

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TALLITA STÉFANNE E SILVA

SÍNTESE E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ELETROPLIMERIZAÇÃO DE
ÁCIDO 2-HIDROXIBENZOICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM
BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2019

TALLITA STÉFANNE E SILVA

**SÍNTESE E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ELETROPLIMERIZAÇÃO DE
ÁCIDO 2-HIDROXIBENZOICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM
BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Leoni Franco.

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2019

TALLITA STÉFANNE E SILVA

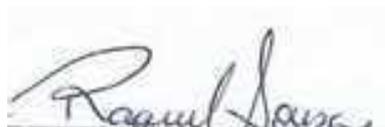
Síntese e otimização dos parâmetros de eletroplimerização de ácido 2-hidroxibenzoico para o desenvolvimento de um biossensor para detecção de pesticidas

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:



Diego Leoni Franco – IQ – UFU
Presidente



Raquel Maria Ferreira de Sousa – IQ – UFU
Membro



Marcos de Souza Gomes – IQ – UFU
Membro

Patos de Minas, Minas Gerais, 08 de julho de 2019.

*“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser conhecida.”*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao professor **Diego** por me orientar nesse trabalho de forma muito paciente e compreensiva, por compartilhar seu conhecimento em eletroquímica dentre outras áreas comigo e pela descontração com conversas sobre seriados, música e games.

À minha **mãe**, ao meu **pai** e à minha **vozinha** pelo apoio dentro e fora da graduação. Obrigada por sempre estarem ao meu lado nas épocas boas e ruins.

À professora **Djenaine** e aos colegas do **LEABE** com quem pude compartilhar os altos e baixos da rotina de laboratório e viver momentos inesquecíveis dentro e fora dele.

Ao **Gato** por ter presenciado inúmeras vezes o treino das minhas apresentações de seminários, de pôsteres e de demais trabalhos. À gatinha **Max** por ter feito companhia durante todos os momentos. Aos roedores **Jão das Neves** e **Tyrion** que foram essenciais para me ajudarem a passar por uma das fases mais difíceis do curso: segundo período.

Aos amigos que adquiri ao longo da faculdade: **Luís, Pequi, Elcana, Eric, Pedro, Vinicius, Laura** e **Flávia** pelos papos mais aleatórios e divertidos que poderiam existir, e por compartilharem os famosos dias de luta, dias de glória.

À **Lara** por escutar meus desabafos e frustrações desde o primeiro período até a etapa final, por me ajudar na escrita e apresentação desse trabalho, bem como de vários outros.

À **Bia**, pelos conselhos e pelas críticas, por ser empática nos meus momentos de frustração, pelas motivações sensacionais e por ser a melhor revisora gramatical possível.

À **Bárbara**, a qual, mesmo longe, sempre foi uma das pessoas que mais me deu suporte nos momentos bons e ruins da faculdade.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os **docentes da Universidade Federal de Uberlândia** que foram meus professores, por terem me inspirado na vida acadêmica e muitas vezes na vida pessoal também.

RESUMO

A otimização dos parâmetros de polimerização eletroquímica é um processo indispensável em diversas aplicações, como por exemplo, no desenvolvimento de biossensores, dispositivos usados nas mais diversas áreas como a ambiental, a de alimentos e a da saúde. Dentre as maiores dificuldades nesses estudos estão o alto custo e difícil condicionamento de eletrodos de trabalho, sendo contornado nesse trabalho pela utilização de eletrodos de carbono grafite de lapiseira. O ácido 2-hidroxibenzoico foi o monômero escolhido para modificação através de voltametria cíclica, originando um filme polimérico com grupos ácidos carboxílicos disponíveis para ligação com a enzima fosfatase alcalina. Estudos eletroquímicos e morfológicos foram feitos para caracterizar o material formado. Na otimização os melhores valores encontrados foram 1,0 mM de ácido 2-hidroxibenzoico, 0,25 M de ácido perclórico e 40 varreduras. Experimentos variando pH e velocidade de varredura foram utilizados para propor um mecanismo para a eletropolimerização. Quatro diferentes formas de imobilização da biomolécula foram avaliadas: adsorção em eletrodo limpo, ligação covalente em eletrodo limpo, adsorção em eletrodo modificado e ligação covalente em eletrodo modificado. A análise da resposta após a imobilização foi feita através de voltametria de pulso diferencial. O substrato 4-nitrofenilfosfato foi avaliado através da detecção do produto da reação enzimática 4-nitrofenol. O sistema utilizando ligação covalente em eletrodo modificado possuiu a resposta mais alta, mostrando ser uma alternativa para desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas organofosforados.

Palavras-chave: Ácido 2-hidroxibenzoico. Polimerização. Otimização. Biossensor enzimático. Fosfatase alcalina.

ABSTRACT

The optimization of the parameters of electrochemical polymerization is an indispensable process in several applications as in the development of biosensors, which are most used in the most diverse areas such as environmental, food and health. Among the major difficulties in these studies are the high cost and conditioning of working electrodes, being circumvented in this work by the use of pencil carbon graphite electrodes. 2-hydroxybenzoic acid was the monomer chosen for cyclic voltammetry, yielding a polymeric film with carboxylic groups available for attachment to the enzyme alkaline phosphatase. Electrochemical and morphological studies were done to characterize the formed material. In the optimization the best values were 1.0 mM 2-hydroxybenzoic acid, 0.25M perchloric acid and 40 cycles. Experiments changing the pH value and scanning speed were used to propose a mechanism for electropolymerization. Four different forms of immobilization of the biomolecule were evaluated: adsorption on clean electrode, covalent bond on clean electrode, adsorption on modified electrode and covalent bond on modified electrode. Response analysis after immobilization was done by differential pulse voltammetry. The substrate 4-nitrophenylphosphate was evaluated by detecting the enzymatic reaction product, 4-nitrophenol. The system using covalent bond in modified electrode presented the highest response, showing to be an alternative for the development of biosensors for the detection of organophosphate pesticides.

Keywords: 2-hydroxybenzoic acid. Polymerization. Optimization. Enzymatic biosensor. Alkaline phosphatase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus celsius
μL: microlitro
Ω: ohm
2-AHB: ácido 2-hidroxibenzoico
BR: tampão Britton-Robinson
C: coulomb
cm: centímetro
ECGL: eletrodo carbono grafite de lapiseira
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FA: fosfatase alcalina
J: joule
K: kelvin
kJ: quilojoule
kV: quilovolt
M: molar
mL: mililitro
mM: milimolar
mm: milímetro
mV: milivolt
NHS: *N*-hidroxisuccinimida
OPs: organofosforados
s: segundo
TRIS: tampão de tris(hidroximetil)aminometano
U: unidade
VC: voltametria cíclica
VPD: voltametria de pulso diferencial
V: volt

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Estrutura do ácido 2-hidroxibenzoico	13
Figura 2	-	Conexão entre o elemento biológico e o transdutor presentes em um biossensor	14
Figura 3	-	Estrutura quaternária da fosfatase alcalina de origem placentária em <i>Homo sapiens</i>	16
Figura 4	-	Estrutura básica de pesticidas organofosforados. X representa os elementos O, S e Se. L são halogênios, grupos alcóxidos, grupos alquil, aminas, dentre outros. R1 e R2 geralmente são grupos alcóxila.....	17
Figura 5	-	Representação de uma célula eletroquímica: (A) eletrodo auxiliar de platina; (B) eletrodo de trabalho de carbono grafite de lapiseira; (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 M); (D) solução aquosa em célula de vidro.	19
Figura 6	-	Representação do (A) eletrodo de trabalho imerso em 1cm de solução, conforme a (B) marcação com pincel, correspondendo à 0,289 cm ² da superfície do ECGL imersa	21
Figura 7	-	Funcionamento de um biossensor através da técnica de ligação covalente em eletrodo modificado, em que há a ativação de grupos funcionais ácido carboxílico com EDC/NHS.....	23
Figura 8	-	Voltamogramas cíclicos em soluções (A) K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0 mM contendo KCl 0,5 M (—) e em solução contendo apenas KCl 0,5 M (—); (B) azul de metileno 5,0 mM contendo KCl 0,5M (—) e em solução contendo apenas KCl 0,5 M (—); (D) HClO ₄ 0,5 M em ECGL	25
Figura 9	-	Diagrama de Nyquist para EIE de K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0 mM em solução KCl 0,5 M sobre EGCL. E = +0,250 V, ΔE = 10,0 mV, faixa de frequência de 10 ⁵ a 10 ² Hz. Inset: circuito equivalente padrão de Randles	26
Figura 10	-	Primeiro ciclo de VC em HClO ₄ 0,25 M com 2-AHB 1 mM, 50 mV.s ⁻¹ em ECG.....	27
Figura 11	-	Voltamogramas cíclicos de HClO ₄ 0,25 M contendo 2-AHB 1 mM, 50 mV.s ⁻¹ , 100 varreduras	27
Figura 12	-	Estrutura química da fenoxazina.....	28
Figura 13	-	Voltamogramas cíclicos de HClO ₄ 0,25 M, 50 mV.s ⁻¹ , sobre (--) eletrodo limpo e (--) eletrodo modificado com poli(2-AHB)	22
Figura 14	-	Voltamogramas cíclicos de (A) K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mM em KCl 0,5 M e (B) azul de metileno 5 mM em KCl 0,5 M sobre (--) eletrodo limpo e (--) eletrodo modificado com poli(2-AHB). A velocidade de varredura em ambos os casos foi de 100 mV.s ⁻¹	29
Figura 15	-	Diagrama de Nyquist para EIE de K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0 mM em solução KCl 0,5 M sobre EGCL. E = +0,250 V, ΔE = 10,0 mV, faixa de frequência de 10 ⁵ a 10 ² Hz sobre (◀) ECGL e (■) ECGL modificado. Inset: circuitos equivalentes para cada medida.....	30
Figura 16	-	Perfil dos picos (-■-) anódico e (-●-) catódico versus concentração do monômero. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5M, 100 mV.s ⁻¹ . (B) Solução de ácido perclórico 0,5 M, 50 mV.s ⁻¹	31
Figura 17	-	Perfil dos picos (-■-) anódico e (-●-) catódico versus concentração do ácido perclórico. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5M, 100mV/s. (B) Solução de ácido perclórico 0,5M, 50mV/s	32

Figura 18	-	Perfil dos picos (-■-) anódico e (-●-) catódico <i>versus</i> número de varreduras. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5M, 100 mV.s ⁻¹ . (B) Solução de ácido perclórico 0,5 M, 50 mV.s ⁻¹	33
Figura 19	-	Micrografias obtidas por MEV. (A) ECGL limpo amplificado em 100x, (B) ECGL modificado com poli(2-AHB) amplificado em 100x, (C) ECGL limpo amplificado em 5000x e (D) ECGL modificado com poli(2-AHB) amplificado em 5000x.....	34
Figura 20	-	Perfil de potencial de pico <i>versus</i> pH obtidos de voltamogramas cíclicos em soluções de tampão BR 0,4 M contendo 2-AHB 1,0mM, 50mV/s.....	35
Figura 21	-	(A) Raiz da velocidade de varredura e (B) velocidade de varredura aplicada <i>versus</i> corrente do pico de oxidação do 2-AHB.....	37
Figura 22	-	<i>log</i> da velocidade aplicada <i>versus log</i> da corrente do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de 60 mV.s ⁻¹ consideradas.....	38
Figura 23	-	Potencial do pico de oxidação do 2-AHB <i>versus log</i> da corrente do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de 175 mV.s ⁻¹ consideradas.	39
Figura 24	-	<i>log</i> da velocidade aplicada <i>versus</i> potencial do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de 175 mV.s ⁻¹ consideradas.....	40
Figura 25	-	Proposta de mecanismo para a eletropolimerização do 2-AHB.....	41
Figura 26	-	Perfil dos picos de corrente anódicos (■) e picos de corrente catódicos (●) por tempo obtidos dos voltamogramas cíclicos em solução K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mM em KCl 0,5 M, velocidade de 100 mV.s ⁻¹ . Pico de corrente anódico (▲) e catódico (▼) obtido para o eletrodo limpo.....	42
Figura 27	-	1/temperatura <i>versus log</i> da divisão da corrente do pico de oxidação do 2-AHB pela área modificada do ECGL. (--) 6 a 16 °C. (--) 21 a 31 °C ...	44
Figura 28	-	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre ECGL limpo contendo a enzima fosfatase alcalina (5 U) imobilizada por adsorção (—), imobilizada por ligação covalente através de EDC/NHS (—), ECGL com poli(2-AHB) com enzima imobilizada por adsorção (—) e imobilizada por ligação covalente através de EDC/NHS (—) em solução contendo 1,0 mM de 4-nitrofenilfosfato em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9, 10 mV.s ⁻¹	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Polímeros condutores.....	12
2.2 Ácido 2-hidroxibenzoico	13
2.3 Biossensores.....	14
2.4 Biossensores enzimáticos.....	15
2.5 Fosfatase alcalina	16
2.6 Pesticidas organofosforados.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 A célula eletroquímica	19
4.2 Preparo de soluções.....	20
4.3 Preparo dos eletrodos e modificação com ácido 2-hidroxibenzoico	20
4.4 Caracterização morfológica	22
4.5 Imobilização da fosfatase alcalina	22
4.6 Detecção de 4-nitrofenilfosfato.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Padronização dos eletrodos de trabalho	23
5.2 Eletropolimerização do ácido 2-hidroxibenzoico	26
5.3 Caracterização do poli(2-AHB)	28
5.4 Otimização na eletropolimerização do ácido 2-hidroxibenzoico.....	31
5.5 Caracterização morfológica do poli(2-AHB).....	34
5.6 Oxidação do 2-AHB em diferentes pHs	35
5.7 Oxidação do 2-AHB em diferentes velocidades de varredura.....	36
5.8 Mecanismo de eletropolimerização do 2-AHB.....	40
5.9 Estudo da estabilidade do poli(2-AHB).....	42
5.10 Estudo da temperatura de eletropolimerização do 2-AHB	43
5.11 Detecção de 4-nitrofenilfosfato.....	44
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são amplamente utilizados no setor agrícola para o controle de pragas capazes de danificar plantas e de prejudicar no rendimento da produção (RIBEIRO et al., 2008). Apesar disso, estima-se que menos de 0,1% desses compostos consegue realmente atingir as pragas indesejáveis, enquanto os demais 99,99% são encontrados na água e no solo como contaminantes e, conseqüentemente, geram problemas graves para a saúde humana devido à sua toxicidade (SABIK et al., 2000). Os pesticidas organofosforados (OPs) são uma classe de pesticidas com alta capacidade neurotóxica, em que a enzima acetilcolinesterase é seu principal alvo, de forma a prejudicar o metabolismo do neurotransmissor acetilcolina (CAVALCANTE et al., 2016). Devido aos problemas que esses defensivos agrícolas podem causar, é de grande interesse o desenvolvimento de um método sensível e seletivo capaz de qualificar e quantificar os OPs de forma rápida e simples, sendo os biossensores uma alternativa viável.

Atualmente, os biossensores são utilizados em diversas áreas, abrangendo a da saúde, até a de alimentos e a da agropecuária. O exemplo mais conhecido popularmente é o sensor de glicose, usado para quantificar esse monossacarídeo no sangue de diabéticos (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016). Esses dispositivos são conhecidos pela sua alta especificidade, baixo custo e de não precisarem de mão de obra qualificada para manuseio (WANG, 2000). Podem ter transdutores ópticos, eletroquímicos ou pizoelétricos (ALVES, 2014), em que ocorre a imobilização de moléculas biológicas, tais como, ácidos nucleicos, enzimas, receptores celulares, células inteiras e anticorpos (VO-DINH; CULLUM, 2000).

No caso de biossensores enzimáticos, o transdutor é capaz de processar o sinal gerado pela presença do substrato ou produto provenientes da catálise da enzima (TAMER; HASSAN; OMER, 2016). No transdutor eletroquímico, o eletrodo utilizado para o desenvolvimento do dispositivo ainda pode ter sua superfície modificada com material polimérico possuindo grupos funcionais capazes de interagir fortemente com a enzima, a fim de melhorar o sinal da detecção (ALVES et al., 2016). O ácido 2-hidroxibenzoico (2-AHB) é um monômero interessante para a modificação do eletrodo de trabalho, já que possui um grupo carboxila que ao final da polimerização deve estar livre para se que a enzima consiga se ligar covalentemente.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima amplamente encontrada no metabolismo humano a qual se encontra majoritariamente presente em células ósseas e hepáticas. Dessa forma, altas concentrações de FA no sangue são indicativas de diversas patologias (DAVIDSON et al., 2019). Por catalisar reações que retiram um grupo fosfato de moléculas

orgânicas (NELSON; COX, 2014), a FA é susceptível à imobilização em um biossensor para detecção de OPs, já que esses compostos geralmente são ésteres de ácidos fosfóricos e seus derivados (BARBOZA et al., 2018).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Polímeros condutores

Desde a metade do século XX, existe a ideia de criar materiais capazes de combinar as propriedades mecânicas dos polímeros e as propriedades elétricas dos metais, mas apenas na década de 1970 foi possível prepará-los (FAEZ et al., 2000). Esses compostos, denominados polímeros condutores, são caracterizados por cadeias contendo ligações pi entre carbonos conjugados, provocando fluxo de elétrons em determinadas condições e possibilitando reações de oxidação e redução no polímero (AUGUSTO, 2009).

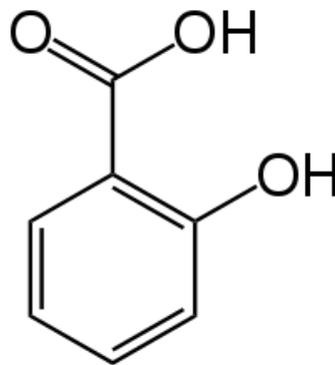
A formação dos polímeros, condutores ou não, pode ser feita através de técnicas eletroquímicas (GATO et al., 2008), sendo a voltametria cíclica (VC) a mais utilizada para se obter informações qualitativas. Nesse método, é feita a aplicação de uma faixa de potencial com o tempo para que seja realizada uma medida de corrente. Vários ciclos podem ser feitos formando um polímero na superfície de um eletrodo condutor (PACHECO et al., 2013). A caracterização do material polimérico pode ser feita por técnicas eletroquímicas, espectroscópicas e microscópicas, as quais são capazes de fornecer informações sobre as propriedades elétricas e ópticas do composto, além de permitir visualizar as alterações ocorridas no eletrodo modificado (ALVES et al., 2017).

Uma das aplicações dos polímeros condutores é o estudo e desenvolvimento de biossensores, pois são macromoléculas com a possibilidade de presença de grupos funcionais susceptíveis a interagir com biomoléculas (ALVES et al., 2016). Outro atributo importante dos polímeros condutores é a capacidade de imobilizar apenas a biomolécula de interesse, eliminando a possibilidade de interferentes indesejados interagirem com o eletrodo modificado (FRANCO et al., 2008).

2.2 Ácido 2-hidróxibenzoico

O ácido salicílico ou ácido 2-hidroxibenzoico (2-AHB) é um β -hidroxiácido com presença de um anel aromático e dois grupos funcionais (**Figura 1**), sendo esses um grupo hidroxila (-OH) e uma carboxila (-COOH). O monômero apresenta-se em forma de pó branco inodoro com ponto de fusão e ebulição à 159 e 211°C, respectivamente. Possui número CAS 69-72-7, massa molar 138,123g/mol e fórmula molecular $C_7H_6O_3$ (OLIVEIRA; FILHO; ANDRADE, 2011).

Figura 1 – Estrutura do ácido 2-hidroxibenzoico.



Fonte: Chemical of the day, 2014.

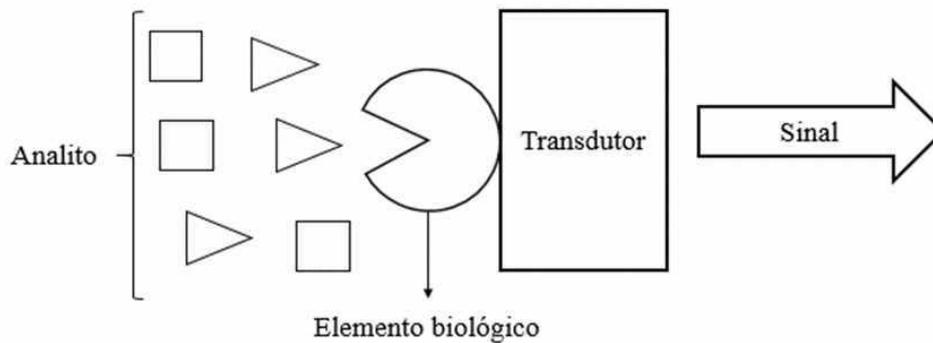
O anel aromático no centro da molécula pode promover uma melhora na condutividade além de proteger contra adsorção de interferentes durante a polimerização. O grupo hidroxila também é importante para a modificação do eletrodo, possibilitando o ataque nas moléculas de 2-AHB e formação do polímero. Por fim, a carboxila inalterada durante o processo permite que o polímero consiga interagir com moléculas biológicas (ALVES-BALVED, 2016).

O 2-AHB é encontrado naturalmente em folhas e órgãos reprodutivos de plantas, sendo amplamente utilizado pela indústria cosmética e pela dermatologia devido às suas propriedades queratolíticas e antimicrobianas (OLIVEIRA; FILHO; ANDRADE, 2011). Já foram realizados estudos sobre a eletropolimerização empregando VC e utilização de eletrodo modificados com 2-AHB (ALVES, 2014) e alguns de seus isômeros, como o ácido 4-hidroxibenzoico (FERREIRA, 2011), ambos empregando ácido perclórico como eletrólito suporte. Nesses estudos, obteve-se polímeros com estruturas funcionalizadas com grupos carboxila livres e estruturas com caráter aniônico, mostrando que eletrodos modificados com derivado deste monômero têm as características necessárias para o desenvolvimento de biossensores.

2.3 Biossensores

Os biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações bioquímicas para detectar analitos específicos. O dispositivo acopla um elemento biológico responsável por interagir com o analito alvo e um transdutor (**Figura 2**) capaz de converter a interação biológica em um sinal elétrico que possa ser amplificado e lido (WANG, 2000).

Figura 2 - Conexão entre o elemento biológico e o transdutor presentes em um biossensor.



Fonte: A autora, 2019.

Diversos materiais podem ser empregados como transdutores, dentre eles o ouro (UNTIVEROS et al., 2019), o carbono grafite (ALVES-BALVED, 2016) e o carbono grafite de lapiseira (PURUSHOTHAMA et al., 2018). Essa parte do dispositivo é responsável por converter as reações bioquímicas em um sinal elétrico mensurável, sendo o óptico, o eletroquímico e o pizoelétrico alguns dos diferentes tipos utilizados para o desenvolvimento do biossensor (ALVES, 2014). O transdutor eletroquímico baseia-se no movimento de íons e na difusão de espécies eletroativas. Suas principais vantagens consistem na alta sensibilidade e estabilidade, baixo custo e detecção rápida (VO-DINH; CULLUM, 2000).

Dentre os eletrodos baseados em carbono, os eletrodos carbono grafite de lapiseira (ECGLs) têm chamado bastante atenção devido ao seu baixo custo, acessibilidade, boa adsorção, condutividade, alta sensibilidade, facilidade de preparação e de manipulação (YARDIM, 2011), com respostas semelhantes e até melhores comparando-se com os eletrodos de carbono grafite comercial (TORRINHA et al., 2018). Além disso, a superfície dos ECGLs pode ser renovada quando necessário, já que as reações eletroquímicas podem causar alterações em suas propriedades (PURUSHOTHAMA et al., 2018).

Os biossensores ainda podem ser classificados quanto as moléculas biológicas imobilizadas, podendo ser anticorpos (TZOUVADAKIA et al., 2019), células eucariotas (GUI

et al., 2017) e procariotas (CHANG et al., 2017), ácidos nucleicos (FRANCO, 2010) ou enzimas (FRASER, 2018).

2.4 Biossensores enzimáticos

A grande maioria das enzimas são proteínas, a exceção está em um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas. Essas biomoléculas são responsáveis por catalisar reações químicas essenciais para a condição de vida, de forma que sua atividade depende exclusivamente da sua conformação proteica nativa (NELSON; COX, 2014). As enzimas são conhecidas pela alta seletividade na conversão de substrato em produto (MARZZOCO; BARROS, 2007), podendo então ser utilizadas para desenvolvimento de biossensores que necessitam de uma alta especificidade. Além disso, esse tipo de biomolécula é comum em casos em que não é possível a detecção direta do substrato, sendo assim, parâmetros como a velocidade da reação enzimática e a concentração de substrato ou produto podem ser empregadas para mensurar o material de interesse (TAMER; HASSAN; OMER, 2016).

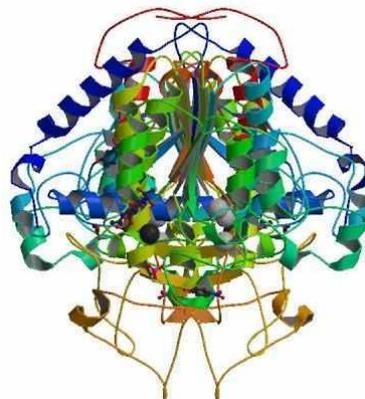
Existem várias técnicas para imobilização enzimática, sendo as mais comuns a adsorção física (JÖNSSON; GORTON, 1989), a reticulação (AKYILMAZ; TUREMIS, 2010), o aprisionamento (MONIER; YOUSSEF; ABDEL-LATIF, 2018) e a ligação covalente (DAS et al., 2018). Não há uma técnica específica capaz de ser aplicada a todas as enzimas devido às diferentes características físico-químicas de cada uma. Ademais, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens (SOUZA et al., 2017).

Apesar de a adsorção física ser rápida e de fácil manipulação, comparando-se com as demais, não possui estabilidade, podendo ocorrer perda de adsorção da enzima em alterações de pH e temperatura, por exemplo (TAMER; HASSAN; OMER, 2016). O aprisionamento possui uma boa durabilidade, mas como a polimerização é feita juntamente com a imobilização da molécula, a probabilidade de que os sítios ativos da enzima fiquem indisponíveis aumenta consideravelmente. Por fim, a reticulação e a ligação covalente são opções mais trabalhosas e demoradas, mas que permitem uma boa estabilidade proveniente de ligações fortes entre a biomolécula e o polímero formado na superfície do eletrodo, que por sua vez, deve apresentar grupos funcionais para tal finalidade (SOUZA et al., 2017).

2.5 Fosfatase alcalina

As hidrolases são enzimas que realizam a catálise de moléculas orgânicas utilizando água. Dentro deste grupo existem as fosfatases, as quais retiram um grupo fosfato, produzindo uma molécula com grupo hidroxila livre e um íon fosfato livre (NELSON; COX, 2014). A FA (**Figura 3**) é uma proteína capaz de hidrolisar monoésteres de fosfato, pirofosfato, diésteres de fosfato, além de catalisar reações de transfosforilação. No geral, é uma enzima intracelular, de forma que apenas uma pequena porção se encontra no plasma. Como o próprio nome sugere, tem atividade ótima em pH mais elevado, entre 8 e 11 (SIMÃO, 2008).

Figura 3 – Estrutura quaternária da fosfatase alcalina de origem placentária em *Homo sapiens*.



Fonte: Protein data bank, 2013.

Em adultos, uma pequena parte da FA é sintetizada no intestino e na placenta, porém a maior parte tem origem óssea e hepática. Quando a concentração da enzima aumenta no plasma sanguíneo, pressupõe-se que houve a ruptura de células que apresentem FA (DAVIDSON et al., 2019), mostrando indícios de doenças como fibrose cística (BROCK, 1983), colangite esclerosante primária (DE VRIES et al., 2016), calcifilaxia (NIGWEKAR et al., 2015), neoplasia óssea (PECHERSTORFER et al., 1995), dentre outras. Atualmente, o diagnóstico dessas patologias é feito através de hemograma e de ensaios de ELISA, que são testes capazes de quantificar a enzima no plasma sanguíneo.

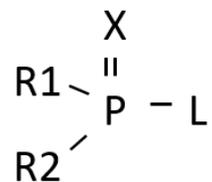
Já existem relatos mostrando que a FA pode ser imobilizada sem que ocorra a perda de sua atividade catalítica, como, por exemplo, no estudo de Homaei (2017), em que a imobilização foi feita para detecção de metais pesados e também no de Hanachi e colaboradores (2015), ao qual foi possível imobilizar a FA utilizando a técnica de reticulação.

2.6 Pesticidas organofosforados

A fim de aumentar a produção agrícola e evitar perdas, pesticidas ou agrotóxicos são amplamente utilizados para combater pragas, tais como, ervas daninhas e insetos (RIBEIRO et al., 2008). Em primeiro momento, eram utilizados compostos de origem natural, como a nicotina e o pireto, e, posteriormente, agentes químicos começaram a ser sintetizados artificialmente (COUTINHO et al., 2006). Apesar de sua proficiência, os pesticidas são poluentes encontrados no solo e na água, podendo causar graves danos à saúde humana devido à sua toxicidade (SABIK et al., 2000).

Os OPs são compostos definidos quimicamente como aqueles que, além do fósforo, possuem um átomo de carbono em sua estrutura, normalmente ésteres de ácidos fosfóricos e seus derivados (**Figura 4**). Esses compostos começaram a ser amplamente usados no setor agropecuário nos últimos 60 anos devido às suas propriedades inseticida, herbicida e reguladora de crescimento de plantas. Além disso, foram uma alternativa para substituir os pesticidas organoclorados, que possuem uma degradação mais demorada e causam mais danos ambientais (BARBOZA et al., 2018).

Figura 4 – Estrutura básica de pesticidas organofosforados. X representa os elementos O, S e Se. L são halogênios, grupos alcóxidos, grupos alquil, aminas, dentre outros. R1 e R2 geralmente são grupos alcoxila.



Fonte: A autora, 2019.

Os OPs têm ação neurotóxica e inibem irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação do principal neurotransmissor no sistema nervoso de insetos, a acetilcolina. A inibição da atividade enzimática leva ao acúmulo do neurotransmissor nas sinapses, comprometendo a transmissão do sinal e levando à morte (CAVALCANTE et al., 2016).

Devido aos problemas ambientais e efeitos tóxicos que os OPs podem causar em organismos aquáticos e seres humanos, é importante desenvolver um método mais eficaz para sua detecção. Já foi possível o desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos para tal finalidade, como no caso do estudo de Liu e Lin (2006), em que a enzima

acetilcolinesterase foi imobilizada sobre a superfície de nanotubos de carbono. Como a FA possui afinidade para OPs, a enzima surge como uma alternativa para o desenvolvimento de um novo biossensor enzimático.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do projeto consiste em polimerizar de maneira eletroquímica o derivado de ácido 2-hidroxibenzoico em eletrodo de carbono de grafite de lapiseira, com o intuito de disponibilizar grupos funcionais para imobilizar a enzima fosfatase alcalina e, por fim, detectar pesticidas organofosforados.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento voltamétrico do ácido 2-hidroxibenzoico sobre a superfície do eletrodo de carbono de grafite de lapiseira;
- Modificar a superfície de eletrodos de carbono de grafite de lapiseira com polímero derivado de ácido 2-hidroxibenzoico;
- Caracterizar eletroquímica e morfologicamente o material formado sobre o eletrodo;
- Otimizar e avaliar os efeitos dos parâmetros de imobilização e polimerização em diferentes aspectos, tais como, concentração do monômero, concentração do eletrólito suporte, velocidade de varredura, número de varreduras, faixa de potencial, temperatura da solução e pH;
- Ativar os eletrodos modificados com o polímero derivado de ácido 2-hidroxibenzoico com EDC/NHS para permitir a imobilização da fosfatase alcalina;
- Detectar o produto da reação enzimática e comparar os valores de detecção com os resultados obtidos nos eletrodos sem modificação e nos eletrodos modificados com enzima imobilizada apenas por adsorção.

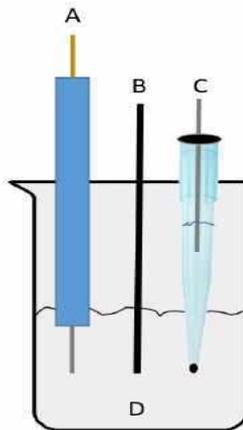
4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Eletroquímica Aplicada a Biotecnologia e Engenharia de Alimentos (LEABE), na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas. As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, campus Uberlândia. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada adquirida pelo processo de osmose reversa pelo modelo 0550LX-Gehaka.

4.1 A célula eletroquímica

A célula escolhida foi de vidro em compartimento único, contendo três eletrodos (**Figura 5**): o eletrodo de prata, cloreto de prata, cloreto de potássio 3 M (Ag/AgCl/ KCl 3 M) como referência; o eletrodo de platina como auxiliar; e o eletrodo de carbono grafite de lapiseira 0,9 mm, dureza HB da marca Pentel®, super Hi-Polyme 505C como eletrodo de trabalho.

Figura 5 – Representação de uma célula eletroquímica: (A) eletrodo auxiliar de platina; (B) eletrodo de trabalho de carbono grafite de lapiseira; (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 M); (D) solução aquosa em célula de vidro.



Fonte: A autora, 2018.

Os experimentos foram feitos utilizando potenciostato PGSTAT204 e o software NOVA 2.0.2, ambos da Metrohm.

4.2 Preparo de soluções

Os experimentos foram realizados utilizando as seguintes soluções:

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M em meio aquoso;
- Ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5,0 mM em meio de cloreto de potássio (KCl) 0,5 M;
- Cloreto de potássio (KCl) 0,5 M;
- Azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) 5,0 mM em meio de cloreto de potássio (KCl) 0,5 M;
- Ácido perclórico (HClO_4) 0,25 M;
- Ácido 2-hidroxibenzoico (2-AHB) 1,0 mM em meio de ácido perclórico (HClO_4) 0,25 M;
- Tampão Britton-Robinson (BR) 0,4 M;
- Tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 0,1 M pH 9,0;
- 4-nitrofenilfosfato 1,0 mM em tampão TRIS 0,1 M pH 9,0;
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,05 M e N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,016 M, em tampão de 2-(N-morfolino)ácido etanossulfônico (MES) 0,1 M pH 4,5;
- Fosfatase alcalina, em que, a FAL do frasco original foi diluída em 3,0 mL do tampão TRIS 0,1 M pH 9,0 com 20,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2) até a concentração final de $3,278 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, denominada solução estoque e armazenada à $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ em congelador.

Algumas soluções tiveram suas concentrações alteradas durante os experimentos para otimização.

4.3 Preparo dos eletrodos e modificação com ácido 2-hidroxibenzoico

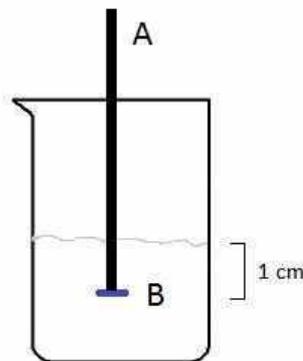
Por se tratar de grafites de lapiseira comuns, foi necessária a limpeza dos eletrodos devido à presença de cera em sua superfície. A cera é responsável por dar um aspecto mais liso ao grafite e facilitar sua ejeção pela lapiseira (TORRINHA et al., 2018). A limpeza dos ECGLs foi feita mecanicamente com lixas d'água número 400, em seguida, foram lavados com água deionizada e banhados em ultrassom por 5 minutos para remover resíduos que poderiam ter permanecido após o processo. Além disso, os ECGLs foram pré-tratados aplicando-se um potencial de $-1,5 \text{ V}$ em 0,5 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ por 100 segundos, a fim

de melhorar a estabilidade e a sensibilidade dos ECGLs (NEZHADALI; MEHRI; SHADMEHRI, 2018).

Após a limpeza, foram realizadas VCs em soluções de KCl, $K_3Fe(CN)_6$ em KCl e $C_{16}H_{18}ClN_3S$ em KCl para obter a padronização dos eletrodos de trabalho para sua modificação. Posteriormente, VCs foram realizadas em $HClO_4$ para comprovar a limpeza do eletrólito suporte, da célula eletroquímica e dos ECGLs. Os eletrodos considerados adequados tiveram suas superfícies modificadas com filme polimérico em solução de 2-AHB em $HClO_4$, também utilizando VC. A voltametria cíclica é uma técnica caracterizada pela aplicação de um potencial sobre o eletrodo de trabalho, gerando uma corrente elétrica. Nessa técnica, o potencial é invertido ao final da primeira varredura, tendo a vantagem de que o produto da reação redox da primeira etapa da varredura possa ser analisado novamente no voltamograma reverso (PACHECO et al., 2013).

Para que os eletrodos de trabalho possuíssem a mesma área geométrica modificada garantindo a reprodutibilidade dos experimentos, exato 1 cm da superfície era imersa nas soluções, correspondendo à uma área geométrica de $0,289\text{ cm}^2$ (**Figura 6**).

Figura 6 – Representação do (A) eletrodo de trabalho imerso em 1 cm de solução, conforme a (B) marcação com pincel, correspondendo à $0,289\text{ cm}^2$ da superfície do ECGL imersa.



Fonte: A autora, 2019.

Após a polimerização, os ECGLs foram analisados novamente em soluções de KCl, $K_3Fe(CN)_6$ em KCl, $C_{16}H_{18}ClN_3S$ em KCl e $HClO_4$. As informações adquiridas puderam caracterizar o polímero formado, com o intuito de otimizar os parâmetros de concentração do monômero, a concentração do eletrólito suporte e o número de varreduras na VC. Além disso, avaliou-se a influência da velocidade de varredura na VC, o tempo de armazenamento do eletrodo modificado e a temperatura da solução, sendo o último parâmetro realizado com as

soluções imersas em banho d'água com temperatura constante em um aparelho de banho ultratermostatizado.

Com finalidade de diminuir a área da superfície do eletrodo e possibilitar o gotejamento da solução com fosfatase alcalina com praticidade, foi utilizado esmalte base comercial para unhas, com o intuito de que apenas a parte circular nas extremidades dos ECGLs ficasse disponível para a modificação. Por se tratar de um material isolante, esmaltes para unhas são utilizados desde a década de 90 para isolar a superfície de eletrodos baseados em carbono (NOWALL; DONTA; KUHR, 1998) e ouro (WANG; PAMIDI, 1997). Quando funcional, esse método apresenta diversas vantagens: é rápido, tem baixo custo, fácil manuseio e possibilidade de reutilização dos eletrodos (PRADELA-FILHO et al., 2017). Sendo assim, os ECGLs foram imersos em esmalte base de unha por 3 segundos, depois foram retirados e deixados à temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos para secagem. Posteriormente, foi feita a limpeza dos eletrodos apenas na área circular de uma de suas extremidades, seguindo o protocolo já descrito no início desta sessão.

4.4 Caracterização morfológica

A morfologia do polímero formado pode ser caracterizada por MEV. O microscópio utilizado foi um VEGA3 da marca TESCAN. Possui magnificações de 100 a 5000 vezes, cobertura de ouro e aceleração de 5 kV.

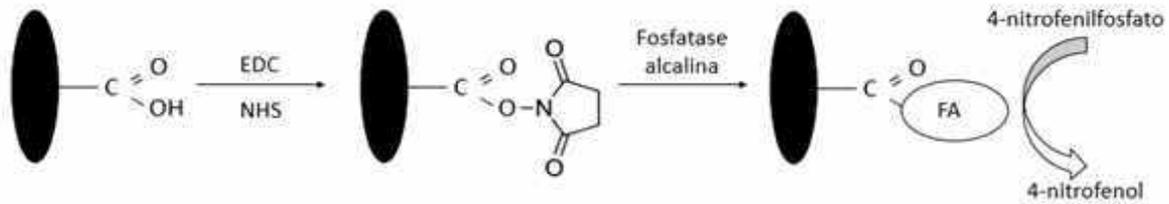
4.5 Imobilização da fosfatase alcalina

Quatro diferentes formas de imobilização enzimática foram testadas para avaliar divergências entre as respostas, sendo elas:

- Adsorção em eletrodo limpo;
- Ligação covalente em eletrodo limpo;
- Adsorção em eletrodo modificado com polímero;
- Ligação covalente em eletrodo modificado com polímero

No caso das ligações covalentes, há a ativação de grupos funcionais ácido carboxílico do poli(2-AHB), os quais se encontram livres após a modificação do ECGL (**Figura 7**). O mesmo foi feito sobre o eletrodo limpo em questão de comparação e devido ao conhecimento da presença natural de grupos funcionais sobre a superfície.

Figura 7 – Funcionamento de um biossensor através da técnica de ligação covalente em eletrodo modificado, em que há a ativação de grupos funcionais ácido carboxílico com EDC/NHS.



Fonte: A autora, 2018.

Nos quatro procedimentos, foi gotejado 1,4 μL (4,6 U) da solução estoque de FAL. Nos sistemas de ligação covalente, os eletrodos foram ativados com EDC/NHS antes do gotejamento, sendo imersos em solução desse composto por 1 hora. Em todas as metodologias, foi necessário esperar 1 hora para a secagem da solução contendo FA. Finalmente, os eletrodos foram lavados em solução TRIS para retirar o excesso de enzima que não foi capaz de interagir com o filme polimérico derivado de 2-AHB.

4.6 Detecção de 4-nitrofenilfosfato

O biossensor funcional deve detectar o produto da reação catalisada pela FA, o 4-nitrofenol. O substrato dessa reação é o 4-nitrofenilfosfato. A análise foi feita através de voltametria de pulso diferencial (VPD) em eletrodos sem a enzima e eletrodos com o componente biológico imobilizado em sua superfície a partir dos quatro procedimentos citados no item 4.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização dos eletrodos de trabalho

Uma forma confiável de saber se o eletrodo de trabalho apresenta a qualidade necessária para modificação é através de VC (**Figura 7**) em solução contendo ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (sonda aniônica). Em contrapartida, azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) foi utilizado

para avaliação do eletrodo como sonda catiônica. Foi obtido o voltamograma em solução contendo apenas KCl montado na **Figura 7A**, aplicando-se o mesmo potencial para $K_3Fe(CN)_6$.

O ferricianeto de potássio como eletrólito suporte é conhecido por sua reversibilidade devido à presença do par Fe^{3+}/Fe^{2+} (ASSIS; SILVA; LOPES, 2010), o que torna possível identificar interferentes faradaicos. Para comprovação utiliza-se a equação de Nernst:

$$E = E^{\circ} - \left(\frac{0,059}{n} \right) \log Q$$

Em que:

E = potencial em condições não-padrão (V);

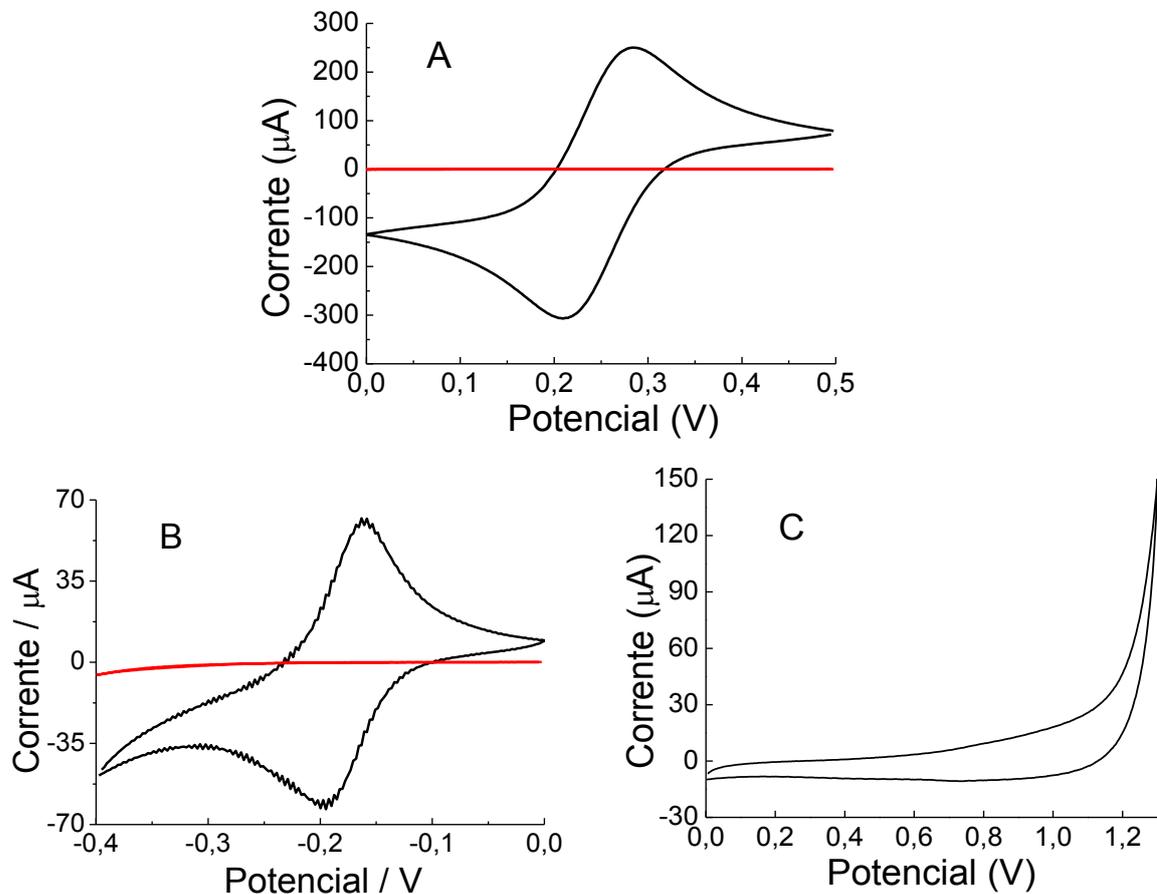
E° = potencial padrão (V);

n = número de elétrons transferidos na semi-reação (adimensional);

Q = quociente de reação (adimensional).

Sabendo-se que a diferença de potencial mínima em um sistema reversível com transferência de 1 elétron é de aproximadamente 59 mV, valores similares indicam que a superfície do eletrodo de trabalho está limpa e permite a reversibilidade do par Fe^{3+}/Fe^{2+} (MACHADO, 2014). A VC clássica desse sistema pode ser vista na **Figura 8A**. Na curva em preto está a resposta em $K_4Fe(CN)_6$ em KCl e em vermelho a resposta somente em solução de KCl, não havendo resposta faradaica, como desejado. Na **Figura 8B** temos a mesma situação para a sonda catiônica azul de metileno em KCl e, em vermelho, a resposta somente na solução de KCl. Na **Figura 8C**, a ausência também de resposta faradaica em $HClO_4$ na região de eletropolimerização atesta que água deionizada utilizada para o preparo da solução, ferricianeto de potássio, azul de metileno, o $HClO_4$ e o eletrodo de trabalho estavam livres de contaminantes.

Figura 8 – Voltamogramas cíclicos em soluções (A) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM contendo KCl 0,5 M (—) e em solução contendo apenas KCl 0,5 M (—); (B) azul de metileno 5,0 mM contendo KCl 0,5 M (—) e em solução contendo apenas KCl 0,5 M (—); (C) $HClO_4$ 0,5 M em ECGL.



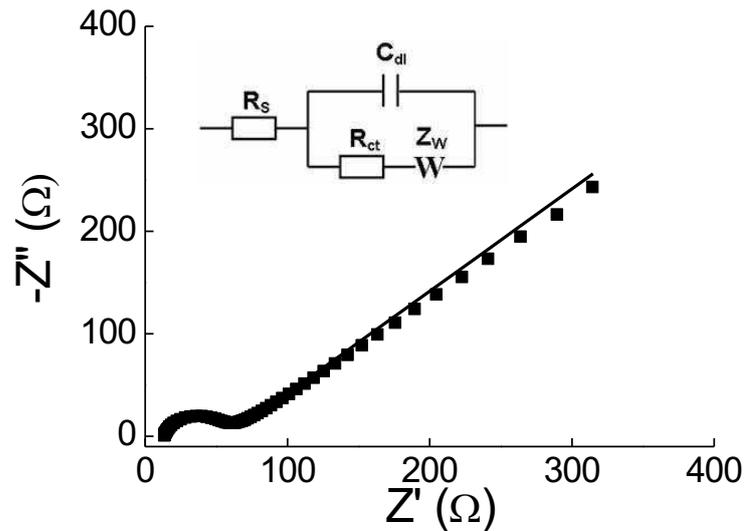
Fonte: A autora, 2019.

Outra forma de avaliar o comportamento do eletrodo de trabalho é através de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), em que é aplicado um sinal de pequena amplitude sobre o eletrodo e sobre o eletrólito suporte (CARVALHO; ANDRADE, 2006). Nesse sistema, existe uma região de alta frequência representada por um semicírculo e uma região de baixa frequência, a qual exibe um comportamento linear com inclinação aproximada de 45° . A interpretação do EIE pode ser feita através do diagrama de Nyquist (**Figura 9**).

Como esse sistema é constituído por um eletrodo sólido em contato com uma solução líquida, observa-se a contribuição da resistência da solução (R_s), simulada através do circuito de Randles padrão (**Inset Figura 9**) em $13,3 \Omega$, um valor excelente levando em consideração que as respostas de eletrodos grafite de lapiseira costumam variar entre 4 e 10Ω . O semicírculo presente em frequências mais baixas aponta a presença de uma resistência à transferência de carga (R_{ct}) e de capacitância (C_{dl}). A R_{ct} representa a resistência na transferência de carga

entre analito e eletrodo, na qual $R_{ct} = 46,0 \Omega$ para ECGLs, um valor aceitável por não ser um eletrodo convencional. A C_{dl} é referente a existência da dupla camada elétrica dos sistemas eletroquímicos. Na parte linear do diagrama, o sistema é administrado pelo elemento resistivo de Warburg (Z_w) (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

Figura 9 – Diagrama de Nyquist para EIE de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mM em solução KCl 0,5 M sobre EGCL. $E = +0,250$ V, $\Delta E = 10,0$ mV, faixa de frequência de 10^5 a 10^2 Hz. Inset: Circuito equivalente padrão de Randles.



Fonte: O autor, 2019.

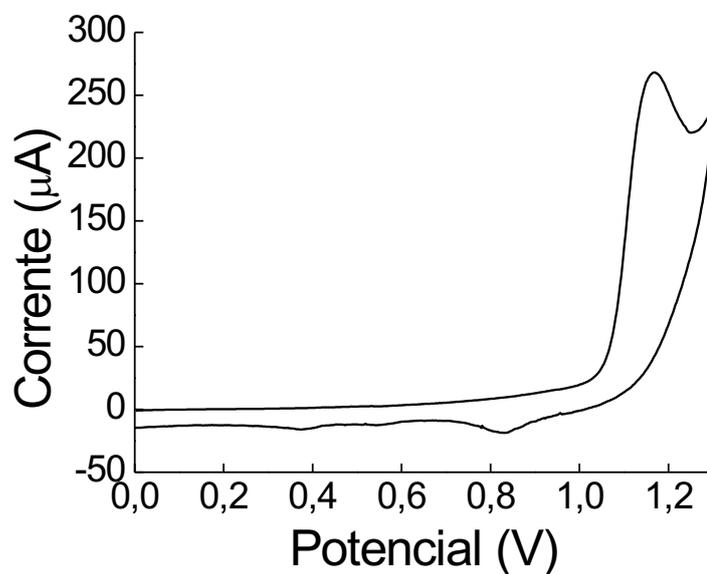
5.2 Eletropolimerização do ácido 2-hidroxibenzoico

Após a padronização do eletrodo e a verificação de sua eficácia, a eletropolimerização foi executada. O voltamograma cíclico da primeira varredura do 2-AHB em meio $HClO_4$ pode ser visto na **Figura 10**.

Um pico de oxidação pode ser visto em +1,12 V devido à provável remoção de um elétron do átomo de oxigênio do grupo fenol (-OH) presente na molécula de 2-AHB. Nota-se, também, que não há um pico de redução nessa faixa de potencial, demonstrando tratar possivelmente de um processo irreversível. Esse comportamento é clássico da eletropolimerização de derivados fenólicos com a remoção de um elétron formando um cátion-radical, caracterizado por ser um intermediário instável e reagir ativamente com outras estruturas presentes em solução. Em contrapartida, são encontrados dois picos de redução em +0,85 e +0,40 V na varredura reversa, presentes devido à redução dos oligômeros formados

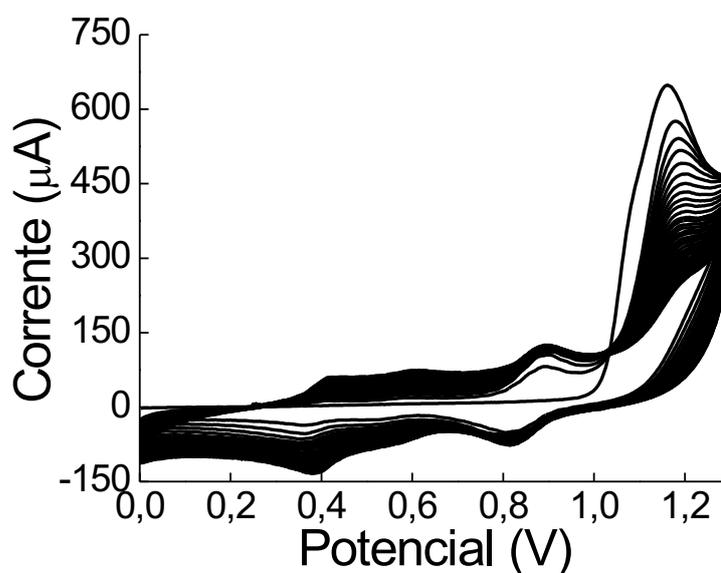
durante a polimerização provenientes das reações envolvendo os cátions-radicaís (PROUSEK, 1995). A **Figura 11** mostra um voltamograma de 100 varreduras na mesma condição já descrita.

Figura 10 – Primeiro ciclo de VC em HClO_4 0,25 M com 2-AHB 1 mM, $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em ECGL.



Fonte: A autora, 2019.

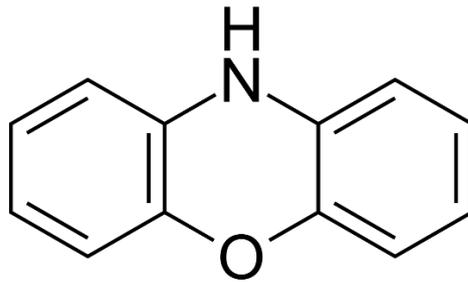
Figura 11 – Voltamogramas cíclicos de HClO_4 0,25M contendo 2-AHB 1 mM, $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 100 varreduras.



Fonte: A autora, 2019.

O voltamograma obtido é característico de uma polimerização. Em um primeiro momento, houve uma diminuição do pico de oxidação de formação do cátion radical conforme o número de ciclos aumentava. Dessa forma, esse fenômeno é explicado devido à formação de material na superfície do ECGL (nesse caso o polímero), diminuindo a área eletroquimicamente ativa. Há, ainda o crescimento dos picos de redução/oxidação procedentes dos oligômeros. São observados dois pares redox: em +0,85/+0,90 V e em +0,40/+0,41 V. O aumento dos picos está diretamente relacionado com o aumento do material na superfície do eletrodo. Assim como ocorre com o 2-aminofenol (BARBERO; SILBER; SERENO, 1989), o par à +0,85/+0,90 V pode ser referente à resposta de um derivado similar à fenoxazina (**Figura 12**), um composto cíclico intermediário, e o par +0,40/+0,41 V pode ser a resposta referente à oxidação e redução do polímero.

Figura 12 – Estrutura química da fenoxazina.

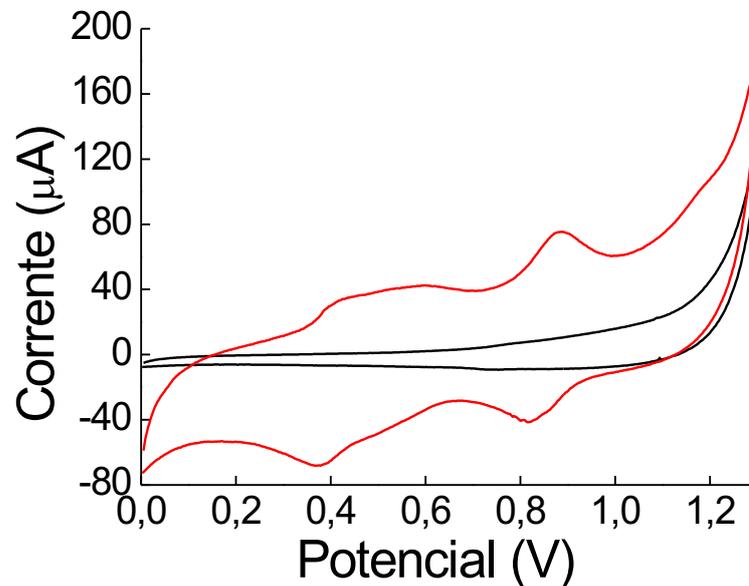


Fonte: Wiki, 2014.

5.3 Caracterização do poli(2-AHB)

Para a caracterização do poli(2-AHB), os eletrodos modificados foram condicionados às soluções padrões para analisar as diferenças entre ECGL limpo e ECGL modificado (**Figura 13**). Como pode ser observado, o pico de oxidação em +1,12 V do monômero não está presente, mostrando que não há resquícios da molécula em solução e garantindo que não houve contaminação do eletrólito suporte pelo 2-AHB. Por outro lado, os pares redox +0,85/+0,90 e +0,40/+0,41 V podem ser vistos no eletrodo modificado, provando que realmente houve a formação do material polimérico sobre a superfície do ECGL.

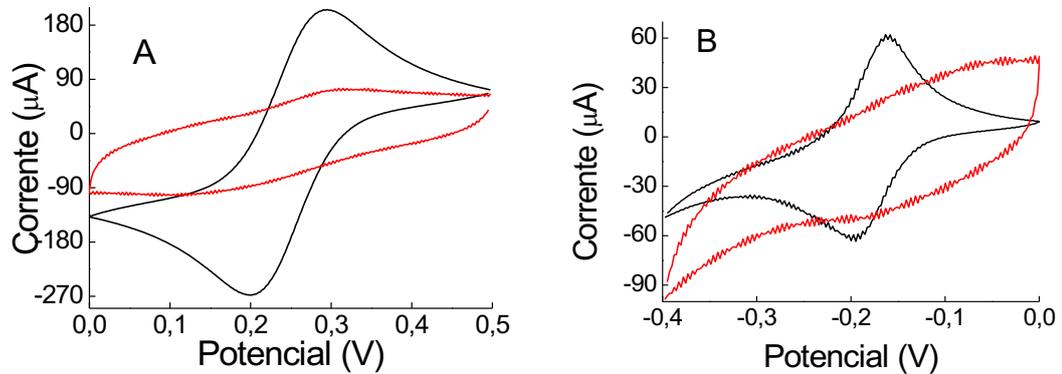
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de HClO₄ 0,25M, 50 mV.s⁻¹, sobre (--) eletrodo limpo e (--) eletrodo modificado com poli(2-AHB).



Fonte: A autora, 2019.

Observando o comportamento do polímero em meio aniônico ($K_4Fe(CN)_6$) e catiônico (azul de metileno), foi observado a diminuição nos valores de corrente (**Figura 14**). Esse comportamento já era esperado em meio aniônico (AZEVEDO; GOULART, 1997) pela possível presença de grupos carboxílicos na malha polimérica, provocando uma repulsão eletrostática entre os ânions ferricianeto e carboxilato, o que impossibilitou uma caracterização mais precisa. Uma análise mais acurada pode ser feita com o azul de metileno (catiônico), no qual teoricamente ocorreria atração eletrostática e aumento nos valores de corrente, o que não foi observado. Esse comportamento sugere, então, que houve formação de um material passivante sobre o ECGL, ou seja, capaz de diminuir o fluxo de elétrons entre o eletrólito suporte e o eletrodo de trabalho (JR; BIEHL; ANTONINI, 2017). A análise através da espectroscopia de impedância eletroquímica pode ser vista no diagrama de Nyquist (**Figura 15**).

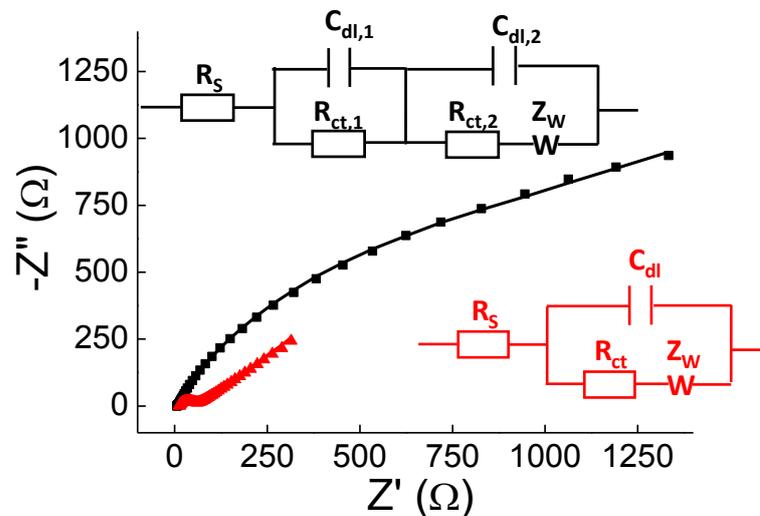
Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de (A) $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM em KCl 0,5 M e (B) azul de metileno 5 mM em KCl 0,5 M sobre (--) eletrodo limpo e (--) eletrodo modificado com poli(2-AHB). A velocidade de varredura em ambos os casos foi de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Fonte: A autora, 2019.

Em vermelho, tem-se representado a mesma curva da **Figura 8**, ou seja, do ECGL sem modificação. O eletrodo polimerizado é representado em preto. Com um circuito diferente do circuito de Randles, devido à formação do polímero e à presença de uma camada sobre a superfície do eletrodo, a resistência à transferência de carga R_{ct2} é característica do filme polimérico. O valor obtido a partir do circuito é igual a $1338,6 \Omega$, um valor relativamente maior do que o do eletrodo limpo, provando a formação de um material e possivelmente com características passivantes.

Figura 15 – Diagrama de Nyquist para EIE de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM em solução KCl 0,5 M sobre EGCL. $E = +0,250 \text{ V}$, $\Delta E = 10,0 \text{ mV}$, faixa de frequência de 10^5 a 10^2 Hz sobre (◄) ECGL e (■) ECGL modificado. Inset: circuitos equivalentes para cada medida.

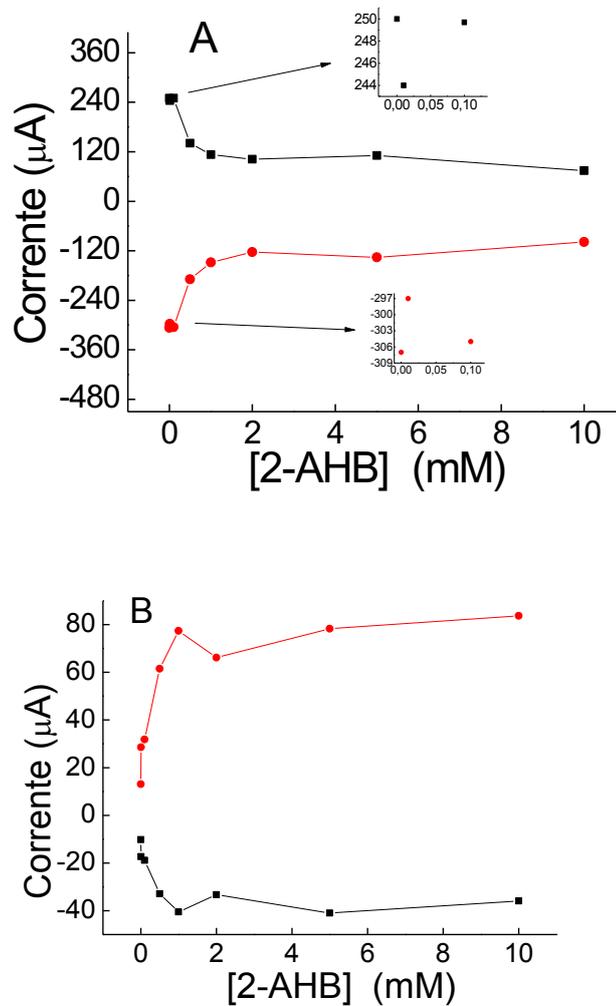


Fonte: A autora, 2019.

5.4 Otimização na eletropolimerização do ácido 2-hidroxibenzoico

Neste estudo, foram feitas otimizações na concentração do monômero, na concentração do eletrólito suporte e no número de varreduras buscando os melhores valores para a maior formação de material na superfície e, assim, poupando tempo com um número menor que os tradicionais 100 ciclos realizados e conhecendo o comportamento em soluções de concentrações diferentes. Os valores dos picos anódicos e catódicos obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6$ em KCl e $HClO_4$ foram utilizados para comparação. Primeiro, foi avaliado a concentração do monômero, em que os valores variaram de 0,1 a 10,0 mM (**Figura 16**).

Figura 16 – Perfil dos picos (-■-) anódico e (-●-) catódico *versus* concentração do monômero. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5 M, $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Solução de ácido perclórico 0,5 M, $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

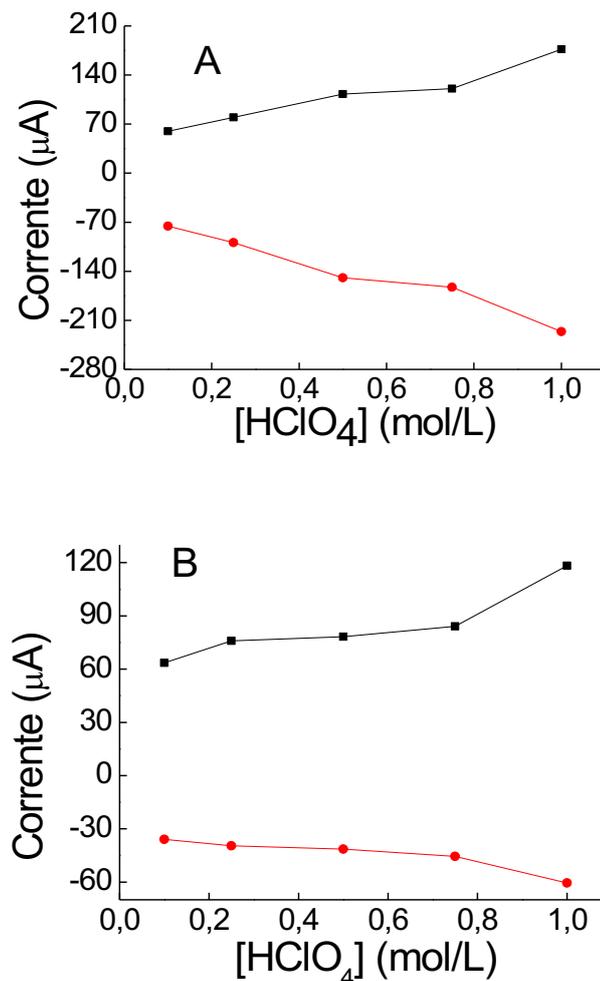


Fonte: A autora, 2019.

Como mostrado na **Figura 16A**, uma linearidade dos picos na solução de $K_4Fe(CN)_6$ em KCl foi obtida a partir da concentração 1,0 mM do ácido 2-hidroxibenzoico. Na **Figura 16B**, o qual mostra os picos em $HClO_4$, notou-se uma maior resposta também na concentração de 1,0 mM, sendo esta escolhida para garantir maior eficiência na modificação dos ECGLs. Em concentrações menores do que 1,0 mM, não houve uma alteração significativa da superfície dos eletrodos com o número de ciclos aplicados, o que implicaria em mais ciclos e, conseqüentemente, mais tempo experimental seria necessário.

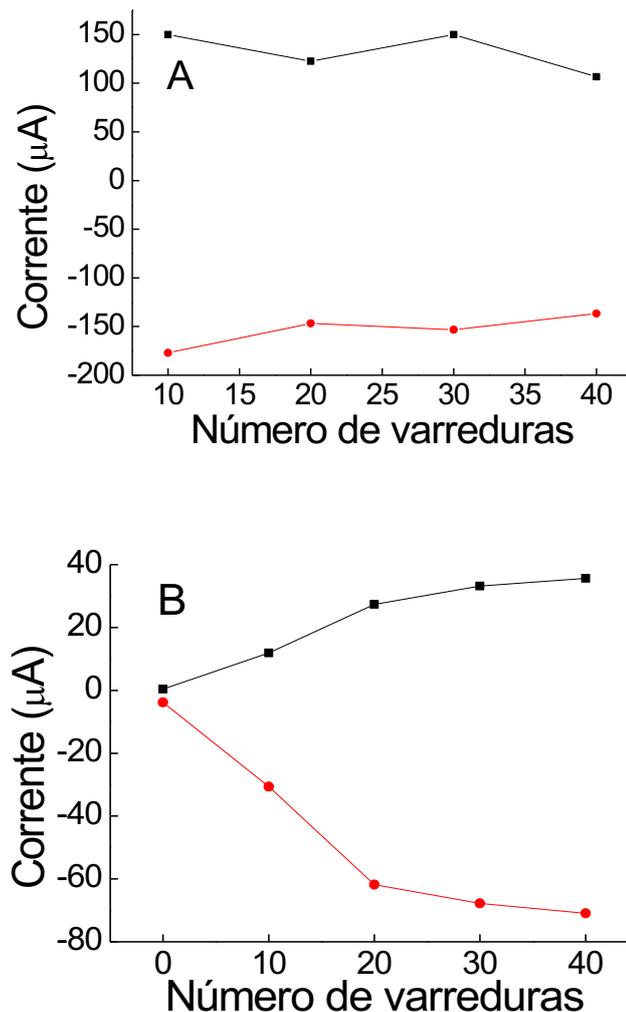
Para a otimização da concentração do eletrólito suporte os valores variaram de 0,1 a 1,0 M. É perceptível que a alteração da concentração do eletrólito suporte mantendo a mesma concentração do monômero não foi significativa (**Figura 17**). Desta maneira foi escolhida a concentração em que pelo menos estava 100 vezes mais concentrado que o monômero para eliminar a contribuição da migração, escolhendo-se 0,25 M.

Figura 17 – Perfil dos picos (■-) anódico e (-●-) catódico *versus* concentração do ácido perclórico. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5 M, 100 mV.s⁻¹. (B) Solução de ácido perclórico 0,5 M, 50 mV.s⁻¹.



A última otimização foi feita a fim de ter uma maior modificação com o mínimo de varreduras possível. Os valores variaram de 10 a 40 varreduras. Através dos gráficos de $K_4Fe(CN)_6$ e $HClO_4$ representados na **Figura 18**, nota-se que não há necessidade de ter mais do que 40 varreduras. Com certeza há a possibilidade de formação de mais camadas sobre a superfície com o aumento dos ciclos. Porém, devido principalmente ao possível efeito passivante do material, não há uma contribuição eletroquímica significativa, já que 40 varreduras provavelmente já se configuram como um número de ciclos nas condições experimentais descritas em que a superfície eletroquimicamente ativa do eletrodo já está completamente recoberta. Assim sendo, 40 varreduras foram selecionadas para a continuação do trabalho.

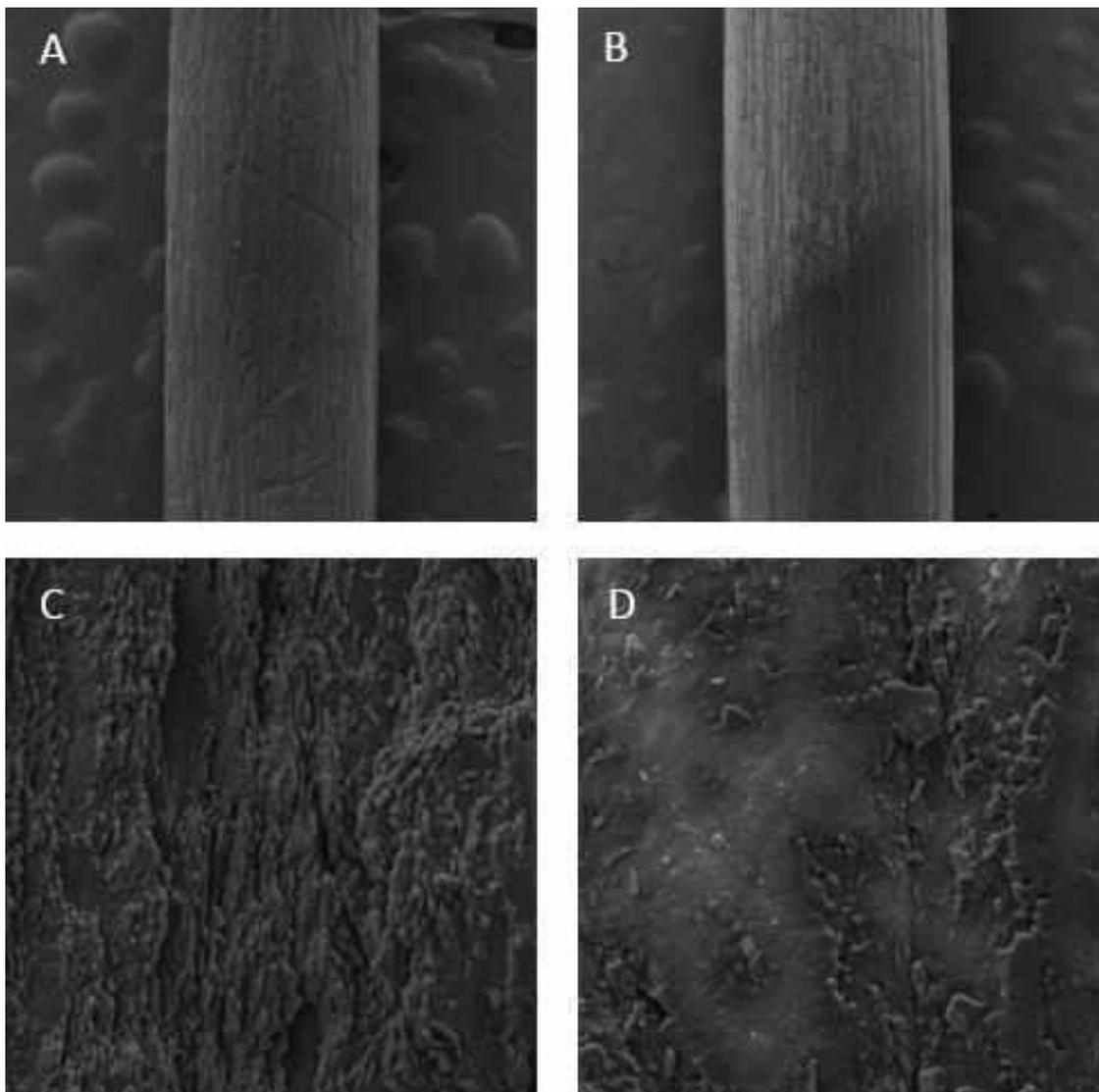
Figura 18 – Perfil dos picos (■-) anódico e (-●-) catódico *versus* número de varreduras. (A) Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em KCl 0,5 M, 100 mV.s⁻¹. (B) Solução de ácido perclórico 0,5 M, 50 mV.s⁻¹.



5.5 Caracterização morfológica do poli(2-AHB)

A técnica de MEV foi utilizada para adquirir maiores informações do polímero derivado de 2-AHB. Em um primeiro momento, a superfície foi analisada com uma ampliação apenas de 100x para mostrar a diferença dos ECGLs em relação a eletrodos planares mais comumente utilizados. O ECGL limpo pode ser observado na **Figura 19A**, em que há a presença de ranhuras devido à limpeza mecânica feita com lixas d'água. Na **Figura 19B**, a parte escura mostra a porção limpa do eletrodo, enquanto a clara, a porção modificada. Apesar do cuidado para colocar o ECGL na célula eletroquímica da forma mais linear possível, é notória a dificuldade devido a discrepância da área polimerizada.

Figura 19 – Micrografias obtidas por MEV. (A) ECGL limpo amplificado em 100x, (B) ECGL modificado com poli(2-AHB) amplificado em 100x, (C) ECGL limpo amplificado em 5000x e (D) ECGL modificado com poli(2-AHB) amplificado em 5000x.



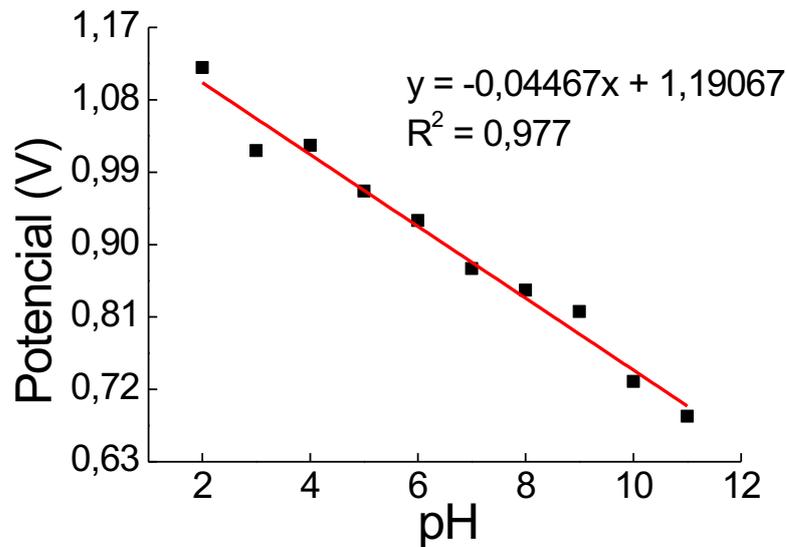
Fonte: A autora, 2019.

A outra ampliação foi de 5000x. O ECGL limpo é visto na **Figura 19C**, em que as ranhuras provenientes do seu polimento também são perceptíveis. Na **Figura 19D**, a modificação do ECGL é bastante notória. Pode-se constatar, portanto, que a polimerização ocorre de forma homogênea com presença de algumas elevações provenientes da diferença de camadas do derivado de 2-AHB.

5.6 Oxidação do 2-AHB em diferentes pHs

O primeiro estudo para propor um mecanismo de eletropolimerização foi preparando a solução do monômero em tampão Britton-Robinson (BR), com o pH variando de 2 a 12. Foi feita, então, uma varredura de VC e pode-se montar o gráfico do pH da solução *versus* potencial do pico de oxidação do monômero (**Figura 20**).

Figura 20 – Perfil de potencial de pico *versus* pH obtidos de voltamogramas cíclicos em soluções de tampão BR 0,4 M contendo 2-AHB 1,0 mM, 50 mV.s⁻¹.



Fonte: A autora, 2019.

Pode-se observar um deslocamento do pico para valores mais anódicos com o aumento do pH. Conhecendo a equação de Nernst, já apresentada no item 5.1, e, sabendo que $\log Q$ neste caso pode ser descrito como pH, tem-se que:

$$E = E^{\circ} - 0,059 \left(\frac{H^{+}}{n} \right) \text{pH}$$

Desse modo, comparando o valor da inclinação da reta obtida e o valor de -0,059, é possível conhecer a proporção prótons/elétrons envolvidos na reação (CLARE et al., 2019). Como a inclinação corresponde a -0,04467, como mostrado na equação do gráfico da figura 18, presume-se que há o mesmo número de prótons e elétrons envolvidos na oxidação do 2-AHB, por tratar-se de um valor próximo ao encontrado na equação.

5.7 Oxidação do 2-AHB em diferentes velocidades de varredura

Estudos sobre a velocidade de varredura foram feitos posteriormente com a finalidade de conhecer o número exato de elétrons na reação e entender parte do comportamento eletroquímico do monômero da solução ácida. A velocidade variou de 5 até 1000 mV.s⁻¹, em que foram feitas uma varredura de potencial em solução HClO₄ contendo 2-AHB para cada uma delas em sequência. Os valores obtidos de potencial de pico e corrente de pico anódicos, juntamente com os dados utilizados da velocidade de varredura, podem ser utilizados com algumas fórmulas para o fim de caracterização.

Em processos difusionais, existe uma dependência da corrente do pico de oxidação do analito com a raiz da velocidade de varredura podendo ser representada linearmente em um gráfico. Essa informação é comprovada pela equação de Randles-Sevcick (LEATHER; WENSTON, 1987) a seguir:

$$I = 0,4463 nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad (\text{completa})$$

$$I = 2,68 \times 10^5 \sqrt{n^3 ADCv} \quad (\text{resumida à } 25^\circ\text{C})$$

Em que:

I = corrente (A)

n = número de elétrons envolvidos na reação (adimensional)

F = constante de Faraday (C.mol⁻¹)

A = área (cm²)

C = concentração do analito (mol.cm⁻³)

v = velocidade de varredura (V.s⁻¹)

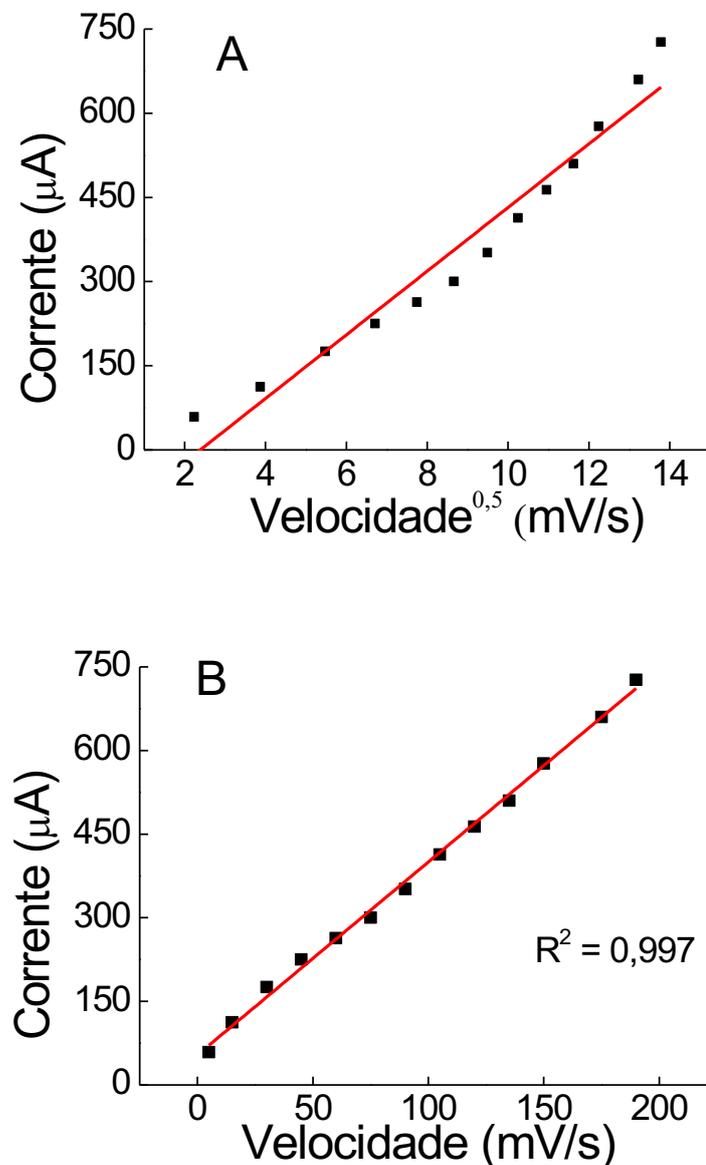
D = coeficiente de difusão (cm².s⁻¹)

R = constante dos gases (J.K⁻¹.mol⁻¹)

T = temperatura (K)

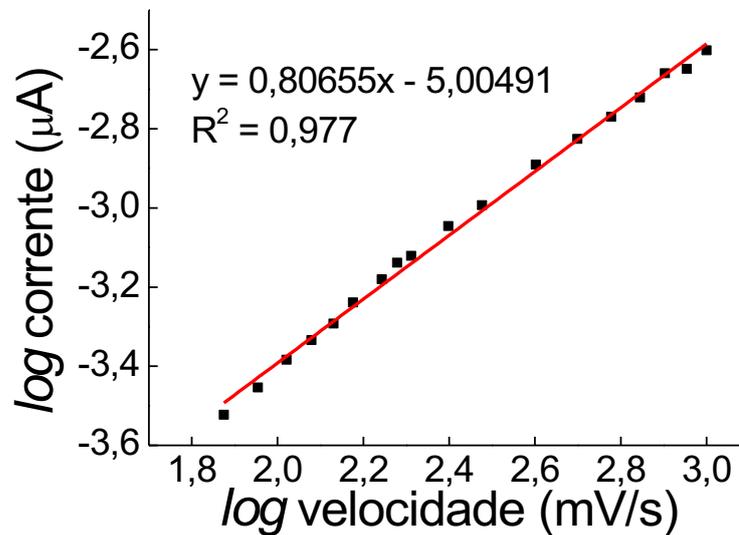
No caso do 2-AHB, foi inviável propor uma equação da reta que represente de forma acurada a relação entre a corrente do pico de oxidação do monômero e a raiz da velocidade (Figura 21A), dando indícios de não se tratar de um sistema difusional. Desta forma, foi montado o gráfico da Figura 21B, mostrando os dados obtidos de corrente pela velocidade de varredura. Com R^2 muito próximo do valor unitário, pode-se, enfim, considerar o sistema adsorvivo e não difusional. Isso faz sentido, pois sabe-se de fato que o monômero está sendo polimerizado e o polímero está sendo adsorvido na superfície. Os dados apenas corroboram os experimentos de caracterização eletroquímica e morfológica.

Figura 21 – (A) Raiz da velocidade de varredura e (B) velocidade de varredura aplicada *versus* corrente do pico de oxidação do 2-AHB.



Outra forma de conhecer o tipo de controle existente sobre as reações de oxidação e redução na eletropolimerização é pela relação entre o \log da velocidade de varredura e o \log da corrente do pico de oxidação do analito. Isso é feito comparando-se o valor obtido da inclinação da reta proveniente do estudo com valores pré-estabelecidos: próximos à 0,5 indicam sistemas difusionais, enquanto próximos à 1 indicam sistemas adsortivos (LAVIRON, 1980). O valor de 0,80655 é próximo de 1, demonstrando se tratar definitivamente de um processo adsortivo, A **Figura 22** ilustra o gráfico com os parâmetros citados.

Figura 22 – \log da velocidade aplicada versus \log da corrente do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de 60 mV.s^{-1} consideradas.



Fonte: A autora, 2019.

Para descobrir informações sobre a reversibilidade do sistema, estabeleceu-se uma relação entre o potencial e o \log da corrente do pico de oxidação do 2-AHB (**Figura 23**). De acordo com Bard e Faulkner (2001), o coeficiente angular da reta pode ser calculado pelas equações de Tafel:

$$a = (1-\alpha) \frac{F}{2,3RT} \quad (\text{se o pico for anódico})$$

$$a = -\alpha \frac{F}{2,3RT} \quad (\text{se o pico for catódico})$$

Em que:

a = coeficiente angular da reta (adimensional)

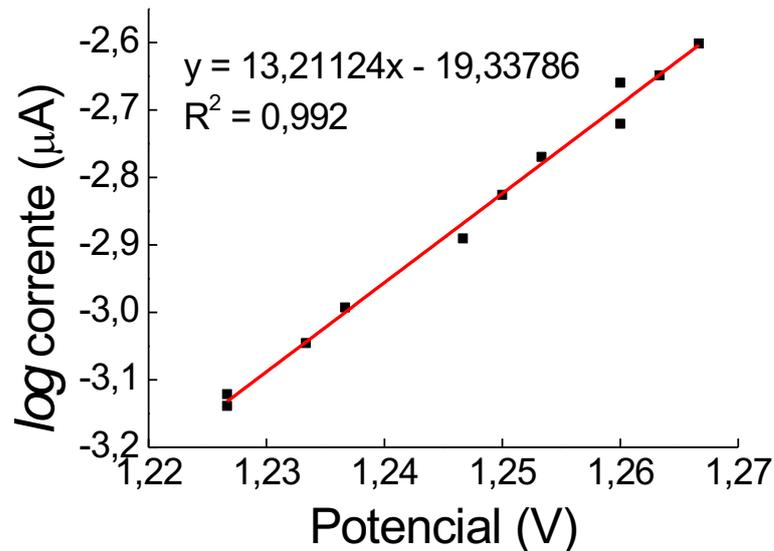
α = grau de reversibilidade do sistema (adimensional)

F = constante de Faraday ($C \cdot mol^{-1}$)

R = constante dos gases ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)

T = temperatura (K)

Figura 23 – Potencial do pico de oxidação do 2-AHB *versus* *log* da corrente do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de $175 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ consideradas.



Fonte: A autora, 2019.

Como o coeficiente angular já é conhecido, o α pode ser isolado e encontrado. Utilizando o Tafel anódico, $\alpha = 0,219$, o que indica um modelo muito próximo de irreversível, já que valores tendendo a 0 demonstram tendências à irreversibilidade, enquanto valores próximos a 1 sugerem reversibilidade no processo (BARD; FAULKNER, 2001).

Com o grau de reversibilidade do sistema conhecido, é possível calcular o número de elétrons envolvidos na reação por meio da relação entre o *log* da velocidade de varredura e o potencial do pico de oxidação do 2-AHB (LAVIRON, 1979). O coeficiente angular da reta deve ser igual a:

$$a = \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \quad (\text{pico anódico})$$

$$a = \frac{-2,3RT}{\alpha nF} \quad (\text{pico catódico})$$

Em que:

a = coeficiente angular da reta (adimensional)

α = grau de reversibilidade do sistema (adimensional)

R = constante dos gases ($J.K^{-1}.mol^{-1}$)

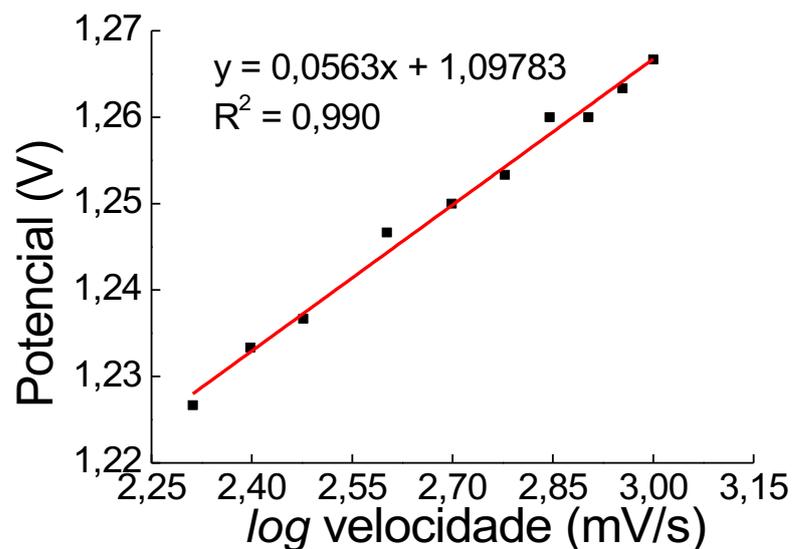
T = temperatura (K)

F = constante de Faraday ($C.mol^{-1}$)

n = número de elétrons envolvidos na reação (adimensional)

O gráfico representado na **Figura 24** mostra os dados obtidos e a equação da reta correspondente. Isolando-se o número de elétrons e substituindo os demais componentes pelos respectivos valores conhecidos, $n = 1,34$. Arredondando para o número natural mais próximo, conclui-se que há um elétron envolvido na oxidação do monômero. Como a proporção calculada em 5.6 foi de 1/1, deduz-se também o envolvimento de um próton.

Figura 24 – *log* da velocidade aplicada *versus* potencial do pico de oxidação do 2-AHB, velocidades acima de 175 mV.s^{-1} consideradas.

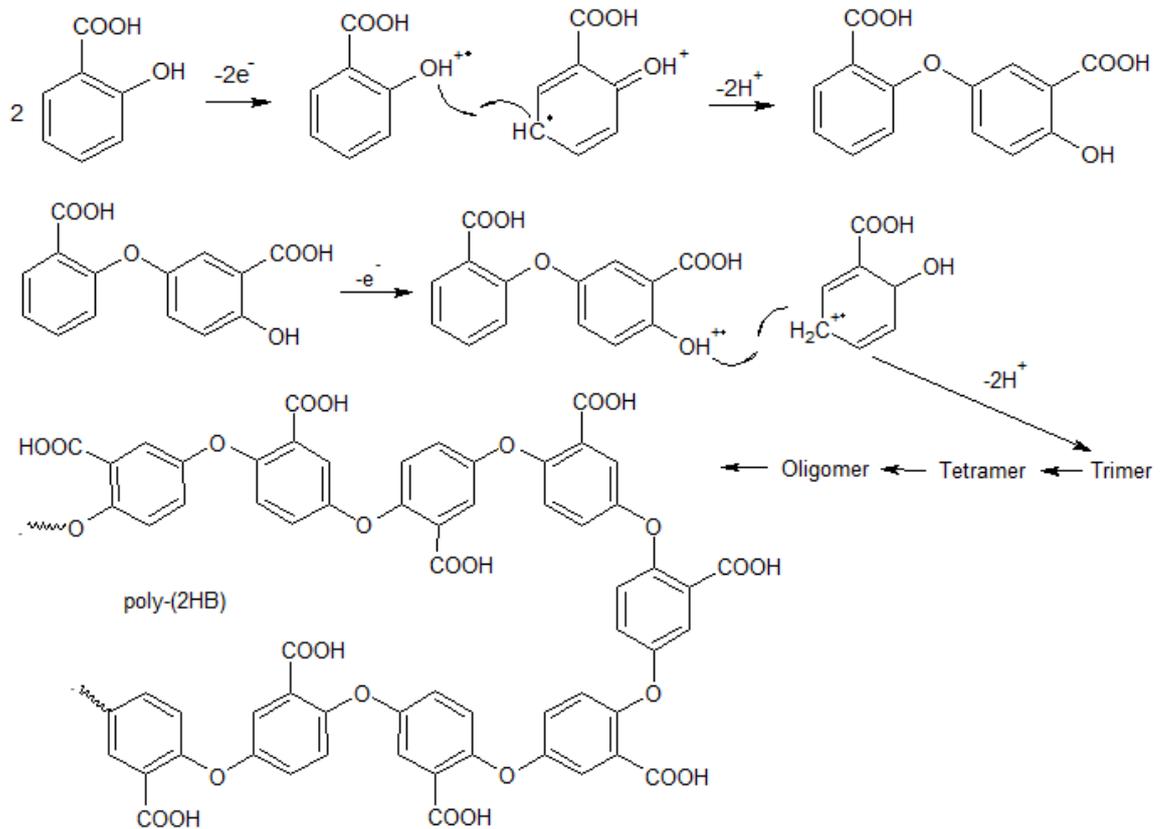


Fonte: A autora, 2019.

5.8 Mecanismo de eletropolimerização do 2-AHB

Algumas informações já obtidas anteriormente são importantes para propor um mecanismo de eletropolimerização para o 2-AHB. São elas: a presença do grupo funcional ácido carboxílico (-COOH) livre no filme polimérico e a participação de um elétron e um próton por molécula na reação. É importante ressaltar que o processo é feito em meio ácido e, portanto, os grupos funcionais presentes no 2-AHB permanecem protonados. A proposta de mecanismo é ilustrada na **Figura 25**.

Figura 25 – Proposta de mecanismo para a eletropolimerização do 2-AHB.



Fonte: A autora, 2019.

A primeira etapa da reação ocorre quando duas moléculas do monômero perdem um elétron cada, gerando dois cátions-radicaís. O anel aromático do 2-AHB apresenta uma hidroxila e uma carboxila que correspondem respectivamente a um doador e um retirador de elétrons. Apesar de a carboxila ser o grupo desativador (*meta*-dirigente), a hidroxila apresenta efeito doador por ressonância (*orto* e *para*-dirigentes) e possui a preferência na orientação da modificação do composto aromático (CAREY, 2011).

Uma das posições *orto* da hidroxila está ocupada pelo grupo carboxílico. A outra posição *orto* está livre, mas apresenta uma pequena barreira estérica frente à possibilidade de ataques na posição *para*, completamente livre estericamente. Apesar da possibilidade de se ter em algum momento ataques na posição *orto*, o mecanismo foi proposto levando em consideração o que se acredita ser o produto principal da reação. Essa reação ocorre rapidamente devido à instabilidade dos cátions-radicaís, o que acarreta na liberação de dois prótons (um de cada estrutura) e na formação de um dímero. Esse processo ocorre sucessivamente formando trímeros, tetrameros e assim por diante, até a obtenção do filme polimérico.

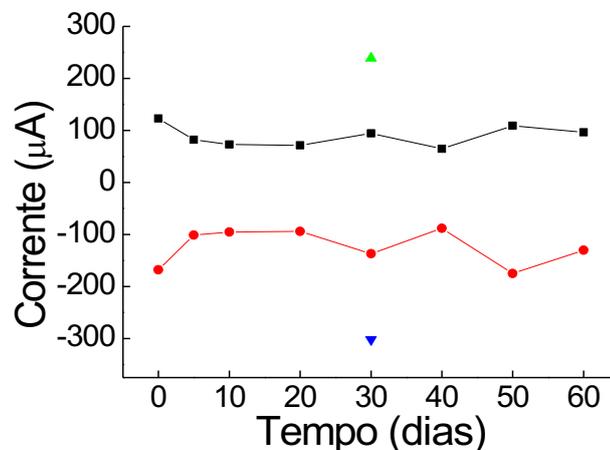
O mecanismo está de acordo com o envolvimento de apenas 1 elétron e 1 próton por molécula. Como previsto, apresenta os grupos carboxílicos livres e disponíveis para futuras reações químicas e a configuração não-linear do polímero em conjunto com a possibilidade de mistura entre material formado com ataques na posição *para* à hidroxila (principal) e *orto* (secundário) podem ser parte das explicações da falta de condutividade (ou aumento da resistência) observada.

Interessante notar que o dímero formado apresenta a possibilidade de mais estruturas de ressonância do que o monômero. Isso permite que a remoção de um elétron do dímero ocorra mais facilmente do que no monômero, pois o cátion-radical gerado é estabilizado por estas formas adicionais de ressonância. Essa facilidade é refletida eletroquimicamente, pois os pares redox obtidos em potenciais mais anódicos significam menor energia necessária para oxidação/redução da estrutura.

5.9 Estudo da estabilidade do poli(2-AHB)

Um dos problemas na construção de um biossensor funcional tem relação com a estabilidade do sistema, de forma que o dispositivo deve ser capaz de manter a resposta esperada durante um certo período de tempo (MELO, 2008). Já conhecendo o perfil voltamétrico do eletrodo modificado em solução $K_3Fe(CN)_6$, foram obtidos voltamogramas do dia da polimerização (dia 0) até 60 dias após o processo (**Figura 26**).

Figura 25 – Perfil dos picos de corrente anódicos (■) e picos de corrente catódicos (●) por tempo obtidos dos voltamogramas cíclicos em solução $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM em KCl 0,5 M, velocidade de $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pico de corrente anódico (▲) e catódico (▼) obtido para o eletrodo limpo.



Fonte: A autora, 2019.

Ambos os voltamogramas do eletrodo modificado apresentaram respostas esperadas, de modo que fica perceptível a diferença deles e o ECGL limpo. Isso demonstra que o sistema é funcional tanto no dia da modificação, quanto 60 dias após o procedimento. Ao comparar a resposta do dia 0 com a do dia 60, nota-se uma pequena diferença nos valores de corrente, provavelmente devido à diferença de área da superfície do eletrodo submersa na solução de $K_3Fe(CN)_6$, que acaba acontecendo mesmo tomando os devidos cuidados para evitá-la.

5.10 Estudo da temperatura de eletropolimerização do 2-AHB

Toda reação química necessita de uma energia mínima para acontecer, esta é denominada energia de ativação (BRADY, 1982). De acordo com Azooz, Sayyah e Abd-ElRehem (2011), dividindo 1 pela temperatura em kelvin e aplicando *log* na divisão da corrente do pico de oxidação do 2-AHB pela área do ECGL modificado, obtém-se uma regressão linear com inclinação dada através de uma adaptação da equação de Arrhenius:

$$a = \frac{-EA}{19,14}$$

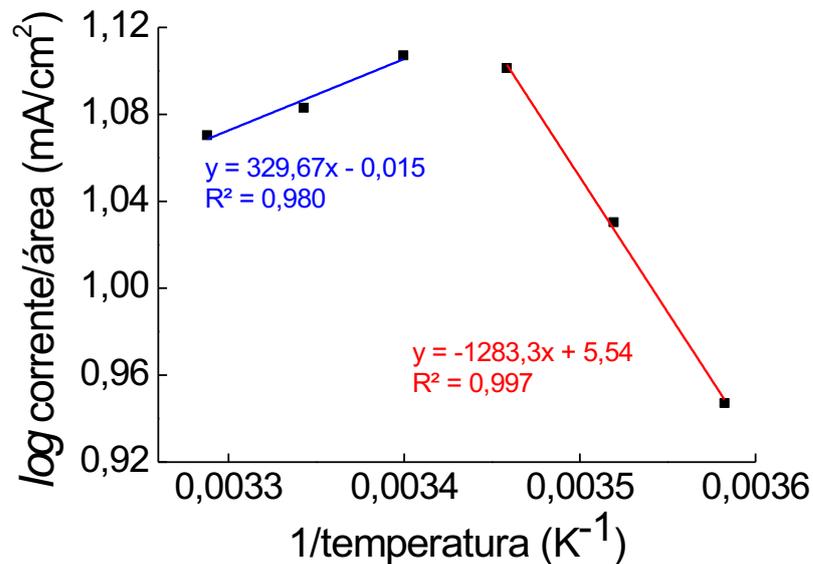
Em que:

a = coeficiente angular da reta (adimensional)

EA = energia de ativação ($J.mol^{-1}$)

Como se pode observar na **Figura 27**, foi possível obter duas retas com uma interseção em comum. Conhecendo coeficiente angular de ambas através das equações das retas e isolando a energia de ativação, tem-se que $EA = 24,56 kJ.mol^{-1}$ em temperaturas entre 6 e 16 °C e $EA = 6,31 kJ.mol^{-1}$ de 21 a 31 °C. No geral, a energia de ativação de uma reação de propagação entre radicais durante a polimerização é menor que $33 kJ.mol^{-1}$, enquanto reações de terminação variam entre 0,95 e 6 $kJ.mol^{-1}$ (AZOOZ; SAYYAH; ABD-ELREHEM, 2011). Portanto, assume-se que a oxidação do 2-AHB em temperaturas menores que 21 °C sofre uma reação de propagação, ao passo que as reações terminais ocorrem acima dessa temperatura, levando ao aumento gradativo da corrente do pico de oxidação do monômero nesse caso.

Figura 27 – $1/\text{temperatura}$ versus log da divisão da corrente do pico de oxidação do 2-AHB pela área modificada do ECGL. (→) 6 a 16 °C. (←) 21 a 31 °C.



Fonte: A autora, 2019.

Esses resultados foram muito semelhantes aos encontrados por Chan e colaboradores (1998), que executaram os mesmos experimentos para a anilina. Nesse estudo, as reações de propagação ocorrem em temperaturas menores que 20 °C, enquanto, acima disso, ocorrem reações de terminação na formação da polianilina.

Apesar de se utilizar a temperatura ambiente para a formação dos polímeros (25 °C), o que configura, pelo experimento, uma reação de terminação, a formação dos polímeros não foi afetada drasticamente, porque por se tratar de um processo cíclico, os cátion-radicaís são regenerados a cada momento para que a propagação possa ser realizada.

5.11 Detecção de 4-nitrofenilfosfato

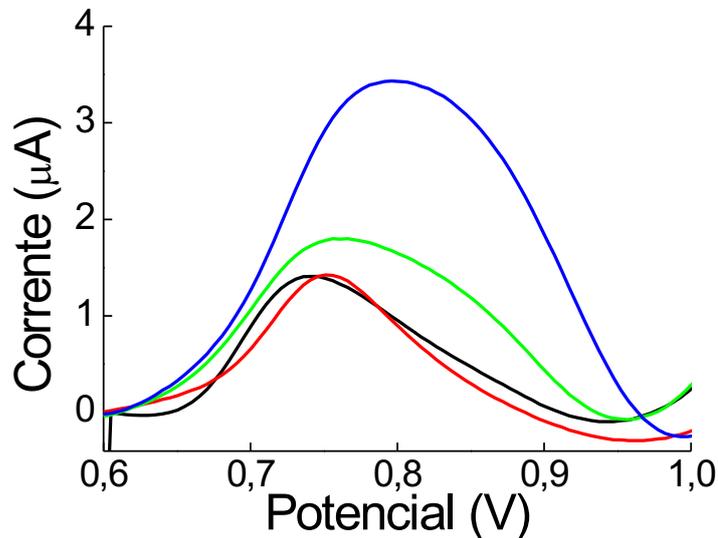
Até o exato momento, foi provado a formação de um polímero sobre o eletrodo e o processo de polimerização foi otimizado poupando tempo na formação para a caracterização. Além disso, foi provado que o mecanismo proposto corrobora com os dados eletroquímicos, que o material se apresenta estável por pelo menos 60 dias e que há a presença de grupos funcionais carboxílicos na estrutura. Desta forma, passamos para o desenvolvimento de um biossensor enzimático com a imobilização da enzima fosfatase alcalina.

A detecção foi feita por voltametria de pulso diferencial através da detecção do produto da catálise da FA, o 4-nitrofenol. O processo de imobilização enzimática foi feito de quatro

formas diferentes: adsorção em ECGL limpo, adsorção em ECGL modificado com poli(2-AHB), ligação covalente em ECGL ativado com EDC/NHS e ligação covalente em ECGL modificado com poli(2-AHB) e ativado com EDC/NHS.

Apesar de no item 5.4 ter estabelecido 40 varreduras para a polimerização do 2-AHB, os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois o material passivante impediu drasticamente a transferência eletrônica. Trabalhos já feitos no laboratório demonstram que 10 varreduras são suficientes na aplicação de um biossensor, sendo então, a quantidade utilizada e apresentada na **Figura 28** quando foi necessário a modificação do ECGL antes da imobilização do FA.

Figura 28 – Voltamogramas de VPD sobre ECGL limpo contendo a enzima fosfatase alcalina (5 U) imobilizada por adsorção (—), imobilizada por ligação covalente através de EDC/NHS (—), ECGL com poli(2-AHB) com enzima imobilizada por adsorção (—) e imobilizada por ligação covalente através de EDC/NHS (—) em solução contendo 1,0 mM de 4-nitrofenilfosfato em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9, 10 mV.s⁻¹.



Fonte: A autora, 2019.

Nota-se uma maior resposta da detecção do 4-nitrofenilfosfato através de ligação covalente em ECGL modificado com poli(2-AHB), o que pressupõe uma maior quantidade de enzima imobilizada. Esse resultado mostra que a presença dos grupos ácidos carboxílicos disponíveis no filme polimérico e sua ativação através de EDC/NHS promovem uma melhor e mais forte interação com a enzima em comparação aos demais sistemas testados.

O trabalho tem agora como perspectiva a otimização do número de varreduras (menor que 40) para melhor resposta de detecção, estudo de pH ótimo, tempo de imobilização da enzima e curvas de calibração para poder ser aplicado na detecção de pesticidas.

6 CONCLUSÃO

Dado ao exposto, foi possível modificar o eletrodo carbono grafite de lapiseira com poli(2-AHB) e caracterizar o material formado através de técnicas eletroquímicas e microscópicas. A diminuição da resposta do ECGL modificado nas soluções de ferricianeto de potássio e azul de metileno demonstra um material não condutor. Essa característica é ainda reforçada através de EIE, o qual comprovou o aumento da resistência da transferência de carga entre o eletrodo de trabalho e a solução.

Com as respostas em ácido perclórico, foi possível descartar a hipótese de resquícios do monômero sobre a superfície do ECGL, além de mostrar dois pares redox presentes na eletropolimerização. As micrografias por MEV evidenciam uma formação homogênea do material com presença de camadas.

Foi possível obter as melhores concentrações do monômero e do eletrólito suporte (1 mM e 0,25 M respectivamente) e perceber a estabilização da resposta do filme polimérico em 40 varreduras na otimização. Através dos experimentos de variação de pH e de velocidade de varredura caracterizou-se o sistema como irreversível e o mecanismo de ação foi proposto, envolvendo um elétron e um próton.

Os estudos de temperatura puderam dar informações sobre a energia de ativação e o tipo de reação da eletropolimerização, sendo de propagação em temperaturas inferiores a 21 °C, enquanto, acima disso, ocorrem reações de terminação. O estudo de estabilidade mostrou que o polímero mantém a resposta esperada após 60 dias.

A imobilização da enzima pode ser feita com êxito nos quatro sistemas, porém a resposta mais alta ocorre com ligação covalente através de EDC/NHS em eletrodo de trabalho modificado. Sendo assim, o biossensor em desenvolvimento poderá ser utilizado futuramente para a detecção de pesticidas organofosforados.

REFERÊNCIAS

AKYILMAZ, E.; TUREMIS, M. An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. **Electrochimica acta**, v. 55, n. 18, p. 5195-5199, 2010.

ALVES-BALVED, R. P. et al. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, n. 2016, p. 226-231, 2016.

ALVES, L. M. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato**. 2014. 67 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

ALVES, L. M. et al. Development of direct assays for *Toxoplasma gondii* and its use in genomic DNA sample. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, n. 1, p. 838-844, 2016.

ALVES, R. F. et al. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, n. 2017, p. 69-75, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.025.

ASSIS, J. F.; SILVA, M. L. L. S.; LOPES, R. S. **Estudo voltamétrico em solução de ferricianeto: reversibilidade de reações eletroquímicas**. Universidade Federal de Goiás, 2010.

AUGUSTO, T. **Introdução a Polímeros Condutores: Síntese e Caracterização Eletroquímica da Polianilina**. 2009. 10 p. Trabalho de conclusão: disciplina de preparação pedagógica – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

AZEVEDO, D. C.; GOULART, M. O. F. Estereosseletividade em reações eletródicas. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 23-29, 1997.

AZOOZ, R.; SAYYAH, S. M.; ABD-ELREHEM, S. S. **Conducting polymers: electropolymerization, Kinetics, Characterizations, Corrosion inhibitors**. Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing, 2011.

- BARBERO, C; SILBER, J. J.; SERENO, L. Formation of a novel electroactive film by electropolymerization of ortho-aminophenol: Study of its chemical structure and formation mechanism. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 263, n. 2, p. 333-352, 1989.
- BARBOZA, H. T. G. et al. Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, p. 172-193, 2018.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BRADY, J. E. **Química Geral**. 2ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 1982.
- BROCK, D. J. H. Amniotic fluid alkaline phosphatase isoenzymes in early prenatal diagnosis of cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 322, n. 8356, p. 941-943, 1983.
- CAREY, F. A. **Química Orgânica: Volume 1**. 7ed. São Paulo: Mac Graw-Hill, 2011.
- CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações Heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.
- CAVALCANTI, L. P. A. N. et al. Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 739-766, 2016.
- CHAN, H. S. O. et al. Synthesis of fully sulfonated polyaniline: a novel approach using oxidative polymerisation under high pressure in the liquid phase. **Chemical Communications**, v. 13, n. 1, p. 1327-1338, 1998.
- CHANG, H. et al. Microbially derived biosensors for diagnosis, monitoring and epidemiology. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1031-1035, 2017.
- CLARE, L. A. et al. The Role of H-Bonding in Non-Concerted Proton-Coupled Electron Transfer: Explaining the Voltammetry of Phenylenediamines in the Presence of Weak Bases in Acetonitrile. **ECS Meeting Abstracts**, v. 2019, n. 1, p. 1861, 2019.
- COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, p. 65-72, 2006.

DAS, R. et al. Covalent immobilization of peanut β -amylase for producing industrial nanobiocatalysts: A comparative study of kinetics, stability and reusability of the immobilized enzyme. **Food Chemistry**, v. 245, n. 1, p. 488-499, 2018.

DAVIDSON, J. A. et al. Alkaline Phosphatase Activity and Endotoxemia After Infant Cardiothoracic Surgery. **Shock**, v. 51, n. 3, p. 328-336, 2019.

DE VRIES, E. M. G. et al. Alkaline phosphatase at diagnosis of primary sclerosing cholangitis and 1 year later: evaluation of prognostic value. **Autoimmune and Cholestatic Liver Disease**, v. 36, n. 12, p. 1867-1875, 2016.

FAEZ, R. et al. **Polímeros Condutores**. Química Nova Escola, São Paulo, n. 11, p. 13-18, 2000.

FERREIRA, L. F. et al. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

FRANCO, D. L. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de câncer de próstata e hepatite C**. 2010. 118 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FRANCO, D. L. et al. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. **Polymer Engineering & Science**, v. 48, n. 10, p. 2043-2050, 2008.

FRASER, L. A. et al. A portable microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (APTEC) biosensor for malaria diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 1, p. 591-596, 2018.

GATO, H. et al. Preparation of Conducting Polymers by Electrochemical Methods and Demonstration of a Polymer Battery. **Journal of Chemical Education**, v. 85, n. 8, p. 1067-1070, 2008.

GUI, Q. et al. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1623, 2017.

HANACHI, P. et al. Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Collagen Surface via Cross-Linking Method. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 32-38, 2015.

HOMAEI, A. Immobilization of *Penaeus merguensis* alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metal detection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, n. 1, p. 1-7, 2017.

JR, A. G. S.; BIEHL, L. V.; ANTONINI, L. M. Efeito do tratamento de passivação química na resistência à corrosão por pite dos aços inoxidáveis ferrítico AISI 430 e austenítico AISI 316L. **Revista Matéria**, v. 23, n. 1, p. 65-75, 2017.

JÖNSSON, G.; GORTON, L. An electrochemical sensor for hydrogen peroxide based on peroxidase adsorbed on a spectrographic graphite electrode. **Electroanalysis**, v. 1, n. 5, p. 465-469, 1989.

LAVIRON, E. A multiplayer model for the study of space disturbed redox modified electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 112, n. 1980, p. 1-9, 1980.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, n. 1979, p. 19-28, 1979.

LEATHER, F. G.; WENSTEN, P. R. An algorithm for the numerical evaluation of the reversible Randles-Sevcik function. **Computers & Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 1987.

LIU, G.; LIN, Y. Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 835-843, 2006.

MACHADO, G. B. **Preparação e aplicações dos silsesquioxanos dicarboxilatos de cadeia longa derivados do precursor dicatiônico bis(3-N-propiltrihroxisilil)-1,4diazoniabicyclo[2,2,2]octano**. 2014. 139 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MONIER, M.; YOUSSEF, I.; ABDEL-LATIF, D. A. Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of β -galactosidase enzyme. **Reactive and Functional Polymers**, v. 124, n. 1, p. 129-138, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEZHADALI, A.; MEHRI, L.; SHADMEHRI, R. Determination of methimazole based on electropolymerized molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor. **Materials Science & Engineering**, v. 85, n. 1, p. 225-232, 2018.

NOWALL, W. B.; DONTA, N.; KUHR, W. G. Electron transfer kinetics at a biotin/avidin patterned glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 11, p. 1237-1244, 1998.

NIGWEKAR, S. U. et al. Calciphylaxis: Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 66, n. 1, p. 133-146, 2015.

OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar – Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1311-1333, 2016.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PECHERSTORFER, M. et al. The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, serum total alkaline phosphatase, and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 1, p. 97-103, 1995.

PRADELA-FILHO, L. A. et al. Nail polish and carbon powder: An attractive mixture to prepare paper-based electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 258, n. 2017, p. 786-792, 2017.

PROUSEK, J. Radical Ions Chemistry. Radical Cations Reactions. **Chemicke Listy**, v. 89, n. 3, p. 144-156, 1995.

PURUSHOTHAMA, H. T. et al. Pencil graphite electrode as an electrochemical sensor for the voltammetric determination of chlorpromazine. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, n. 2, p. 161-166, 2018.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Uso da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **Revista Ibracon de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529-546, 2015.

OLIVEIRA, C. A. F.; FILHO, J. B. M. R.; ANDRADE, L. R. Identificação de Ácido Salicílico em Produtos Dermatológicos Utilizando-se Materiais Convencionais. **Química Nova Escola**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 125-128, 2011.

RIBEIRO, M. L. et al. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **Holos Environment**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2008.

SABIK, H.; JEANOT, R.; ROUNDEAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 217-236, 2000.

SIMÃO, A. M. S. **Estudos das características cinéticas da fosfatase alcalina reconstituída em sistemas vesiculares**. 2008. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433-440, 2006.

SOUZA, L. T. A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2017. cap 15, p. 529-568.

TAMER, T. M.; HASSAN, M.; OMER, A. M. Methods of Enzyme Immobilization. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. 6, p. 385-392, 2016.

TORRINHA, A. et al. Biosensing based on pencil graphite electrodes. **Talanta**, v. 1, n. 190, p. 235-247, 2018.

TZOUVADAKIA, I. et al. Memristive biosensors based on full-size antibodies and antibody fragments. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 286, n. 1, p. 346-352, 2019.

UNTIVEROS, K. L. et al. An Electrochemical biosensor based on Hairpin-DNA modified Gold electrode for detection of DNA damage by a Hybrid Cancer Drug Intercalation. **Biosensors and Bioelectronic**, 2019.

VO-DINH T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 366, n. 6, p. 540–551, 2000.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

WANG, J.; PAMIDI, P. V. A. Sol-Gel-Derived Gold Composite Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 21, p. 4490-4494, 1997.

YARDIM, Y. Cathodic adsorptive stripping voltammetry of abscisic acid using pencil-lead bismuth-film electrode. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 37-43, 2011.