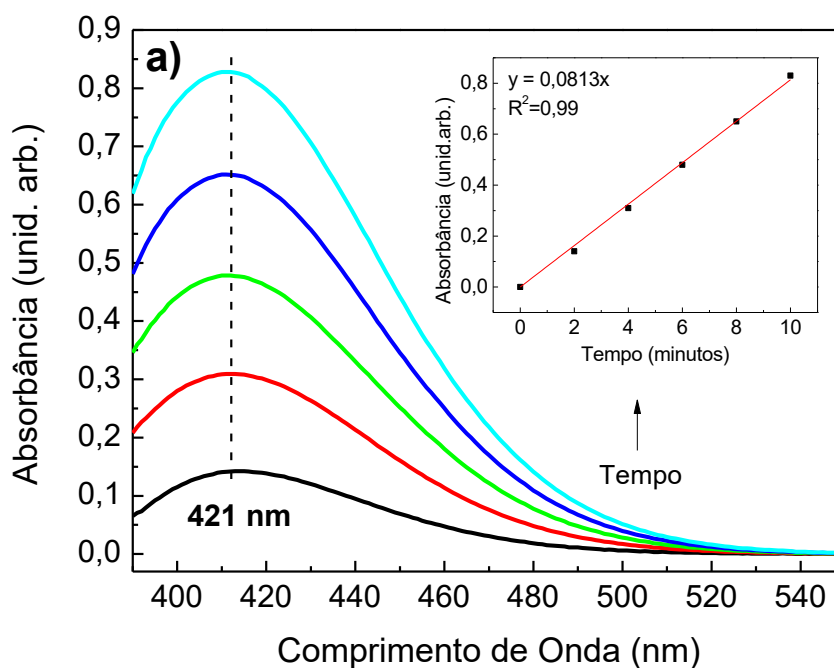
Olhando para os espectros na região entre 1540 e 1660  $\text{cm}^{-1}$  fica mais evidente a transição entre o estado mais oxidado (*bipolaron*) e o estado reduzido. À medida que o polímero é reduzido ocorre uma diminuição da intensidade da banda em ca. 1633  $\text{cm}^{-1}$  (B) e ocorre um aumento na intensidade e deslocamento da banda em ca. 1580  $\text{cm}^{-1}$  (P) para menor frequência em ca. 1560  $\text{cm}^{-1}$ , que é correspondente as espécies neutras, estado reduzido do polímero.<sup>156</sup> O mesmo comportamento é observado para essa região do espectro, indicando que para os filmes de PPI-IC-NPAu e PPI-IC-DS2-NPAu ocorrem processos redox incompletos nessa faixa de potencial. Entretanto, observa-se que o filme de PPI-IC-DS2-NPAu é oxidado mais facilmente, pois aplicando o potencial de + 0,5 V ocorre a formação do estado *bipolaron* em maior proporção comparado ao estado *polaron*, o que facilita a transferência de elétrons no estado condutor do PPI.

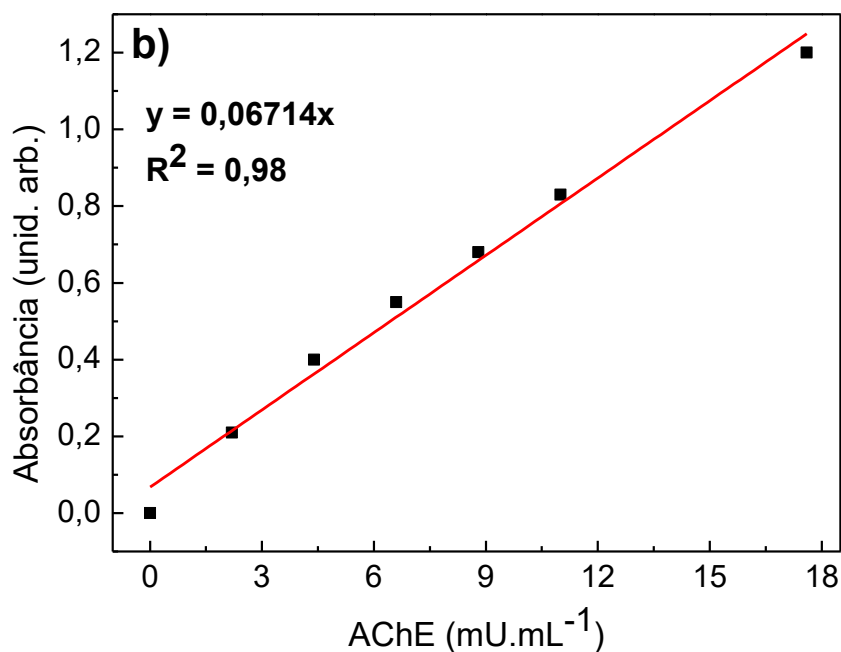
Dessa forma, verifica-se a partir das análises espectroeletróquímicas Raman *in situ* que a presença de DS na matriz polimérica do PPI aumenta o nível de dopagem, mais significativo para o filme contendo DS acima da CMC, corroborando com os demais resultados mostrados nas seções anteriores. No entanto, a presença de DS abaixo da CMC demonstra indícios que pode proporcionar um maior ordenamento ou uma melhor homogeneidade de tamanho de cadeia, facilitando a mobilidade dos íons dopantes e dos íons provenientes do eletrólito durante os processos redox, pois em uma pequena faixa de potencial aplicada, o polímero encontra-se no seu estado oxidado e totalmente reduzido. Esses resultados corroboram com a discussão da Figura 28.

## 4.2. Aplicação dos filmes (eletrodos) de nanocompósito como biossensores de AChE para detecção do pesticida carbaril

### 4.2.1. Análise da atividade da enzima AChE em solução

A enzima AChE foi estudada em solução com o intuito de verificar sua atividade antes da construção do biossensor. Através das Figura 33a e b, é possível observar a cinética de conversão do substrato ATCL em tiocolina pela ação da enzima AChE. A Figura 33a mostra os espectros UV-Vis correspondente a atividade da AChE ( $11 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em função do tempo a temperatura ambiente. Os espectros foram coletados a cada 2 minutos. A formação do produto tiocolina (reação apresentada na Figura 20) é evidenciada pela presença e aumento progressivo da intensidade da banda de absorção em 412 nm, indicando a formação de TNB, sendo possível observar um aumento linear da intensidade em função tempo (*inset*). A reação enzimática em função da concentração de AChE em solução é apresentada na Figura 33b. Os valores de absorbância foram coletados a cada 10 minutos. Como esperado, a velocidade de reação aumenta linearmente com o aumento da concentração de AChE em solução, evidenciando a atividade da enzima e demonstrando que a reação ocorre de forma suficientemente rápida nas condições estabelecidas. Adicionalmente, a concentração de  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ATCL utilizada não é o fator limitante da velocidade da reação enzimática, uma vez que não inibe a hidrólise.<sup>96,111</sup>





**Figura 33.** a) Espectros de absorção UV-Vis correspondente a hidrólise enzimática. *Inset*: intensidade de absorção em 412 nm em função do tempo. b) Hidrólise enzimática em função da concentração de AChE.

#### 4.2.2. Análise eletroquímica para a determinação do biossensor de trabalho

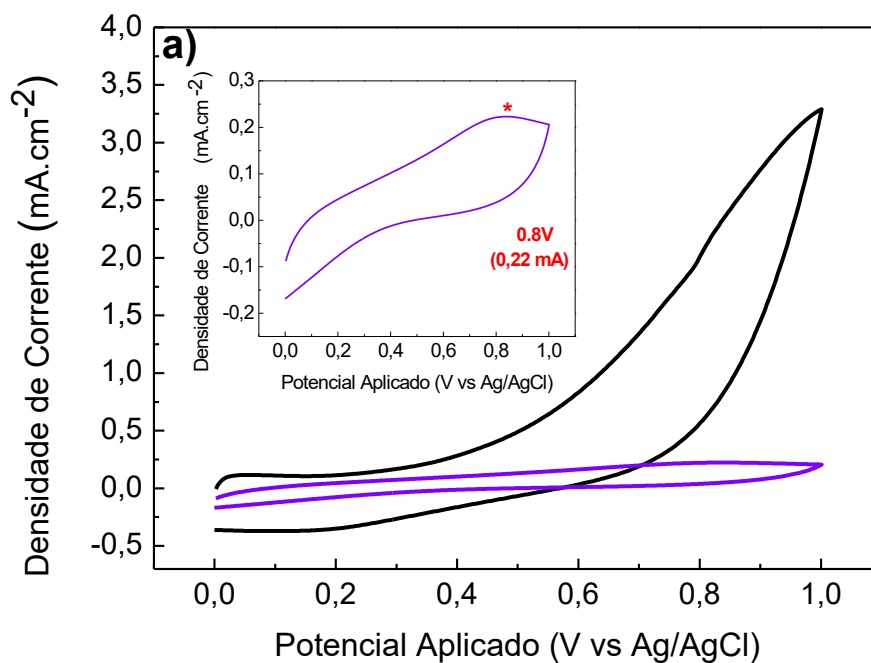
Para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico amperométrico é essencial a definição do potencial de trabalho. Com o intuito de definir o potencial correspondente à oxidação da tiocolina e o biossensor a ser utilizado para a detecção do pesticida carbaril, foram realizadas análises de VC para os biossensores de Pt-PPI-IC-NPAu-AChE, Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE e Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE na presença e ausência do substrato ATCL.

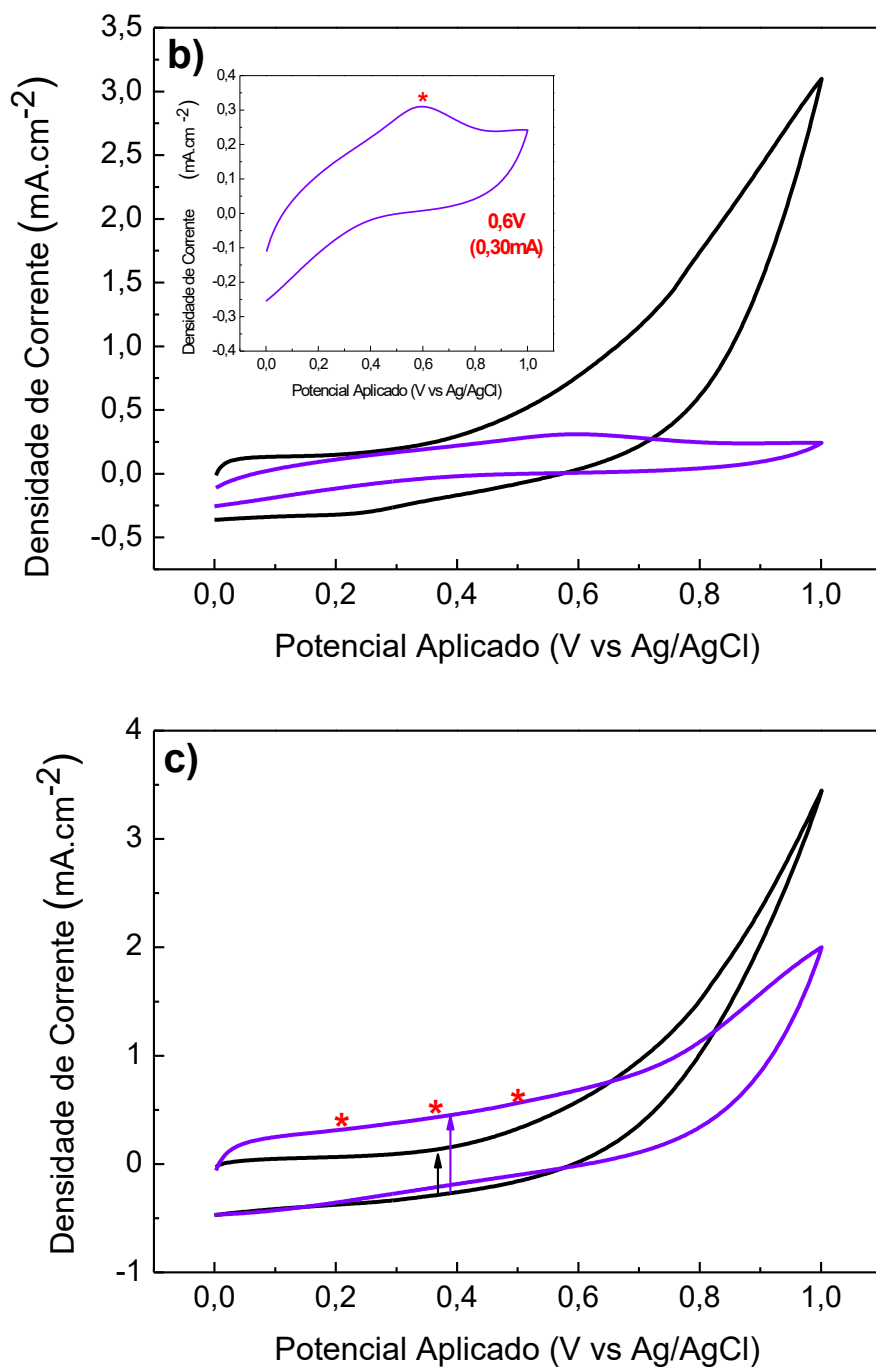
A concentração do ATCL foi determinada de acordo com trabalhos descritos na literatura,<sup>95,98</sup> e a partir dos resultados observados na seção 4.2.1. A oxidação da tiocolina é dada a partir da hidrólise do ATCL, que é catalisada pela enzima AChE imobilizada sobre o eletrodo.<sup>116</sup> Através dos voltamogramas apresentados na Figura 34 é possível observar que não ocorrem mudanças significativas entre os biossensores na ausência de ATCL (voltamogramas em preto). Entretanto, observa-se claramente respostas distintas em relação a oxidação da tiocolina (voltamogramas em roxo). Comparando os biossensores de Pt-PPI-IC-NPAu-AChE e Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE (Figura 34a e b) é possível observar a formação de um pico de oxidação irreversível em ca. + 0,8 V e + 0,6 V, respectivamente, atribuído a oxidação da tiocolina, como já



observado em outros trabalhos na literatura.<sup>10,157</sup> O aumento da corrente do pico, juntamente com o menor potencial de oxidação para o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE, indica que uma maior quantidade de enzima ativa foi imobilizada.<sup>158</sup> Isso facilita a difusão do analito e proporciona uma melhor atividade eletrocatalítica, que pode estar relacionada também com a maior condutividade do eletrodo quando comparado ao eletrodo de Pt-PPI-IC-NPAu-AChE.

Para o biossensor de Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE (Figura 34c), na presença de ATCL (voltamograma roxo) observa-se um aumento na corrente e na capacitância do biossensor. Essa resposta pode ser atribuída a um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo devido à oxidação da tiocolina e da interferência de outras espécies eletroativas na superfície através da oxidação do substrato ATCL.<sup>159</sup> Porém, não foi observado nenhum pico de oxidação.





**Figura 34.** Voltamogramas dos eletrodos na presença (roxos) e ausência (pretos) de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATCL. a) Pt-PPI-IC-NPAu-AChE, b) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE e c) Pt-PPI-IC-DS2-NPAu-AChE.

A diferença de comportamento dos filmes na presença de ATCL pode estar associada com a diferença de rugosidade e hidrofobicidade da superfície (Figura 21 e Figura 24). O maior caráter hidrofóbico do eletrodo de Pt-PPI-IC-DS2-NPAu pode dificultar a imobilização da enzima AChE, impossibilitando a migração do ATCL até o

sítio ativo da enzima. As enzimas eventualmente imobilizadas podem sofrer mudanças na sua conformação, bloqueando seus sítios ativos, dificultando assim a transferência de carga para promover a oxidação da tiocolina, mas permitindo um acúmulo de carga na superfície do eletrodo. Por outro lado, o fato da superfície do filme de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE ser mais hidrofílica, como resultado de uma menor concentração de DS, permite uma melhor adsorção da enzima, que pode ocorrer através de interações entre os grupos carboxila da enzima e grupos amino presente na cadeia do polímero.

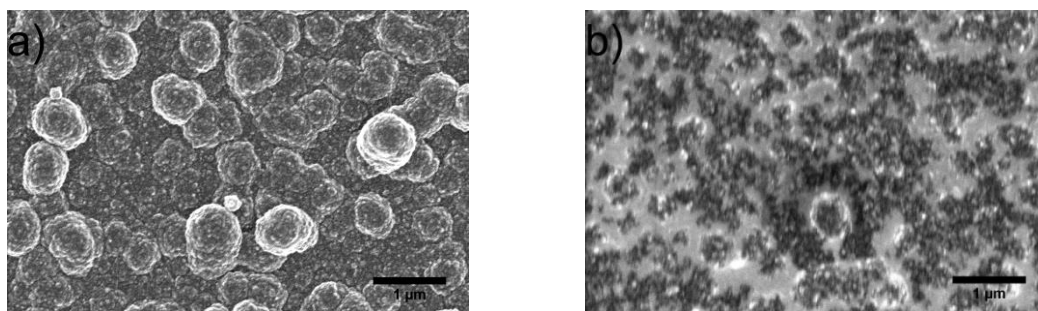
Com base nestes resultados, o eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu foi escolhido para ser aplicado como biossensor, uma vez que detectou um maior valor de corrente de pico mensurável e menor potencial para oxidação da tiocolina. Além disso, este eletrodo (PPI-IC-DS1-NPAu) alcança maiores níveis de oxidação (estados polaron/bipolaron) no potencial de oxidação da enzima AChE, quando comparado ao filme de PPI-IC-NPAu (Figura 32), o que pode também contribuir para a transferência de carga e melhora significativa da catálise de transferência de elétrons do biossensor.<sup>160</sup>

É importante destacar que os biossensores que apresentam menores valores de potencial para detecção da oxidação da tiocolina são preferidos, uma vez que se busca evitar interferências com outras espécies eletroativas em matrizes biológicas, como por exemplo, glicose, ácido úrico, entre outras.<sup>123</sup>

#### 4.2.3. Análises de caracterização do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE

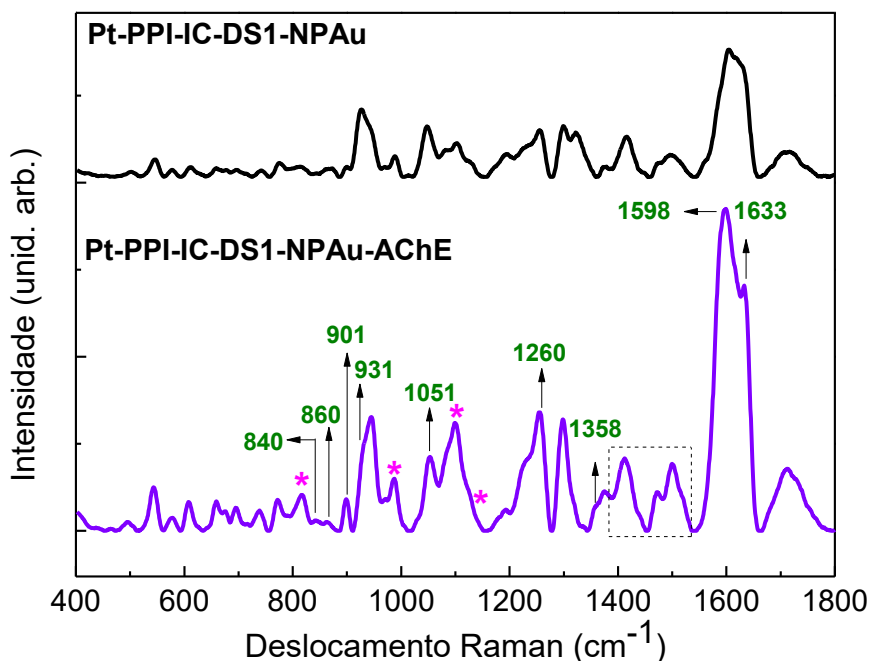
Para verificar a presença, conformação, área superficial eletroativa e estimar a concentração de espécies ativa da enzima AChE imobilizada, foram realizadas análises de MEV, espectroscopia Raman e VC.

A morfologia dos eletrodos de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE, caracterizada por MEV está apresentada na Figura 35. Observe que a imagem na Figura 35a mostra a presença de grânulos maiores com distribuição não homogênea comparado à imagem de MEV apresentada na Figura 21b. Essa diferença na morfologia está atribuída ao diferente crescimento do polímero devido a modificação da superfície do eletrodo de ITO com filme de platina para construção dos biossensores, como descrito na seção 3.3.2. Comparando as Figura 35a e b, podemos sugerir que as moléculas de AChE foram imobilizadas com sucesso sobre a superfície do eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu, uma vez que se observa mudanças significativas na morfologia superficial após a imobilização da enzima AChE.<sup>126,161</sup>



**Figura 35.** Imagens de MEV dos eletrodos, a) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e b) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.

Análises de espectroscopia Raman foram realizadas para estudar a conformação da enzima AChE e suas interações com o polímero. De acordo com as análises, é possível observar as bandas vibracionais correspondentes às estruturas secundárias e aos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, que são essenciais para a sua atividade catalítica.<sup>162</sup>



**Figura 36.** Espectros Raman para os eletrodos de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.

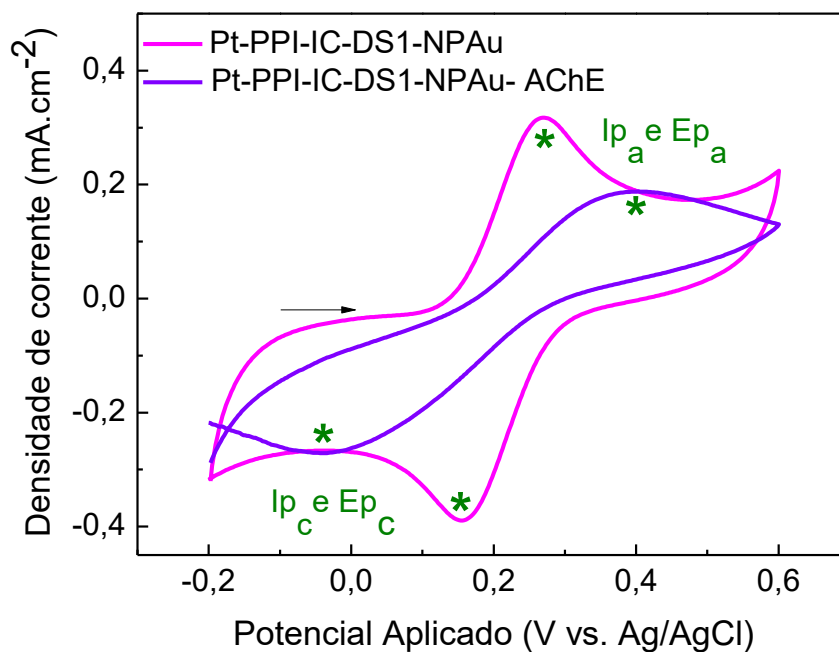
A imobilização da AChE pode ser evidenciada através da presença das bandas em ca.  $1633\text{ cm}^{-1}$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$  atribuídas às estruturas secundárias, amina I e amina II, provenientes da enzima AChE.<sup>163</sup> Essas bandas estão presentes devido ao estiramento da ligação C=O das ligações peptídicas, que são moduladas pelas estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélice e lâmina -  $\beta$  pregueada).<sup>162</sup> As bandas correspondentes aos resíduos de

aminoácidos dos anéis aromáticos da tirosina aparecem em  $840\text{ cm}^{-1}$  e  $860\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que do triptofano é caracterizado pela presença de um ombro em ca. de  $1360\text{ cm}^{-1}$ .<sup>163</sup> Bandas na região entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  (indicadas com asteriscos no espectro Raman) são atribuídas as vibrações das cadeias laterais alifáticas da enzima AChE devido aos estiramentos das ligações C-C e C-N. As bandas em  $901\text{ cm}^{-1}$  e  $1051\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas com a presença de alanina e  $931\text{ cm}^{-1}$  com a presença de lisina, ácido glutâmico e serina.<sup>162</sup> As bandas na região do espectro Raman entre  $1400$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  correspondem a deformação dos estiramentos de metileno.<sup>164</sup> Dessa forma, estes resultados claramente demonstram que ocorreu a imobilização da enzima AChE sobre o eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu.

De acordo com a literatura, a razão entre as intensidades de algumas bandas pode sugerir a disponibilidade ou bloqueio dos sítios ativos da enzima sobre a superfície do eletrodo. A presença dos resíduos de aminoácidos, como tirosina e triptofano no sítio ativo da enzima foram demonstrados através de diferentes estudos, sendo assim é importante avaliar suas disponibilidades após a imobilização da enzima AChE.<sup>165</sup> A disponibilidade dos resíduos de tirosina pode ser determinada pela razão da intensidade das bandas próximas a  $858\text{ cm}^{-1}$  e  $838\text{ cm}^{-1}$ , onde a proporção deve ser entre 0,9 e 1,2. Através do espectro Raman, a razão entre as intensidades das bandas para tirosina ( $I_{860}/I_{840}$ ) é 0,9, indicando que a maioria dos resíduos de tirosina estão expostos na superfície da enzima através de ligações de H moderadas.<sup>162,163</sup> A banda correspondente ao resíduo de triptofano em  $1356\text{ cm}^{-1}$  aparece intensa quando o sítio ativo está bloqueado e sua intensidade diminui quando o sítio ativo está exposto,<sup>162</sup> como pode ser observado na Figura 36. A disponibilidade dos resíduos de triptofano pode ser avaliado através da razão entre as intensidades das bandas em  $1356\text{ cm}^{-1}$  e a banda correspondente ao PPI em  $1598\text{ cm}^{-1}$ . A razão entre ( $I_{1356}/I_{1598}$ ) é 0,07, que é ca. 82% menor comparado a outro biossensor de nanocompósito de polipirrol.<sup>166</sup> Este resultado sugere uma excelente disponibilidade dos sítios ativos da enzima AChE imobilizada na superfície do eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu.

Foi realizada a análise de VC em solução contendo o íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  utilizando como eletrodo de trabalho Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE, com o intuito de estimar a área superficial eletroativa e a concentração de enzima AChE ativa na superfície do eletrodo.<sup>167,168</sup> Observa-se na Figura 37, a presença de um par redox bem definido para o eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu, assim como observado na Figura 29. Entretanto, ocorrem mudanças notáveis nos valores de  $I_p$  e  $\Delta E$  na presença da

enzima AChE. A medição da corrente de pico em alguns casos pode ser complicada, devido à dificuldade em determinar a “linha base” adequada para definir a magnitude do pico,<sup>169</sup> como por exemplo, para o biossensor. Sendo assim, os valores da  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  correspondem ao  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ . Os parâmetros extraídos a partir dos voltamogramas estão apresentados na Tabela 6.



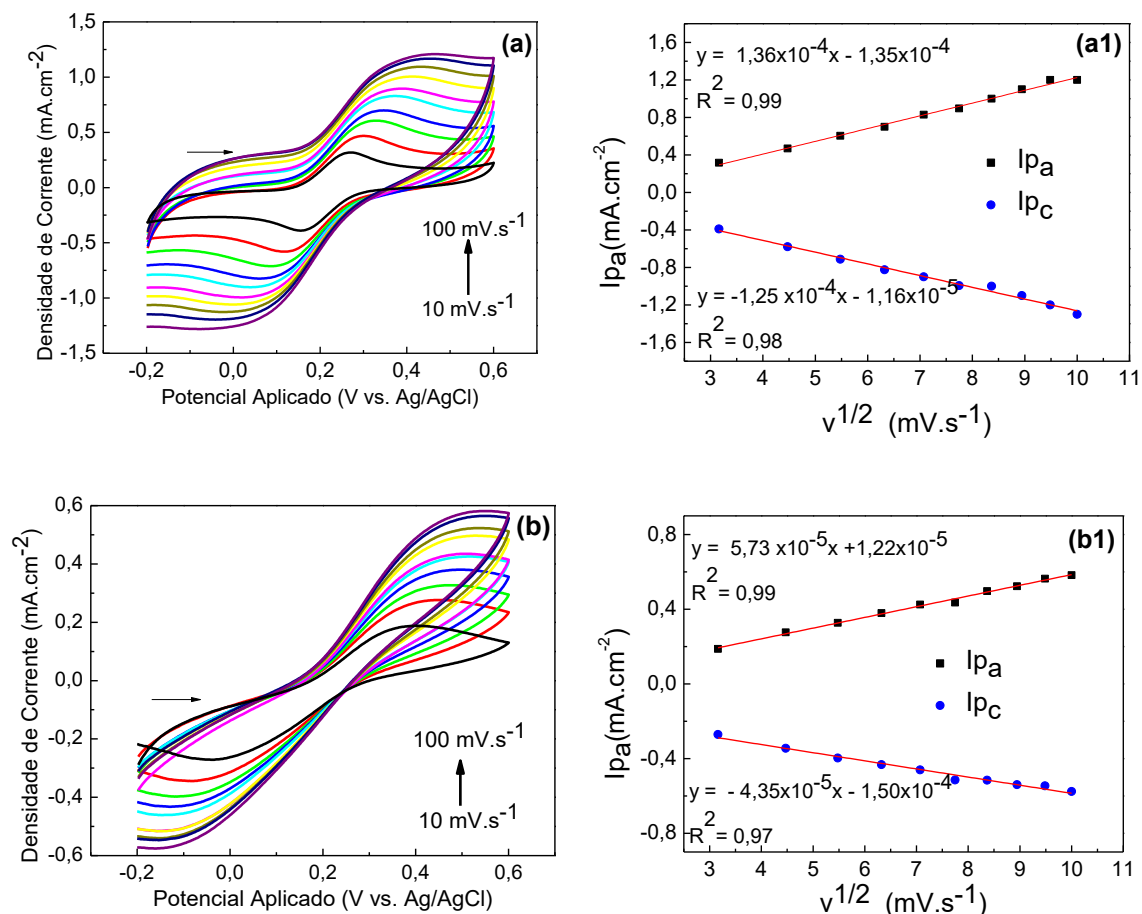
**Figura 37.** Voltamogramas correspondentes ao par redox  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ . Velocidade de varredura de  $10 \text{ mV.s}^{-1}$ .

**Tabela 6.** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 37.

Parâmetros	Pt-PPI-IC-DS1- NPAu	Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE
$E_{pa}$ (V)	0,27	0,40
$I_{pa}$ ( $\text{mA.cm}^{-2}$ )	0,32	0,19
$E_{pc}$ (V)	0,15	-0,04
$I_{pc}$ ( $\text{mA.cm}^{-2}$ )	-0,39	-0,27
$\Delta E$ (mV)	120	440
$ I_{pa} / I_{pc} $	0,82	0,70

As mudanças observadas nos voltamogramas e nos valores dos parâmetros, descritos na Tabela 6 para o eletrodo contendo a enzima AChE, estão de acordo com o esperado, uma vez que a enzima AChE é isolante e com isso aumenta a resistência a transferência e difusão dos elétrons, sendo mais um indicio que a enzima foi

imobilizada sobre a superfície do polímero com sucesso.<sup>170</sup> Para estimar a área superficial eletroativa dos eletrodos, foram realizadas análises de VC em diferentes velocidades de varredura. A Figura 38 mostra a dependência dos picos anódicos e catódicos em função da velocidade de varredura e os gráficos de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial.



**Figura 38.** Voltamogramas correspondentes ao par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em diferentes velocidades de varredura (a e b). Gráficos de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  (a1 e b1). (a - a1) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e (b - b1) Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.

A partir dos resultados observados na Tabela 6 e na Figura 38, os eletrodos apresentam características de sistemas *quasi-reversíveis* controlados por difusão. Com isso, é possível aplicar a equação de Randles-Sevick (Equação 4) para estimar a área superficial eletroativa. Para o cálculo, foram utilizados os valores de  $I_{pa}$  (Figura 37). A área superficial eletroativa dos eletrodos estimada foi 0,86 cm<sup>2</sup> para Pt-PPI-IC-DS1-NPAu e 0,51 cm<sup>2</sup> para Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE.

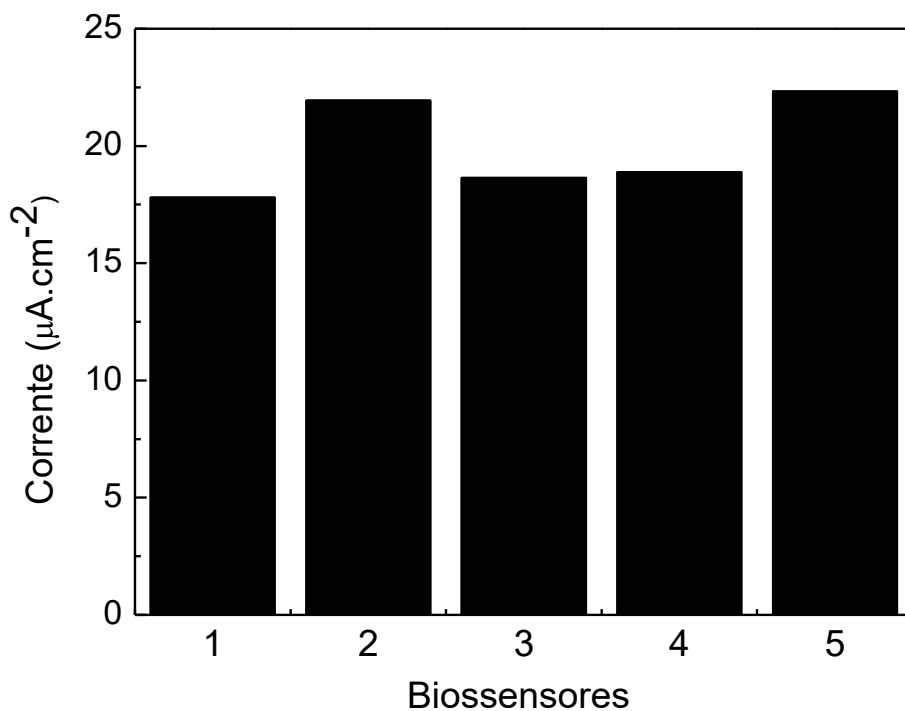
Para processos controlados por difusão, sabendo a área superficial eletroativa dos eletrodos, pode-se obter uma estimativa da concentração de espécies ativas recobrando a superfície do eletrodo, utilizando a Equação 5.

A concentração de enzima AChE ativa recobrando a superfície do eletrodo calculada é  $4,51 \times 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ , que é muito maior do que o valor teórico da cobertura de uma única camada de enzima AChE (ca.  $1,89 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ ) e de outros biossensores eletroquímicos, como por exemplo, AChE/CS-Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub>/GCE ( $\tau = 6,864 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ ).<sup>171</sup> Esse resultado indica que múltiplas camadas de AChE podem ter sido imobilizadas, sem afetar sua atividade na superfície do nanocompósito de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu, podendo portanto, participar do processo de transferência de elétrons.<sup>172</sup>

#### *4.2.4. Análises de reprodutibilidade, interferentes e estabilidade do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL*

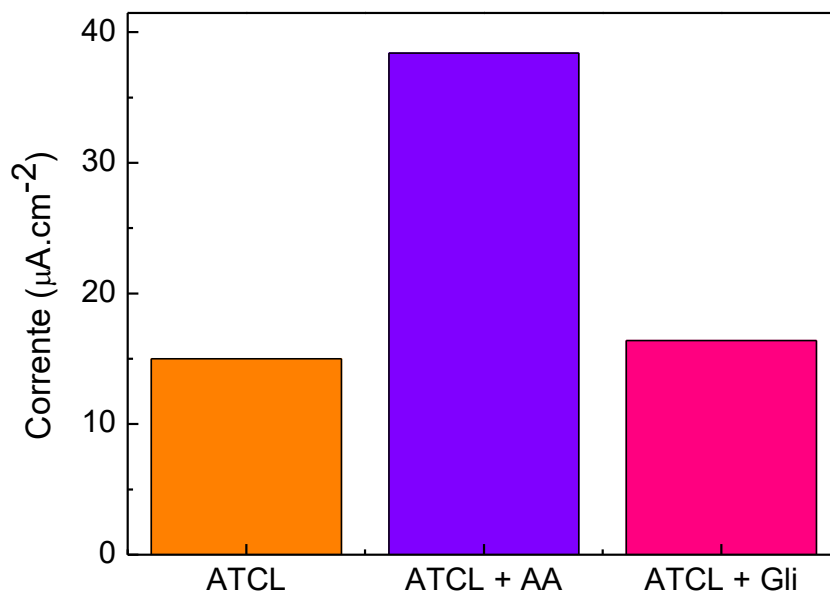
Para avaliar a reprodutibilidade inter-eletrodo, ou seja, a reprodutibilidade do método utilizado para construção do biossensor, foram construídos 5 biossensores sob as mesmas condições e avaliados em dias diferentes por cronoamperometria na presença de ATCL.<sup>173</sup> A Figura 39 mostra a resposta da corrente corresponde a oxidação da tiocolina para os diferentes eletrodos. A partir da Equação 6, utilizando os dados da Figura 39, é possível calcular DRP. O valor do DRP foi 10,2 %. O valor obtido está dentro do valor aceitável, indicando que o método de síntese dos eletrodos e de adsorção física utilizado para confecção do biossensor (imobilização da enzima AChE) é reprodutível.<sup>174-176</sup>





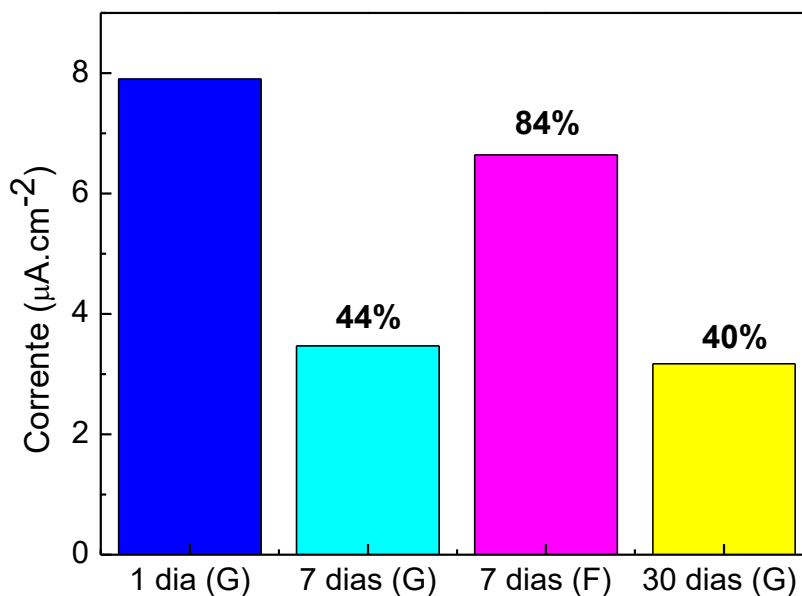
**Figura 39.** Resposta cronoamperométrica de 5 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL.

A resposta de corrente do biossensor em ATCL foi verificada na ausência e presença de interferentes comumente presentes em amostras biológicas. De acordo com a Figura 40, verifica-se que a presença de ácido ascórbico (AA) interfere significativamente na detecção. No entanto, nenhuma mudança significativa na resposta é observada na presença de glicose (Gli). De acordo com Li e cols.,<sup>177</sup> a utilização de negro de fumo (NF) pode ser utilizada como uma barreira para a difusão de pequenas espécies interferentes neutras ou negativamente carregadas, tais como ácido ascórbico e ácido úrico. NF é biocompatível com enzimas porque possui propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas.



**Figura 40.** Resposta do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL na ausência e presença de interferentes.

A estabilidade no armazenamento de biossensores enzimáticos a longo prazo é um parâmetro importante para aplicação prática.<sup>178,179</sup> Através da Figura 41, observa-se que após 7 e 30 dias de armazenamento, os biossensores retiveram apenas 44 e 40% da resposta de corrente em ATCL comparado ao biossensor armazenado por 1 dia em ambiente refrigerado a 4 °C. Apesar de não haver mudanças significativas nas respostas das correntes dos biossensores entre 7 e 30 dias de armazenamento, indicando uma boa estabilidade, observa-se uma perda da resposta de corrente significativa após 1 dia de armazenamento. Entretanto, quando o biossensor foi armazenado por 7 dias em ambiente refrigerado a ca. -15 °C reteve 84 % da resposta da corrente quando comparado ao biossensor armazenado por apenas 1 dia em ambiente refrigerado a 4 °C. Esses resultados demonstram que as condições de armazenamento são cruciais para o desempenho e estabilidade do biossensor.

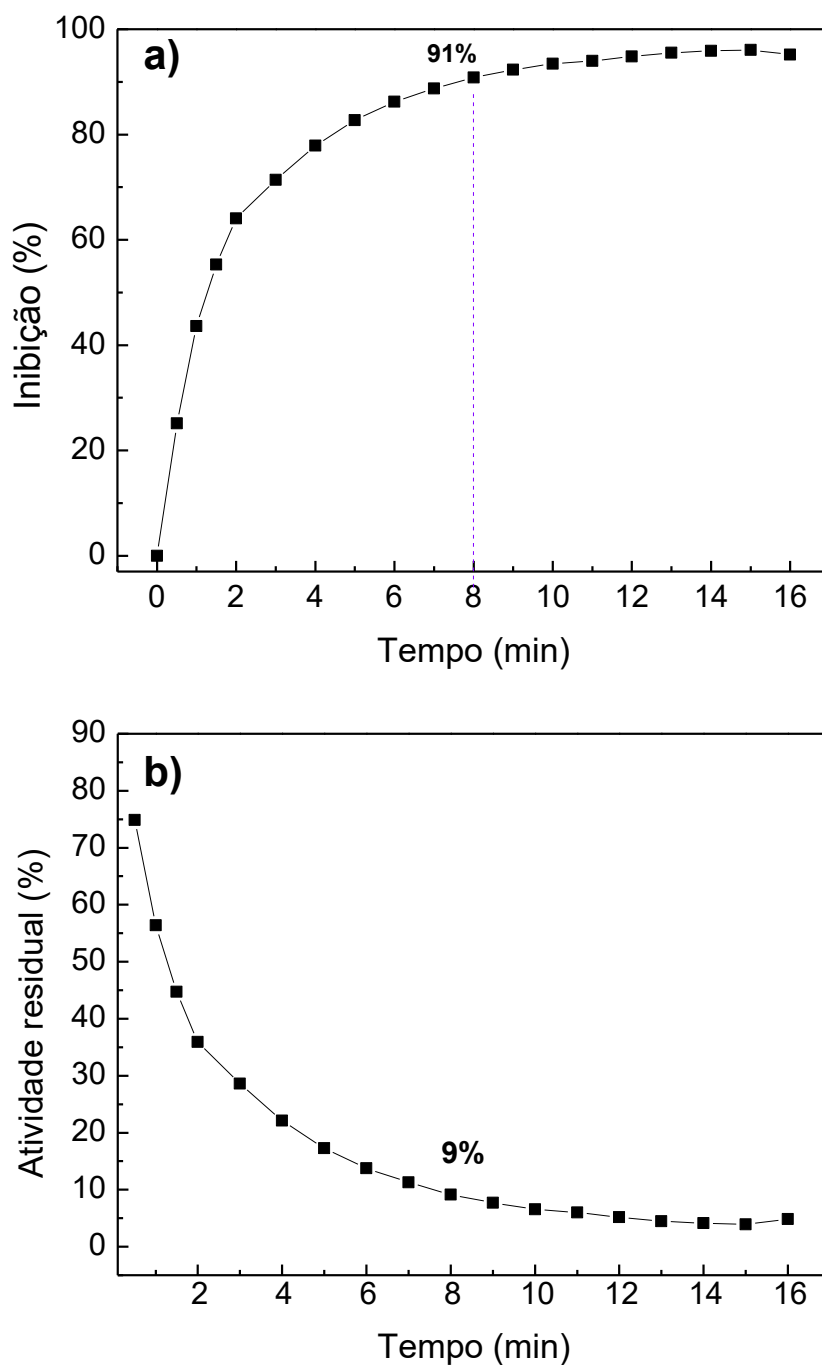


**Figura 41.** Resposta da corrente de 4 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL, em relação ao tempo de armazenamento em ambiente refrigerado. (G = geladeira, ca. 4 °C) e (F = freezer, ca. -15 °C).

#### 4.2.5. Determinação do pesticida carbaril utilizando o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE

##### 4.2.5.1. Tempo de incubação

Uma etapa importante no desenvolvimento de um biossensor para detecção e/ou determinação de pesticidas com base na inibição da atividade catalítica da enzima AChE é o tempo de incubação do biossensor. O tempo de incubação é o tempo de imersão do biossensor em soluções contendo o pesticida, antes da realização das medidas de detecção na presença do substrato ATCL.<sup>115</sup> Figura 42a apresenta a porcentagem de inibição da enzima AChE em função do tempo de incubação para o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE. A porcentagem de inibição em função do tempo de incubação, foi calculada de acordo com a Equação 9.



**Figura 42.** a) Porcentagem de inibição da enzima AChE em função do tempo de permanência do biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em solução contendo 50 ng.mL<sup>-1</sup> de pesticida carbaril. b) Atividade residual da enzima AChE em diferentes tempos de incubação do biossensor em solução contendo pesticida carbaril.

De acordo com a Figura 42a, observa-se que após 8 minutos de incubação a porcentagem de inibição tende a estabilizar, não havendo mudanças significativas. Isso ocorre uma vez que após um determinado tempo de incubação, praticamente todos os sítios ativos da enzima estão ocupados/inativos, não havendo a necessidade de um

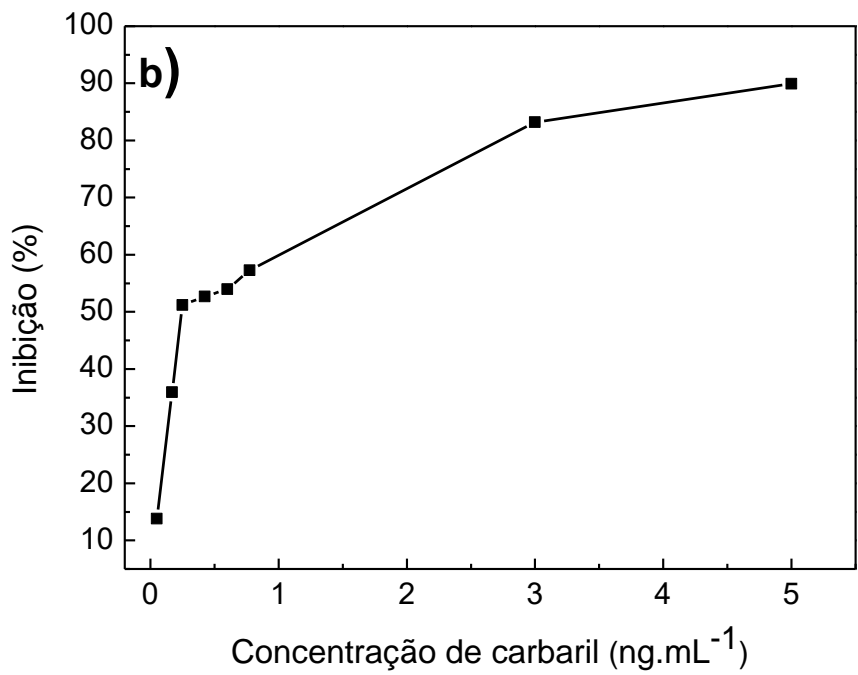
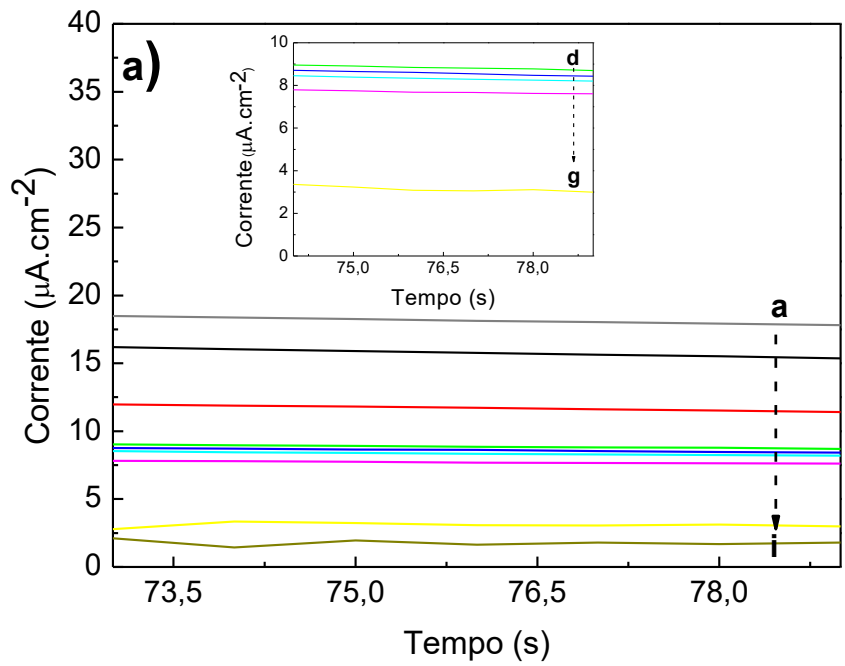
tempo maior de incubação. Dessa forma, optou-se por trabalhar com o tempo de incubação de 8 minutos. No entanto, observe que o valor máximo de inibição não alcança 100%, mesmo após 16 minutos de incubação, o que provavelmente é atribuído ao equilíbrio de ligação entre o pesticida e sítios ativos da enzima AChE.<sup>161,180</sup>

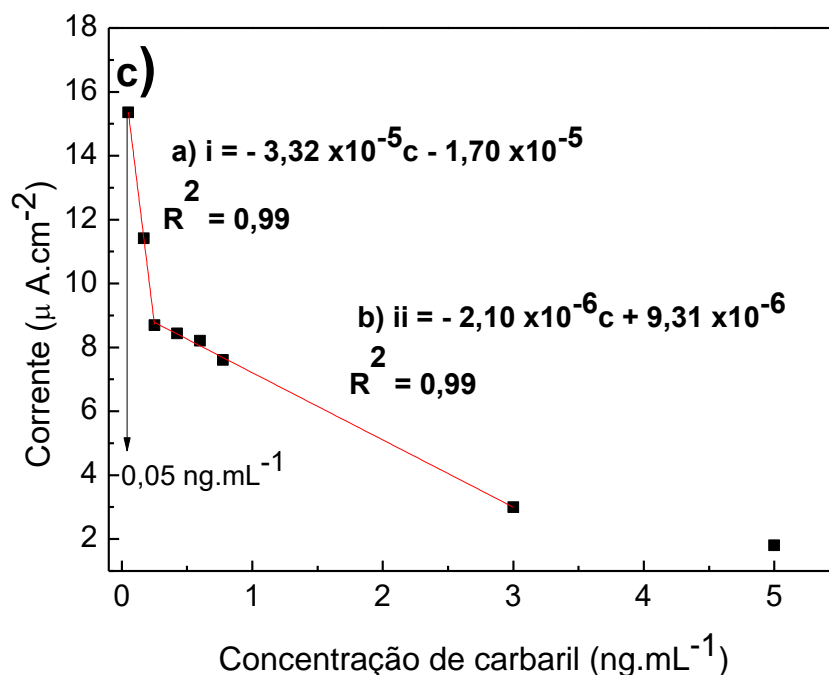
Após a incubação do biossensor na solução contendo o pesticida carbaril é possível calcular a atividade residual da enzima AChE em porcentagem (Equação 10). A Figura 42b mostra a atividade residual da enzima AChE em função do tempo de incubação. Comparando a variação da atividade residual do biossensor em função do tempo de incubação com outras matrizes utilizadas para imobilização da enzima AChE (outros biossensores) descritos na literatura, verifica-se que menos tempo é necessário para a inibição da AChE utilizando o eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu como matriz.<sup>10,167</sup> Este comportamento pode estar atribuído a obtenção de uma matriz menos espessa comparada a outros eletrodos, facilitando a difusão das moléculas inibidoras.<sup>10,159</sup>

#### 4.2.5.2. Curva analítica para determinação do pesticida carbaril

A determinação do pesticida carbaril utilizando o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE é baseada na inibição da atividade enzimática pelo pesticida. A curva analítica para determinação do carbaril foi obtida verificando a resposta de corrente do biossensor em ATCL após a sua imersão por 8 minutos em cada uma das soluções contendo diferentes concentrações do pesticida. A concentração de carbaril variou entre  $0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$  e  $5 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

De acordo com os cronoamperogramas (Figura 43a) é possível observar que após a imersão do biossensor nas soluções contendo diferentes concentrações do pesticida carbaril ((a-i) 0, 0,05, 0,17, 0,25, 0,42, 0,60, 0,77, 3,0, e 5,0  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) ocorre uma diminuição das densidades de corrente de difusão, relacionadas com a oxidação da tiocolina.<sup>116</sup> Além disso, verifica-se que no tempo de 80 s, utilizado para a realização das análises de cronoamperometria, não ocorre a liberação do carbaril do sítio ativo da AChE. Caso contrário, não seria observado um valor de corrente constante nos cronoamperogramas.<sup>115</sup> Através da Figura 43b nota-se que o percentual de inibição da enzima AChE, calculado a partir da Figura 43a e utilizando a Equação 9, é dependente da concentração de pesticida carbaril. Isso ocorre porque o pesticida carbaril bloqueia o sítio ativo da enzima, inibindo sua atividade catalítica e, conseqüentemente, impedindo a hidrólise do substrato ATCL.





**Figura 43.** a) Resposta cronoamperométrica do biossensor em ATCL antes e após a incubação em diferentes concentrações de carbaril. b) Porcentagem de inibição da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril. c) Curva analítica correspondente a corrente do biossensor após a inibição da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril.

A Figura 43c, mostra a curva analítica relacionada aos dados obtidos dos cronoamperogramas do biossensor em diferentes concentrações de carbaril (Figura 43a). Foi possível observar que a corrente referente a oxidação da tiocolina diminui com o aumento da concentração de carbaril, permitindo a separação da curva em duas faixas lineares, com as seguintes equações de regressão linear:

a)  $i = -3,32 \times 10^{-5} c - 1,70 \times 10^{-5}$  com coeficiente de linearidade de 0,99 para faixa de concentração entre 0,05 e 0,25 ng.mL<sup>-1</sup>;

b)  $ii = -2,10 \times 10^{-6} c + 9,31 \times 10^{-6}$  com coeficiente de linearidade de 0,99 para faixa de concentração entre 0,25 e 3 ng.mL<sup>-1</sup>.

O LD e LQ foram calculados a partir da Equação 11 e Equação 12, respectivamente. Os valores de LD e LQ para faixa de concentração entre 0,05 e 0,25 ng.mL<sup>-1</sup> foram 0,06 ng.mL<sup>-1</sup> e 0,20 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os parâmetros utilizados para os cálculos de LD e LQ estão de acordo com os trabalhos reportados na literatura.<sup>116,168,181-183</sup>

O valor de LD encontrado é menor que de outros biossensores eletroquímicos de AChE reportados na literatura, como apresentado na Tabela 4. Além disso, o biossensor mostrou-se sensível na faixa correspondente ao limite de uso permitido desse pesticida em águas salinas, que é  $0,32 \text{ ng.mL}^{-1}$  segundo o Conama.<sup>7</sup>

**Tabela 7.** Comparação dos parâmetros analíticos com outros biossensores eletroquímicos reportados na literatura para detecção do pesticida carbaril.

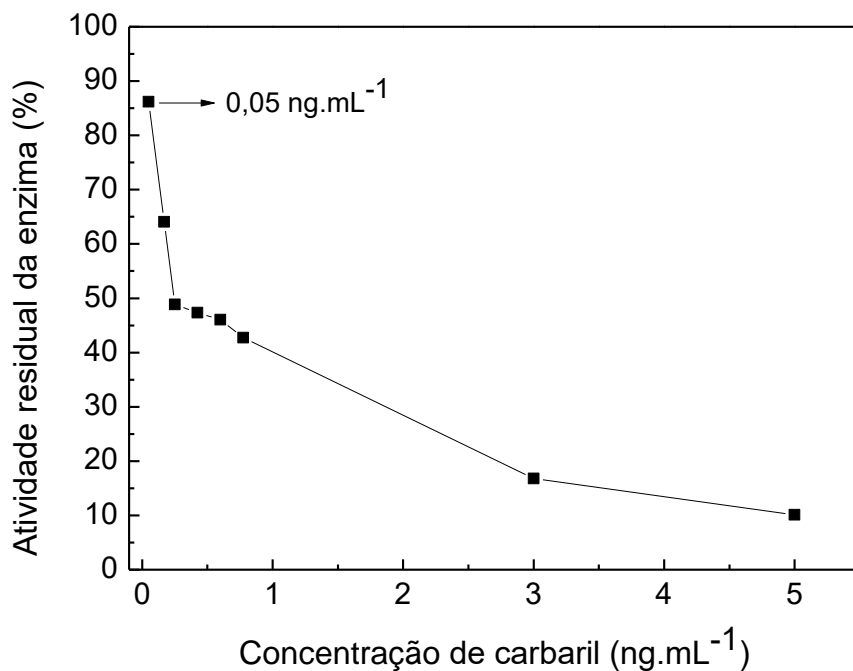
Biossensor	Faixa de Concentração	Limite de Detecção	Ref
AChE-e-pGON/GCE	$0,3 - 6,1 \text{ ng.mL}^{-1}$	$0,15 \text{ ng.mL}^{-1}$	10
AChE-G/PANI-GCE	$38 - 194 \text{ ng.mL}^{-1}$	$20 \text{ ng.mL}^{-1}$	180
GC/MWCNT/PANI/AChE	$9920 - 9980 \text{ ng.L}^{-1}$	$80488 \text{ ng.mL}^{-1}$	119
AChE/PDA-Gr/PPyNWs/IDIE	$0 - 1510 \text{ ng.mL}^{-1}$	$8,1 \text{ ng.mL}^{-1}$	183
AuNPs/MPS/Au	$0,6 - 402 \text{ ng.mL}^{-1}$	$0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$	184
Au/PAMAM-G4/GLUT/AChE	$201 - 1810 \text{ ng.mL}^{-1}$	$6,4 \text{ ng.mL}^{-1}$	185
Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE	$0,05 - 0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$	$0,06 \text{ ng.mL}^{-1}$	*

\* resultado obtido para esse trabalho. (e-Pgon = rede porosa de óxido de grafeno, GCE e GC = eletrodo de carbono vítreo, G = grafeno, PANI= polianilina, MWCNT = nanotubos de carbono de paredes múltiplas, PDA-Gr = polidopamina-grafeno, PPyNWs = nanofios de polipirrol, IDIE = microeletrodo de filme de platina, AuNPs = nanopartícula de ouro, MPS = (3-mercaptopropil)-trimetoxisilano, Au = eletrodo de ouro, PAMAM-G4 = poli (amidoamina) com um núcleo de cistamina, GLUT = glutaraldeído.

A atividade residual de enzima após a inibição com o pesticida carbaril (Figura 44) foi calculada utilizando a Equação 10. É possível observar que a atividade residual da enzima AChE imobilizada é dependente da concentração de carbaril. Além disso,



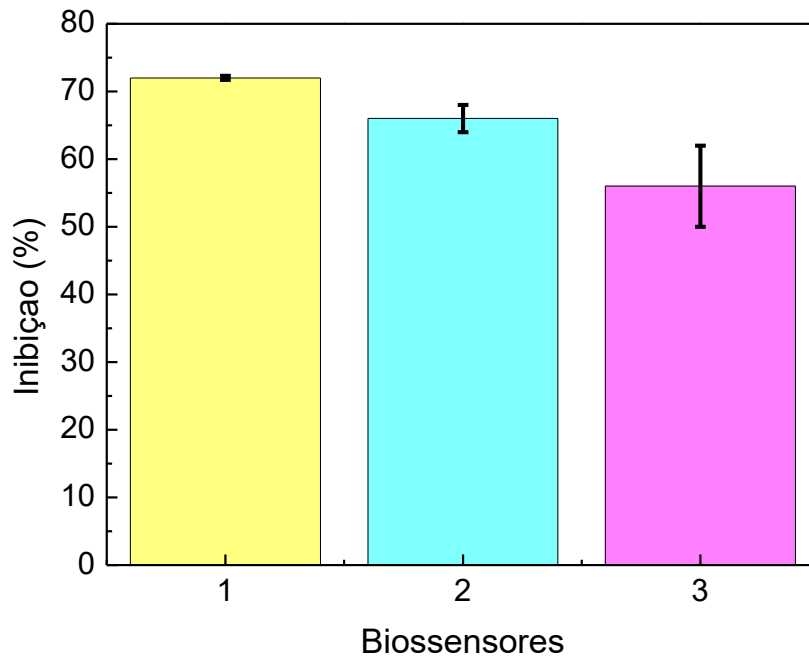
observa-se que com o aumento da concentração de carbaril, a porcentagem de atividade residual da enzima AChE imobilizada diminui, apresentado apenas 10 % de atividade residual quando a concentração de carbaril é 5 ng.mL<sup>-1</sup>. Isso ocorre porque o carbaril apresenta elevada toxicidade e atua inibindo a enzima AChE, reduzindo sua atividade catalítica para hidrólise do substrato de ATCL. Esse resultado de 10 % de atividade residual indica que o biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE fornece sensibilidade suficiente para o pesticida carbaril nessa faixa de concentração.<sup>186</sup>



**Figura 44.** Atividade residual da enzima AChE em função da concentração do pesticida carbaril.

#### 4.2.5.3. Análises de reprodutibilidade do biossensor após a inibição com o pesticida carbaril

A reprodutibilidade inter-eletrodo após a inibição com o pesticida também foi verificada. Os biossensores foram confeccionados sob as mesmas condições e avaliados em dias diferentes. A Figura 45 mostra a resposta de 3 biossensores de PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em ATCL após a inibição da enzima com o pesticida carbaril. O percentual de inibição foi calculado utilizando a Equação 9. O desvio padrão relativo foi calculado a partir da Equação 13. O valor de DPR calculado foi 12%.<sup>119,120,187</sup> Esse resultado está dentro da faixa do limite aceitável. Sendo assim, o biossensor confeccionado pode ser considerado reprodutível para detecção do pesticida carbaril.<sup>174</sup>



**Figura 45.** Percentual de inibição da enzima AChE para 3 biossensores de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE em solução de  $0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$  de carbaril.

## 5. Conclusão

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que a partir da simples variação da concentração de DS e consequente efeito sinérgico entre os materiais, é possível obter eletrodos de nanocompósitos de PPI com propriedades diferenciadas, podendo ser selecionados de acordo com a aplicação desejada. A inserção de DS na matriz do nanocompósito de PPI-IC-NPAu proporciona um aumento na espessura, rugosidade, hidrofobicidade, nível de dopagem (induzindo a formação de *bipolarons*) e maior área superficial eletroativa, conseqüentemente, contribuindo para o aumento da condutividade do polímero. Apesar dessas mudanças serem mais significativas para o eletrodo de PPI-IC-DS2-NPAu, a partir das análises eletroquímicas, de MEV e espectroeletróquímicas Raman *in situ*, foi sugerido que o filme sintetizado com DS abaixo da CMC apresenta propriedades semelhantes ao nanocompósito de PPI-IC-NPAu, mas com espessura e área eletroativa significativamente superior, além de indicar um melhor ordenamento e/ou distribuição de tamanho de cadeia, que contribui para um condicionamento redox facilitado em uma pequena faixa de potencial. Isso torna este eletrodo promissor também para aplicações em dispositivos ópticos eletrônicos, tornando o multifuncional.

A partir de análises de VC em ATCL e espectroscopia Raman, o eletrodo de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu mostrou-se ser uma plataforma adequada para a imobilização da enzima AChE. Os resultados sugeriram que este comportamento pode ser devido às melhoras em suas propriedades eletroquímicas com pouca alteração da hidrofiliabilidade da superfície. O biossensor de Pt-PPI-IC-DS1-NPAu-AChE apresentou alta sensibilidade e baixo LD para determinação do pesticida carbaril. O LD obtido foi  $0,06 \text{ ng.mL}^{-1}$  para faixa de concentração entre  $0,05$  e  $0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$  de carbaril. O LD, assim como o tempo de incubação necessário, foram menores comparados a outros trabalhos reportados na literatura, demonstrando-se também ser promissor para aplicação em amostras de água salinas, onde segundo a Conama o limite de uso permitido é  $0,32 \text{ ng.mL}^{-1}$ . O biossensor apresentou uma boa reprodutibilidade para detecção de ATCL e de carbaril. Verificou-se que a estabilidade ao longo do tempo de armazenamento é predominantemente dependente da temperatura de armazenamento do biossensor, tendo pouca alteração na resposta quando estocado em ambiente refrigerado a temperaturas negativa. Observou-se que apesar de não apresentar interferência na presença de glicose, a presença de AA interfere na resposta do biossensor por

cronoamperometria. Sendo assim, estratégias devem ser ainda adotadas para melhorar seletividade do biossensor.

## 6. Referências

---

1. Arduini, F., Sinti, S., Scognamiglio, V., Moscone, D. Nanomaterials in electrochemical biosensors for pesticide detection: advances and challenges in food analysis. *Microchim. Acta* **2016**, *186*, 2063.
2. Agrotóxicos podem causar câncer, apontam pesquisas. <https://g1.globo.com/pr/parana/especial-publicitario/apreaa/noticia/agrotoxicos-podem-causar-cancer-apontam-pesquisas.ghtml>. **Acessado em 09/09/2018**.
3. Songa, A. E., Okonkwo, O. J. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. *Talanta* **2016**, *155*, 289.
4. Natiotal Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/factsheets/carbarylgen.html#whatis>. **Acesso em: 03/11/2018**.
5. Pundir, C. S.; Chauhan, N.; Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.* **2012**, *429*, 19.
6. Rahmani, T.; Bagheri, H.; Behbahani, M.; Hajian, A.; Afkhami, A. Modified 3D Graphene-Au as a Novel Sensing Layer for Direct and Sensitive Electrochemical Determination of Carbaryl Pesticide in Fruit, Vegetable, and Water Samples. *Food Anal. Method.* **2018**, *11*, 3005.
7. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU n° 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.
8. Long, L.; Luo, Y.; Liu, B.; Du, D.; Lin, Y.; Screening of antidote sensitivity using an acetylcholinesterase biosensor based on a graphene–Au nanocompósito. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 4894.
9. Du, D.; Huang, X.; Cai, J.; Zhang, A.; Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 285.
10. Dutta, R. R.; Puzari, P.; Amperometric biosensing of organophosphate and organocarbamate pesticides utilizing polypyrrole entrapped acetylcholinesterase electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 166.
11. Moraes, F. C.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S.; Brett, C. M. A.; Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. *Talanta* **2009**, *79*, 1406.

- 
12. De Paoli, M. A.; Casalbore-Miceli, G.; Girotto, E. M.; Gazotti, W. A. All polymeric solid state electrochromic devices. *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 2983.
  13. Ahuja, T.; Mir, I. A.; Kumar, D.; Rajesh. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials* **2007**, *28*, 791.
  14. Wang, L-X.; Li, X-G.; Yang, Y-L.; Preparation, properties and applications of polypyrrole. *React. Fun. Pol.* **2001**, *47*, 125.
  15. Girotto, E. M.; Paoli, M-A.; Polypyrrole Color Modulation and Electrochromic Contrast Enhancement by Doping with a Dye. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 190
  16. Rocco, M.A. Dispositivo eletrocrômico poli(pirrol)/WO<sub>3</sub>: síntese, montagem e caracterização. *Tese de Doutorado em Química* **1994**, 13.
  17. Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Matos, R.; Ferreira, O. P.; Rubira, A. F.; Girotto, E. M.; Structural and electrochromic study of polypyrrole synthesized with azo and anthraquinone dyes. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *591*, 27.
  18. Girotto, E. M.; Gazotti, W. A.; Tormena, C. F.; Paoli, M-A.; Photoelectronic and transport properties of polypyrrole doped with a dianionic dye. *Electrochim. Acta* **2002**, *47*, 1351.
  19. Gao, Z.; Chen, B.; Zi, M.; Voltammetric determination of dopamine in the presence of ascorbic acid at over-oxidized polypyrrole-indigo carmine film-coated electrodes. *Analyst* **1994**, *119*, 459.
  20. Subrata, M.; Sangaranarayanan, M. V.; A novel non-enzymatic sensor for urea using a polypyrrole-coated platinum electrode. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2013**, *177*, 478.
  21. Loguercio, L.; Alves, C. C.; Thesing, A.; Ferreira, J.; Enhanced electrochromic properties of a polypyrrole-indigo carmine-gold nanoparticles nanocompósito. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 1234.
  22. Loguercio, L. F.; Demingos, P.; Manica, L. M.; Griep, J. B.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J.; Simple One-Step Method to Synthesize Polypyrrole-Indigo Carmine-Silver Nanocomposite. *J. Chem. Ny.* **2016**, *2016*, 1.
  23. Shirakawa, H.; Louis, J. E.; Gau, C. S.; Macdiarmid, G. A. Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Phys. Rev. Lett.* **1977**, *39*, 1098.
  24. Bredas, L.J.; Street, B.G. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. *Accounts Chem. Res.* **1985**, *18*, 309.
  25. Zoppi, A.R.; De Paoli, A.M. Aplicações Tecnológicas de Polímeros Condutores: Perspectivas Atuais. *Quim. Nova* **1993**, *16*, 560.

- 
26. Janata, J.; Josowicz, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. *Nat Mater.* **2003**, *2*, 19.
27. Balint, R.; Cassidy, N. J.; Cartmell, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2341.
28. Nezakati, T.; Seifalian, A.; Tan, A.; Seifalian, M. A. Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 6766.
29. Maia, J. D.; De Paoli, A. M., Alves, L. O. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 204.
30. Zhan, Ch.; Yu, G.; Lu, Y.; Wang, L.; Wujcik, E.; Wei, S. Conductive polymer nanocomposites: a critical review of modern advanced devices. *J. Mater. Chem. C.* **2017**, *5*, 1569.
31. Kanatzidis, C.M. Conductive Polymers. *Chem. Eng. News* **1990**, *68*, 36.
32. Faez, R.; Reis, C.; Scandiucci, F.P.; Kosima, K. O.; Ruggeri, G.; De Paoli, A. M. Polímeros Condutores. *Química Nova na Escola* **2000**, *11*, 13.
33. Vernitskaya, V.T.; Efimov, N.O. Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications. *Russ. Chem. Rev.* **1997**, *66*, 443.
34. Pron, A.; Rannou, P. Processible conjugated polymers: From organic semiconductors to organic metals and superconductors. *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27*, 135.
35. Bredas, L.J.; Scott, C.J.; Yakushi, K.; Street, B. G. Polarons and bipolarons in polypyrrole: Evolution of the band structure and optical spectrum upon doping. *Phys. Rev. B.* **1984**, *30*, 1023.
36. Yan, B.; Wu, Y.; Guo, L. Recent Advances on Polypyrrole Electroactuators. *Polymers* **2017**, *9*, 446.
37. Kumar, D.; Sharma, C.R. Advances in conductive polymers. *Eur. Polym. J.* **1998**, *34*, 1053.
38. Camurlu, P. Polypyrrole derivatives for electrochromic applications. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 55832.
39. Baranski, S.A.; Bennett, S.M.; Fawcett, R.W. The physical properties of CdS thin films electrodeposited from aqueous diethylene glycol solutions. *J. Appl. Phys.* **1983**, *54*, 6390.

- 
40. Ferreira, J. Sensor de pH baseado em filmes de polímero conjugado e Sensor biológico baseado em filmes de ouro nanoestruturado. *Tese de Doutorado em Química* **2009**, 9.
41. Santos, L.J.M. Caracterização do Estado Polaron do Polipirrol Através de Raman e Propriedades Fotoluminescentes do Polipirrol/Oxazina 720. *Tese de Doutorado em Química* **2009**, 12.
42. Diaz, F.A.; K Anazaw, K.K. Electrochemical Polymerization of Pyrrole. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 635.
43. Kanazawa, k.k.; Diaz, F.A.; Geiis, H.R.; Gill, W.D.; Kwak, F.G.; Logan, A.J.; Rabolt, F.J.; Street, B.G. Organic Metals' : Polypyrrole, a Stable Synthetic 'Metallic' Polymer. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 854.
44. Diaz, F.A.; Kanazawa, K.K. Extended Linear Chain Compounds. *Ed. J S Miller New York: Plenum*, **1983**, 417.
45. Genies, M.E.; Bidan, G. Spectroelectrochemical Study of Polypyrrole Films. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 149, 101.
46. Sadki, S; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *The Royal Society of Chemistry* **2000**, 29, 283.
47. Mitchell, G. R.; Davis, F.J.; Legge, C.H. The Effect of Dopant Molecules on the Molecular Order of Electrically-Conducting Films of Polypyrrole. *Synthetic Met.* **1988**, 26, 247.
48. Zhou, M.; Heinze, J. Electropolymerization of Pyrrole and Electrochemical Study of Polypyrrole. 2. Influence of Acidity on the Formation of Polypyrrole and the Multipathway Mechanism. *J. Phys. Chem. B.* **1999**, 103, 8443.
49. Xin, G.L.; Li, A.; Huang, M.R.; Liao, Y.; Lu, G. Y. Efficient and Scalable Synthesis of Pure Polypyrrole Nanoparticles Applicable for Advanced Nanocomposites and Carbon Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* **2010**, 114, 19244.
50. Loguercio, F.L.; De Matos, F. C.; De Oliveira, C. M.; Marin, G.; Khan, S.; Balzaretto, M. N.; Dupont, J.; Santos, L.J.M.; Santos, L. F. J. Synergistic interplay of ionic liquid and dodecyl sulphate driving the oxidation state of polypyrrole based electrodes. *New J. Chem.* **2018**, 42, 13828.
51. Saghafi, M.; Mahmoodian, M.; Hosseini, S.A.; Abdollahi, A.; Mohajerzadeh, S. Effects of different anionic dopants on the charge storage properties of binder less



- 
- polypyrrole/vertically aligned carbon nanotube composites. *Electrochim Acta*. **2018**, 283, 1450.
52. Pramodini, S.; Poornesh, P.; Third-order nonlinear optical response of indigo carmine under 633 nm excitation for nonlinear optical applications. *Opt. Laser Technol.* **2014**, 63, 114.
53. Yijun, L.; Shaojun, D. Indigo-carmin-modified polypyrrole film electrode. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 348, 181.
54. Sultana, I.; Rahman, M. M.; Wang, J.; Wang, C.; Wallace, G. G.; Liu, H-K.; Indigo carmine (IC) doped polypyrrole (PPy) as a free-standing polymer electrode for lithium secondary battery application. *Solid States Ionics* **2012**, 215, 29.
55. Hu, S.; Zhou, Y.; Zhang, L.; Liu, S.; Cui, K.; Lu, Y.; Li, K.; Li, X. Effects of indigo carmine concentration on the morphology and microwave absorbing behavior of PPy prepared by template synthesis. *J. Mater. Sci.* **2018**, 53, 3016.
56. Mahamoodian, M.; Pourabbas, B.; Mohajerzadeh, S.; Effect of anionic dopants on thickness, morphology and electrical properties of polypyrrole ultra-thin films prepared by in situ chemical polymerization. *Thin Solid Films*. **2015**, 583, 255.
57. Phan, T.T.V.; Bharathiraja, S.; Nguyen, V.T.; Moorthy, M.S.; Manivasagan, P.; Lee, K.D.; Oh, J. Polypyrrole–methylene blue nanoparticles as a single multifunctional nanoplatform for near-infrared photo-induced therapy and photoacoustic imaging. *RSC Adv.* **2017**, 7, 35027.
58. Amparat, R. U. R.; Artita, P. J.; Walaiporn, P. O.; Sirisart, O. Synthesis of Highly Conductive Polypyrrole Nanoparticles via Microemulsion Polymerization. *Jom-J Min Met Mats.* **2008**, 18, 27.
59. Naoi, K.; Oura, Y.; Maeda, M.; Nakamura, S.; Electrochemistry of Surfactant-Doped Polypyrrole Film (I): Formation of Columnar Structure by Electropolymerization. *J. Electrochem. Soc.* **1995**, 142, 417.
60. Hammouda, B.; Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water. *J. Res. Natl. Inst. Stand Technol.* **2013**, 67, 118.
61. Rawal, I.; Kaur, A. Effect of anion surfactant concentration on the variable range hopping conducting in polypyrrole nanoparticles. *J Appl Phys.* **2014**, 115, 043717.
62. Hazarika, J.; Kumar, A.; Controllable synthesis and characterization of polypyrrole nanoparticles in sodium dodecylsulphate (SDS) micellar solutions. *Synthetic. Met.* **2013**, 175, 155.

- 
63. Oliveira, P. H.A. *Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais)*; Universidade Federal do Vale do São Francisco, Bahia; **2012**.
64. Upadhyay, J.; Kumar, A. Investigation of structural, thermal and dielectric properties of polypyrrole nanotubes tailoring with silver nanoparticles. *Compos. Sci. Technol.* **2014**, *97*, 55.
65. Sih, C.B.; Wolf, O. M. Metal nanoparticle-conjugated polymer nanocomposites. *Chem. Commun.* **2005**, 3375.
66. Yang, X.; Li, L.; Yan, F. Polypyrrole/silver composite nanotubes for gas sensors. *Sensor. Actuat. B.* **2010**, *145*, 495.
67. Babu, T. G. S.; Varadarajan, D.; Murugan, G.; Ramachandran, T.; Nair, B. G. Gold nanoparticle-polypyrrole composite modified TiO<sub>2</sub> nanotube array electrode for the amperometric sensing of ascorbic acid. *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42*, 427.
68. Goswami, L.; Sarma, N.S.; Chowdhury, D. Determining the Ionic and Electronic Contribution in Conductivity of Polypyrrole/Au Nanocomposites. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19668.
69. Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A.J.; Smyth, M. R. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanal.* **2006**, *18*, 319.
70. Dallas, P.; Niarchos, D.; Vrbanic, D.; Boukos, N.; Pejovnik, S.; Trapalis, C.; Petridis, D. Interfacial polymerization of pyrrole and in situ synthesis of polypyrrole/silver nanocomposites. *Polymer.* **2007**, *48*, 2007.
71. Biswas, S.; Dutta, B.; Bhattacharya, S. Dependence of the carrier mobility and trapped charge limited conduction on silver nanoparticles embedment in doped polypyrrole nanostructures. *J. Appl. Phys.* **2013**, *114*, 143701.
72. Nars, M. G.; Osman, M.H.; Abdeen, A; Aboud, A.I. On the perclorative behavior of carbon black-rubber interlinked systems. *Polym. Test.* **1999**, *18*, 483.
73. Machado, S. W. Caracterização elétrica de uma mistura à base de polianilina e pó de borracha de pneu. *Dissertação de Mestrado em Materiais para Engenharia* **2008**, 24.
74. Braga, O.C.P. Síntese e Caracterização de nanohíbridos de polianilina e nanopartículas de Prata. *Dissertação de Mestrado em Materiais para Engenharia* **2012**, 21.
75. Oqla, F.M.A.; Sapuan, S.M, Anwer, T.; Jawaid, M.; Hoque, M.E. Natural fiber reinforced conductive polymer composites as functional materials: A review. *Synthetic Met.* **2015**, *206*, 42.

- 
76. Mikoliūnaitė, L.; ubiliūtė, R.; Voronovič, J.; Šakirzanovas, S.; Ramanavičienė, A.; Ramanavičius, A. Development of gold nanoparticle - polypyrrole nanocomposites. *Chemija* **2014**, *25*, 63.
77. Singh, S.; Jain, D.V.S.; Singla, M.L. One step electrochemical synthesis of goldnanoparticles-polypyrrole composite for application in catechin electrochemical biosensor. *Anal. Methods*. **2013**, *5*, 1024.
78. De Oliveira, H. P.; De Oliveira, A.H.P.; Tavares, G. T.; Albuquerque, .J.J.F.J. Preparação e Caracterização Elétrica de Sensores de Metanol à Base de Nanocompósitos Híbridos de Polipirrol/Nanopartículas Metálicas. *Polímeros* **2010**,*20*, 253
79. Huang,k.; Zhang, y.; Han, d.; Shen, Y.; Wang, Z.; Yuan, J.; Zhang, Q.; Niu, L. One-step synthesis of 3D dendritic gold/polypyrrole nanocomposites via a self-assembly method.*Nanotechnology* **2006**, *17*, 283
80. Shan, J.; Ma, Z. A review on amperometric immunoassays for tumor markers based on the use of hybrid materials consisting of conducting polymers and noble metal nanomaterials. *Microchim. Acta*. **2017**, *184*, 969.
81. Krasinski, A.; Radic, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C.; In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686.
82. Araújo, C. R. M.; Santos, V. L. dos A.; Gonsalves A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Rev. Virtual Quim.* **2016**, *8*, 1818.
83. Garbellini, S.G.; Uliana, V.C. Toxidez, degradação no meio-ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente.* **2007**, *17*, 29
84. Liu, X. Electrochemical Sensor for Determination of Parathion Based on Electropolymerization Poly(Safranine) Film Electrode. *Inter. J. Electrochem.* **2011**, *2011*, 1.
85. Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchim. Acta* **2010**, *170*, 193.
86. Bucur, B.; Fournier, D.; Danet, A.; Marty, J-L.; Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. *Anal. Chem. Acta.* **2006**, *562*, 115.

- 
87. Spain, E.; Keyes, T. E.; Forster, R.J. Polypyrrole–gold nanoparticle composites for highly sensitive DNA detection. *Electrochim. Acta.* **2013**, *109*, 102.
88. Sassolas, A.; Blum, L. J.; Bouvier, B.D.L. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489.
89. Cardoso, C.L.; Moraes, M. C.; Cass, B. Q. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*, **2009**, *32*, 175.
90. Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J. I. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *481*, 209.
91. Njagi, J.; Andreescu, S. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au–polypyrrole nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 168.
92. Du, D.; Chen, S.; Song, D. Li, H.; Chen, X. Development of acetylcholinesterase biosensor based on CdTe quantum dots/gold nanoparticles modified chitosan microspheres interface. *Biosens Bioelectron.* **2008**, *24*, 475.
93. Du, D.; Wang, M.; Cai, J.; Qina, Y.; Zhang, A. One-step synthesis of multiwalled carbon nanotubes-gold nanocomposites for fabricating amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Sensor Actuator.* **2010**, *143*, 524.
94. Wu, S.; Lan, X.; Zhao, W.; Li, Y. Zhang, L. Wang, H.; Han, M.; Tao, S. Controlled immobilization of acetylcholinesterase on improved hydrophobic gold nanoparticle/Prussian blue modified surface for ultra-trace organophosphate pesticide detection. *Biosens Bioelectron.* **2011**, *27*, 82.
95. Yang, Y.; Asiri, M. A.; Du, D.; Lin, Y. Acetylcholinesterase biosensor based on a gold nanoparticle–polypyrrole–reduced graphene oxide nanocomposite modified electrode for the amperometric detection of organophosphorus pesticides. *Analyst* **2014**, *139*, 3055
96. Gong, J.; Wang, L.; Zhang, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au–polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2285.
97. Park, C.S.; Lee, C.; Kwon, O. S. Conducting Polymer Based Nanobiosensors. *Polymers* **2016**, *8*, 249.
98. Paoli, D. M.-A.; Rocco, M.A.; Effect of the Temperature on the Electrochemical Synthesis of Polypyrrole Dodecylsulphate. *J. Braz. Chem. Soc.* **1993**, *4*, 97.

- 
99. Wei, H.; He, C.; Liu, J.; Gu, H.; Wang, Y.; Yan, X.; Guo, J.; Daowei, D.; Shen, N. Z.; Wang, X.; Wei, S.; Guo, Z.; Electropolymerized polypyrrole nanocomposites with cobalt oxide coated on carbon paper for electrochemical energy storage. *Polymer* **2015**, *67*, 192.
100. Macedo, E. R.; Oliveira, P. S.; Oliveira, H. P.; Synthesis and characterization of branched polypyrrole/titanium dioxide photocatalysts. *J. Photoch. Photobio. A* **2015**, *307*, 108.
101. Zaki, M. F.; Gamma-induced modification on optical band gap of CR-39 SSNTD. *Braz. J. Phys.* **2008**, *38*, 1678.
102. Reda, S. M.; Al-Ghannam, S. M.; Synthesis and Electrical Properties of Polyaniline Composite with Silver Nanoparticles. *Sci. Res.* **2012**, *2*, 75.
103. Li, Y.; Shi, L.; Han, G.; Xiao, Y.; Zhou, W.; Electrochemical biosensing of carbaryl based on acetylcholinesterase immobilized onto electrochemically inducing porous graphene oxide network. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2017**, *238*, 945.
104. Bacarro, A. L. B.; Gutz, I. G. R.; Fotoeletrocatalise em semicondutores: dos princípios básicos até sua conformação em nanoescala. *Quim. Nova* **2018**, *41*, 326.
105. Giroto, M.E.; Santos, A.I. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: como efetuá-las corretamente. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 639.
106. Wen, J.; Tian, Y.; Mei, Z.; Wu, W.; Tian, Y. Synthesis of polypyrrole nanoparticles and their applications in electrically conductive adhesives for improving conductivity. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 53219.
107. Brownson, D.A.C.; Banks, C. E. The Handbook of Graphene Electrochemistry, **2014**, *201*, 126.
108. Du, D.; Wang, M.; Cai, J.; Tao, Y.; Tu, H.; Zhang, A.; Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing. *Analyst* **2008**, *133*, 1790.
109. Montes, R.; Céspedes, F.; Gabriel, D.; Baeza, M.; Electrochemical Biosensor Based on Optimized Biocomposite for Organophosphorus and Carbamates Pesticides Detection. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*, 1.
110. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M.; A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. *Biochem.Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.

- 
111. Khanldi, K.; Sam, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; Villeneuve, C. H.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Yang, J.; Kermad, A.; Ghellai, N.; Gabouze, N.; Active Acetylcholinesterase Immobilization on a Functionalized Silicon Surface. *Langmuir* **2015**, *31*, 8421.
112. Li, Y.; Bai, Y.; Han, G.; Li, M.; Porous-reduced graphene oxide for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Sens. Actuact. B-Chem.* **2013**, *185*, 706.
113. Du, D.; Ye, X.; Cai, J.; Liu, J.; Zhang, A.; Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. *Biosens. Bioelect.* **2010**, *25*, 2503.
114. Du, D.; Ding, J.; Tao, Y.; Chen, X.; Application of chemisorption/desorption process of thiocholine for pesticide detection based on acetylcholinesterase biosensor. *Sensor. Actuact. B-Chem.* **2008**, *134*, 908.
115. Cancino, J.; Razzino, C. A.; Zucolotto, V.; Machado, S. A. S.; The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. *Electrochem. Acta* **2013**, *87*, 717.
116. Yin, H.; Ai, S.; Xu, J.; Shi, W.; Zhu, L.; Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbofuran and phoxim. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *637*, 21.
117. Brito, N. M.; De Amarante, P.O.J.; Polese, L.; Ribeiro, L. M. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, *13*, 129.
118. Nesakumar, N.; Sethruman, S.; Krishnan, U. M.; Rayappan, J. B.; Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on ZnO nanocuboids modified platinum electrode for the detection of carbosulfan in rice. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 1070.
119. Raghu, P.; Reddy, T. M.; Raddaiah, K.; Swamy, B. E. K.; Sreedhar, M.; Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of Malathion and Acephate in food samples: A voltammetric study. *Food Chem.* **2014**, *142*, 188.
120. Raghu, P.; Reddy, T. M.; Swamy, B. E. K.; Chandrasherkar, B. N.; Reddaiah, K.; Sreedhar, M.; Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples: A cyclic voltammetric study. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *665*, 76.

- 
121. Hnida, K. E.; Socha, R. P.; Sulka, G. D.; Polypyrrole–Silver Composite Nanowire Arrays by Cathodic Co-Deposition and Their Electrochemical Properties. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 19382.
122. Rawal, I.; Kaur, A. Effect of anionic surfactant concentration on the variable range hopping conduction in polypyrrole nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2014**, *115*, 043717.
123. Fonner, J. M.; Forciniti, L.; Nguyen, H.; Byrne, J.; Kou, Y-F.; Syeda-Nawaz, J.; Schmidt, C. E.; Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. *Biomed. Mater.* **2008**, *3*, 034124.
124. Luz, A. P.; Ribeiro, S.; Pandolfelli, V. C.; Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica* **2008**, *54*, 174.
125. Drelich, J.; Chibowski, E. Meng, D. D.; Terpilowski, K.; Hydrophilic and Superhydrophilic Surfaces and Materials. *Soft Matter*. **2011**, *21*, 9804..
126. Toma, E. H. *Nanotecnologia Molecular - Materiais e Dispositivos*; Blucher (Edt.), **2016**, p 300.
127. Kim, H. J.; Piao, M. H.; Choi, S. H.; Shin, C. H.; Lee, Y. T.; Development of Amperometric Hydrogen Peroxide Sensor Based on Horseradish Peroxidase-Immobilized Poly(Thiophene-co-EpoxyThiophene). *Sensors* **2008**, *8*, 4110.
128. Zhang, X.; Yan, X.; Guo, J.; Liu, Z.; Jiang, D.; He, Q.; Wei, H.; Gu, H.; Colocrado, H. A.; Zhang, X.; Wei, S.; Guo, Z.; Polypyrrole doped epoxy resin nanocompósitos with enhanced mechanical properties and reduced flammability. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 162.
129. Umopathy, S.; Hester, R. E. Raman Spectroscopic Studies of Polypyrrole on Colloidal TiO<sub>2</sub>: Evidence for Bipolarons. *J Mol Struct.* **1990**, *224*,113.
130. Pramodini, S.; Poornesh, P.; Third-order nonlinear optical response of indigo carmine under 633 nm excitation for nonlinear optical applications. *Opt. Laser Technol.* **2014**, *63*, 114.
131. Aleboyeh, A.; Moussa, Y.; Aleboyeh, H.; The effect of operational parameters on UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decolourisation of Acid Blue 74. *Dyes Pigments* **2005**, *66*, 129.

- 
132. Yavuz, H.; Bai, J. Plasma Polypyrrole Coated Hybrid Composites with Improved Mechanical and Electrical Properties for Aerospace Applications. *Appl Compos Mater.* **2018**, *25*, 661.
133. Zhanga, L.; Liu, S.; Han, H.; Zhou, Y.; Hu, S.; He, C.; Yan, Q. Studies on the formation process and anti-corrosion performance of polypyrrole film deposited on the surface of Q235 steel by an electrochemical method. *Surface & Coatings Technology.* **2018**, *341*, 95.
134. Kuwabata, S.; Yoneyama, H.; Tamura, H. Redox behavior and Electrochromic Properties of Polypyrrole Films in Aqueous Solutions. *B Chem Soc Jpn.* **1984**, *57*, 8.
135. Paoli, M. A.; Panero, S.; Prospero, P.; Scrosati, B. Study of the electrochromism of polypyrrole/dodecylsulfate in aqueous solutions. *Electrochim. Acta.* **1990**, *35*, 1145.
136. Raudsepp, T.; Marandi, M.; Tamm, T.; Sammelseg, V.; Tamm, J.; Influence of ion-exchange on the electrochemical properties of polypyrrole films. *Electrochim. Acta* **2014**, *122*, 79.
137. Proctor, C. M.; Rivnay, J.; Malliaras, G. G.; Understanding Volumetric Capacitance in Conducting Polymers. *J. Pol. Sci.* **2016**, *54*, 1433.
138. Noh, A.K.; Kim, D.W.; Jin, S. Ch.; Shin, H.K.; Kim, H. J.; Ko, M.J. Synthesis and pseudo-capacitance of chemically-prepared polypyrrole powder. *J Power Sources.* **2003**, *24*, 593.
139. Gao, W.; Sel, O.; Perrot, H.; Electrochemical and viscoelastic evolution of dodecyl sulfate-doped Polypyrrole films during electrochemical cycling. *Electrochem. Acta* **2017**, *233*, 262.
140. Paola, I. F.; Faria, A. C. A.; Araújo, D. A. G.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. L. Miniaturização de uma Célula Eletroquímica em um Experimento Didático de Voltametria Cíclica: Economizando Reagentes e Minimizando a Geração de Resíduos. *Rev. Virtual Quim.* **2017**, *9*, 953.
141. Caetano, F. R.; Felipe, L. B.; Zarbin A. J. G.; Bergamini, M. F.; Marcolino-Junior, L. H.; Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application. *Sens. Actuact. B* **2017**, *243*, 43.
142. Mailu, S. N.; Waryo, T. T.; Ndagili, P. M.; Ngece, F. R.; Baleg, A. A.; Baker, P. G.; Iwuoha, E. I.; Determination of Anthracene on Ag-Au Alloy



---

Nanoparticles/Overoxidized-Polypyrrole Composite Modified Glassy Carbon Electrodes. *Sensors* **2010**, *10*, 9449.

143. Song, H-K.; Palmore, G. T. R.; Redox-Active Polypyrrole: Toward Polymer-Based Batteries. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1764.

144. Skoog, W.; Holler, C. Fundamentos da Química Analítica, Cengage: São Paulo, **2010**.

145. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*; 2a edição; John Wiley & Sons, 2001.

146. Varga, M.; Kopecky, D.; Kopecka, J.; Krivka, I.; Hanus, J.; Zhingunov, A.; Trchova, M.; Vrnata, M.; Prokes, J.; The ageing of polypyrrole nanotubes synthesized with methyl orange. *Eur. Pol. J.* **2017**, *96*, 176.

147. Santos, L.J.M.; Brolo, G.A.; Girotto, M.E. Study of polaron and bipolaron states in polypyrrole by in situ Raman spectroelectrochemistry. *Electrochim Acta* **2007**, *52*, 6141.

148. Crowley, K.; Cassidy, J. In situ resonance Raman spectroelectrochemistry of polypyrrole doped with dodecylbenzenesulfonate. *J Electroanal Chem.* **2003**, *547*, 75.

149. Liu, Y. C. Characteristics of vibration modes of polypyrrole on surface-enhanced Raman scattering spectra. *J Electroanal Chem.* **2004**, *571*, 255.

150. Duchet, J.; Legras, R.; Demoustier, C.S. Chemical synthesis of polypyrrole: structure–properties relationship. *Synthetic Met.* **1998**, *98*, 113.

151. Singh, A.; Salmi, Z.; Joshi, N.; Jha, P.; Decorse, P.; Lecoq, H.; Truong, S.L.; Jouini, M.; Aswal, D.K.; Chehimi, M. M. Electrochemical investigation of free-standing polypyrrole–silver nanocomposite films: a substrate free electrode material for supercapacitors. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 24567.

152. Zhao, J.; Li, Z.; Wang, J.; Li, Q.; Wang, X. Capsular polypyrrole hollow nanofibers: an efficient recyclable adsorbent for hexavalent chromium removal. *J. Mater. Chem. A*, **2015**, *3*, 15124.

153. Arjomandi, J.; Shah, A.H.A.; Bilal, S.; Hoang, H.V.; Holze, R. In situ Raman and UV–vis spectroscopic studies of polypyrrole and poly(pyrrole-2,6-dimethyl–cyclodextrin). *Spectrochimica Acta Part A* **2011**, *78*, 1

- 
154. Han, G.; Liu, Y.; Kan, E.; Tang, J.; Zhang, L.; Wang, H.; Tang, W. Sandwich-structured MnO<sub>2</sub>/polypyrrole/reduced graphene oxide hybrid composites for high-performance supercapacitors. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 9898.
155. Gao, W.; Sel, O.; Perrot, H. Electrochemical and viscoelastic evolution of dodecyl sulfate-doped polypyrrole films during electrochemical cycling. *Electrochim Acta* **2017**, *233*, 262.
156. Chen, F.; Shi, G.; Fu, M.; Qu, X.H. Raman spectroscopic evidence of thickness dependence of doping level of electrochemically deposited polypyrrole film. *Synthetic Met.* **2003**, *132*, 125.
157. Li, Y.; Shi, L.; Han, G.; Xiao, Y.; Zhou, W. Electrochemical biosensing of carbaryl based on acetylcholinesterase immobilized onto electrochemically inducing porous graphene oxide network. *Sensor. Actuact. B-Chem.* **2017**, *238*, 945.
158. Freire, S.R.; Pessoa, A.C.; Mello, D.L.; Kubota, T. L. Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity. *J. Braz. Chem.* **2003**, *14*, 230.
159. Tang, W.; Wu, J.; Amperometric determination of organophosphorus pesticide by silver electrode using an acetylcholinesterase inhibition method. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 924.
160. Cesarino, I.; Moraes, F. C.; Lanza, M. R. V.; Machado, S. A. S.; Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. *Food Chem.* **2012**, *135*, 873.
161. Kaur, N.; Thakur, H.; Kumar, R.; Prabhakar, N.; An electrochemical sensor modified with poly(3,4 ethylenedioxythiophene)-wrapped multi-walled carbon nanotubes for enzyme inhibition-based determination of organophosphates. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 2307.
162. Aslanian, D.; Grof, P.; Bon, S.; Masson, P.; Negrerie, M.; Chatel, J. M.; Balkanski, M.; Taylor, P.; Massoulie, J.; A comparative Raman spectroscopic study of cholinesterases. *Biochimie* **1981**, *73*, 1375.
163. Aslanian, D.; Grof, P.; Negrerie, M.; Balkanski, M.; Taylor, P.; Raman spectroscopic study on the conformation of 11 S form acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *FEBS Lett.* **1987**, *219*, 202.

- 
164. Hatzmarinaki, M.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N.; Spectro-electrochemical studies of acetylcholinesterase in carbon nanofiber-bioinspired silica nanocomposites for biosensor development. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 428.
165. Ordentlitch, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A.; Contribution of Aromatic Moieties of Tyrosine 133 and of the Anionic Subsite Tryptophan 86 to Catalytic Efficiency and Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2082.
166. Griep, J.; Dissertação (*Mestrado em Química*); Universidade Federal de Porto Alegre, Porto Alegre; **2018**.
167. Liu, H.; Duan, C.; Yang, C.; Shen, W.; Wang, F.; Zhu, Z.; A novel nitrite biosensor based on the direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on MXene-Ti3C2. *Sens. Actuact. B-Chem.* **2015**, *218*, 60.
168. Cancar, H. D.; Soylemez, S.; Akpınar, Y.; Kesik, M.; Goker, S.; Gunbas, G.; Volkan, M.; Toppare, L.; A Novel Acetylcholinesterase Biosensor: Core-Shell Magnetic Nanoparticles Incorporating a Conjugated Polymer for the Detection of Organophosphorus Pesticides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 8058
169. Kelly, S. R. Analytical Electrochemistry: Basic Concepts. Working Electrodes. **2015**.
170. Yanping Li, Ruixia Zhao, Lingyun Shi, Gaoyi Han \* and Yaoming Xiao. Acetylcholinesterase biosensor based on electrochemically inducing 3D graphene oxide network/multi-walled carbon nanotube composites for detection of pesticides. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 53570
171. Zhou, L.; Zhang, X.; Ma, L.; Gao, J.; Jiang, Y.; Acetylcholinesterase/Chitosan-transition Metal Carbides Nanocomposites-Based Biosensor for the Organophosphate Pesticides Detection. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *128*, 243.
172. Milkani, E.; Khaing, A. M.; Huang, F.; Gibson, D. G.; Gridley, S.; Garceau, N.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G.; Immobilization of Acetylcholinesterase in Lipid Membranes Deposited on Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2010**, *26*, 18884.
173. Oliveira, D. P. C.; Ribeiro, F. W. P.; Becker, H.; Lima-neto, P.; Correia, A. n.; Biosensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para determinação de fenol em efluentes. *Quim. Nova* **2015**, *38*, 924.

- 
174. Marques, C. V. V. C. O.; Marques, P. R. B. O.; Nunes, G. S.; Biossensor Aperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. *Pesticidas: Revista da Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2006**, *16*, 81.
175. Arduini, F.; Ricci, F.; Tuta, C. S.; Moscone, D.; Amine, A.; Palleschi, G.; Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. *Anal. Chem. Acta* **2006**, *580*, 155.
176. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
177. Li, C-P.; Fan, S.; Yin, C.; Zhang, N.; Du, S.; Zhao, H. Carboxylic silica nanosheet-platinum nanoparticle modified glass carbon electrodes for pesticide detection. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 1914.
178. Arduini, F.; Guidone, S.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone, D.; Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensor. Actuact. B-Chem.* **2013**, *179*, 201.
179. Bucur, B.; Danet, A. F.; Marty, J. I.; Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 217.
180. Li, Y.; Zhang, Y.; Han, G.; Xiao, Y.; Li, M.; Zhou, W. An Acetylcholinesterase Biosensor Based on Graphene/ Polyaniline Composite Film for Detection of Pesticides. *Chinese J. Chem.* **2016**, *34*, 82.
181. Zhao, H.; Ji, X.; Wang, B.; Wang, N.; Li, X.; Ni, R.; Ren, J.; An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- $\beta$ -cyclodextrin/Prussian bluechitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *65*, 23.
182. Jeyapragasam, T.; Saraswathi, R.; Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide-chitosan nanocomposite. *Sensor. Actuact. B-Chem.* **2014**, *191*, 681.
183. Ha, T. B.; Le, H. T.; Cao, H. H.; Binh, N. T.; Nguyen, H. L.; Dang, L. H.; Do, Q. P.; Nguyen, D. T.; Lam, T. D.; Nguyen, V-A.; Electro-Immobilization of Acetylcholinesterase Using Polydopamine for Carbaryl Microsensor. *J. Electron. Mater.* **2018**, *47*, 1686.

- 
184. Song, Y.; Chen, J.; Gong, C.; Shen, Y.; Song, Y.; Wang, L.; A simple electrochemical biosensor based on AuNPs/MPS/Au electrode sensing layer for monitoring carbamate pesticides in real samples. *J. Hazard. Mater.***2016**, *304*, 103.
185. Santos, C. S.; Mossanha, R.; Pessoa, C. A.; Biosensor for carbaryl based on gold modified with PAMAM-G4 dendrimer. *J. Appl. Electrochem.***2015**, *45*, 325.
186. Stepurska, K. V.; Soldatkin, O. O.; Kucherenko, I. S.; Arkhypova, V. M.; Dzyadevych, S. V.; Soldatkin, A. P.; Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. *Anal. Chim. Acta.***2015**, *854*, 161.
187. Raghu, P.; Reddy, M. M.; Reddy, T. M.; Swamy, B. E. K.; Reddaiah, K.; Sreedhar, M.; Development of Sol–Gel Immobilized Electrochemical Biosensor for the Monitoring of Organophosphorous Pesticides: A Voltammetric Method. *Anal. Bioanal. Electrochem.***2013**, *5*, 139.

## ANEXO

### Artigos científicos publicados durante o período de doutorado:

- 1) **Loguercio, L.F.**; Alves, C.C.; Thesing, A.; Ferreira, J. Enhanced electrochromic properties of a polypyrrole-indigo carmine-gold nanoparticles nanocomposite. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2015**, *17*, 1234-1240.
- 2) Antoni, L. O. **Loguercio, L.F.**; Rodrigues, M. R. F.; Fernandes J. A.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L. Effect of Gold Nanoparticles on the Structural and optical Stability of Poly (3-hexylthiophene). *Polymer Degradation and Stability*. **2015**, *123*, 62 - 68
- 3) Thesing, A. **Loguercio, L. F.**; Santos, M. J. L.. Ferreira, J. Simple Approach to Obtain a Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Based on poly(dimethylsiloxane)/ Gold Nanoparticles Nanocomposite. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2016**, *16*, 10080-10086.
- 4) **Loguercio, L. F.**; Demingos, P.; Manica, L. D. M.; Griep, J. B.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Simple One-Step Method to Synthesize Polypyrrole-Indigo Carmine-Silver Nanocomposite. *Journal of Chemistry*. **2016**, 2016, 1- 8.
- 5) Antoni, L. O. ; De Menezes, E. W. ; **Loguercio, L. F.**; Flores, R. M. R.; Lopes, D. A. R.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L. Ionic silsesquioxane-capped Au nanoparticle powders: Application in P3HT/PCBM solar cells and the effect of the capping layer on surface plasmon dumping. *Materials Chemistry and Physics*. **2018**, 206, 204 - 2012.
- 6) **Loguercio, L. F.**; Matos, C.; Oliveira, M.; Khan, S.; Dupont, J.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Synergistic interplay of ionic liquid and dodecyl sulphate driving the oxidation state of Polypyrrole based electrodes. *New Journal of Chemistry*. **2018**, 42, 13828-13835.
- 7) Thesing, A.; **Loguercio, L. F.**; Noremberg, B. S.; Alano, J. H.; Silva, R. M.; Orlandi, M. O.; Marin, G.; Ferreira, J.; Carreño, N. L. V. Tunable graphene oxide inter-sheet distance to obtain graphene oxide-silver nanoparticle hybrids. *New Journal of Chemistry*. **2019**, 43, 1285-1290.
- 8) **Loguercio, L. F.**; Matos, C.; Oliveira, M.; Khan, S.; Dupont, J.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Gold nanoparticles and polypyrrole hybrid thin films in ionic liquid media as counter-electrodes for dye-sensitized solar cells: Improving charge-transfer resistance at the CE/electrolyte interface. *Journal of The Electrochemical Society*. Aceito para publicação Janeiro de **2019**.

### **Trabalhos publicados em anais de congresso durante o período do doutorado:**

- 1) Demingos, P. G.; **Loguercio, L.F.**; Ferreira, J. Nanocomposite of gold nanoparticles and indigo carmine/dodecylsulfate doped polypyrrole as a potential electroactive materials. In: XIV Encontro da SBPMat, 2015, Rio de Janeiro - RJ. XIV Encontro da SBPMat, **2015**.
- 2) **Loguercio, L.F.**; Demingos, P. G. ; Manica, L. D. M.; Griep, J. B.; Santos, M. J. L. ; Ferreira, J. One-step approach to obtain polypyrrole-indigo carmine-silver nanoparticles nanocomposite: improved optical contrast and electroactivity. In: XV Encontro da SBPMat, 2016, Campinas-SP. XV Encontro da SBPMat, **2016**.
- 3) Manica, L. D. M.; **Loguercio, L.F.**; Demingos, P. G. ; Ferreira, J. Improved optical, electrochemical and morphological properties of silver nanoparticles/indigo carmine and dodecyl sulfate doped polypyrrole nanocomposites. In: XV Encontro da SBPMat, 2016, Campinas-SP. XV Encontro da SBPMat, **2016**.
- 4) Manica, L. D. M.; **Loguercio, L. F.**; Demingos, P., Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Filmes de nanocompósito de polipirrol dopado com índigo-carmim e dodecilsulfato de sódio, e decorados com nanopartículas de prata: Aplicação como sensor eletroquímica para detecção de ácido ascórbico. In: 1º MultiMAT, 2016, Porto Alegre. 1º MultiMAT, **2016**.
- 5) Thesing, A. ; **Loguercio, L.F.** ; Exner, A. ; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Simple Approach to Obtain a Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Based on poly(dimethylsiloxane) Gold Nanoparticles Nanocomposite. In: XV Encontro da SBPMat, 2016, Campinas-SP. XV Encontro da SBPMat, **2016**.
- 6) **Loguercio, L.F.**; Thesing, A.; Demingos, P. G. ; Santos, M. J. L.; Ferreira, J. Sensing platform obtained by Insitu electrochemical synthesis of gold nanoparticles on ITO substrate in aqueous/ionicliquid media: electrochemical and plasmonic sensor. In: XV Encontro da SBPMat, 2016, Campinas-SP. XV Encontro da SBPMat, **2016**.
- 7) **Loguercio, L. F.**; Thesing, A. ; Demingos, P. G. ; Ferreira, J. A study on the effect of stabilizing agents on the performance of sensing platforms based on gold nanoparticles. In: XVI MRS Brazil Meeting, 2017, Gramado. XVI MRS Brazil Meeting, **2017**.
- 8) **Loguercio, L. F.**; Demingos, P. G.; Ferreira, J. Enhancement of optical, electrochemical and electrochromic properties of gold nanoparticles/ indigo carmine doped polypyrrole nanocomposite by controlling the concentration of a surfactant as a secondary dopant. In: XVI MRS Brazil Meeting, 2017, Gramado. XVI MRS Brazil Meeting, **2017**.

9) Thesing, A.; **Loguercio, L. F.**; Alcazar, J. B. C.; Silva, R. M.; Orlandi, M. O.; Rhodes, R.; Silva, R. P. S.; Loi, M. R. ; Ferreira, J. ; Carreno, N. L. V. A simple methodology to chemically control the intersheet gallery distance of graphene nanosheets with silver nanoparticles incorporation. In: XVI MRS Brazil Meeting, 2017, Gramado. XVI MRS Brazil Meeting, **2017**.

10) Thesing, A. ; Damiani, E. ; **Loguercio, L.F.** ; Demingos, P. G. ; Santos, M. J. L. ; Ferreira, J. Formation of SrTiO<sub>3</sub> perovskite nanoparticles obtained by hydrothermal route using TiO<sub>2</sub> nanoparticles as precursor. In: XVII MRS Brazil Meeting, 2018, Natal - RN. Structural, optical and electronic properties of the metal-oxide nanostructures, **2018**.