

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA CONTROLE DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS

Martin Kássio Leme da Silva¹
Ivana Cesarino²

Introdução

A partir do século XVIII, quando a industrialização foi intensificada, o grande crescimento populacional mundial gerou uma enorme demanda por alimentos, o que levou a criação de modalidades de produção de alimentos, como os agroecossistemas e monocultivos. Com o advento dessas novas formas de cultura agrícola, a proliferação de microrganismos, doenças e pragas foi elevada exponencialmente (RODRIGUES, 2006).

Em busca de melhorar a qualidade/quantidade da produção de frutas, verduras, legumes e grãos na agricultura, o homem sempre recorreu a tecnologias que pudessem impedir a proliferação de pragas e doenças em seus alimentos. O uso de pesticidas, de herbicidas ou de agrotóxicos foi uma alternativa utilizada por agricultores para sanar os problemas em suas lavouras. O uso de pesticidas organoclorados, como o dicofol (Figura 1) e o endosulfan, aumentou principalmente no século XX para que a demanda de produção de alimentos fosse suficiente para atender a população (UNEP, 2003).

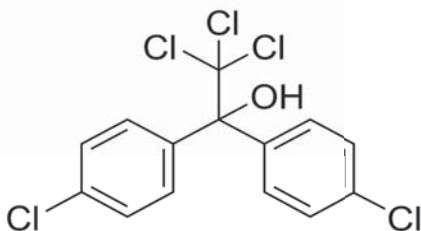


Figura 1. Molécula do Dicofol

¹ Aluno de Graduação do Curso de Bacharelado em Química Ambiental Tecnológica da Universidade Estadual Paulista-UNESP. E-mail: martinleme@fca.unesp.br

² Professora do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista-UNESP. E-mail: ivana@fca.unesp.br

O uso de pesticidas para o controle de pragas na agricultura foi muito recorrente a partir de 1940, e esse uso tornou uma grande preocupação ambiental (BRANCO, 1988). Apesar dos benefícios ocasionados por pesticidas e agrotóxicos, o problema de intoxicações devido a esses defensivos agrícolas preocupa as autoridades, especialmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa desses produtos que contaminam a água, o solo e uma grande variedade de alimentos. O uso de alguns desses compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (JORGENSEN, 2001).

Principais pesticidas e sua relação com a saúde humana

Pesticidas, também conhecidos como agrotóxicos, são considerados qualquer substância capaz de destruir, impedir ou repelir qualquer praga, podendo ser um agente químico ou biológico (bactéria ou vírus). Entretanto, sua utilização pode ocasionar diversos problemas à saúde humana, por exemplo: dificuldades respiratórias, problemas de memória, problemas de pele, câncer e depressão (LOPEZ, *et al.*, 2016).

Devido a sua grande variedade, pesticidas são categorizados em grupos de acordo com a sua estrutura química:

- Organoclorados

São poluentes orgânicos persistentes (POP) que se caracterizam por longos ciclos de vida no ambiente. Possuem efeitos nocivos à saúde humana e animal, principalmente no sistema nervoso central, interferindo na sinapse, sendo também considerados bioacumulativos (BAIRD, 2002). Aldrin, endosulfan, DDT, dicofol e metoxiclor são alguns pesticidas organoclorados que já foram utilizados na agricultura.

- Organofosforados

Pesticidas organofosforados são compostos que derivam do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ditiofosfórico. Sendo os mais relevantes para o uso no combate a pragas, os Diclorvós (DDVP), os Temefós e os Clorpirifós (SAVOY, 2014).

- Carbamatos

Uma das classes mais importante de pesticidas é a dos carbamatos. Esses compostos, derivados do ácido carbâmico, são, provavelmente, os inseticidas com a mais extensa gama de atividades biocidas (DHOUIB, *et al.*, 2016). A Figura 2 mostra a estrutura química dos pesticidas carbamatos biologicamente ativos.

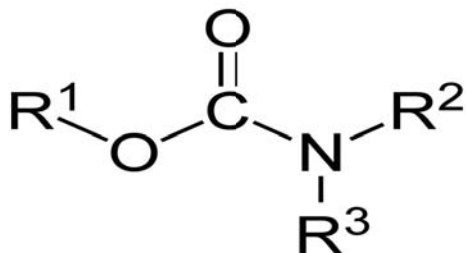


Figura 2. Estrutura geral dos carbamatos

Devido ao grande uso de diversos pesticidas, a sua contínua monitoração em baixos níveis de concentração tem sido uma das grandes dificuldades de cientistas e de pesquisadores. Desenvolver novas tecnologias que permitam determinar pequenas quantidades de pesticidas em amostras ambientais (água, alimentos e terra) é um grande desafio para pesquisadores em respeito à saúde humana (CESARINO, *et al.*, 2012).

Análise de pesticidas

Tradicionalmente, técnicas cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou Cromatografia Gasosa (GC) são utilizadas para a análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais (solo e água). São técnicas altamente precisas que podem fornecer resultados na escala de nanogramas ou microgramas por litro (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). Entretanto, várias etapas de limpeza, purificação e extração são necessárias para que não haja interferências de outros compostos presentes na amostra, ocasionando um longo tempo de preparo da amostra. Adicionalmente, o uso de grande volume de solventes e de colunas cromatográficas também contribuem para tornar a cromatografia em uma técnica dispendiosa financeiramente (GALLI, DE SOUZA, *et al.*, 2006). Além disso, a principal desvantagem do uso das técnicas cromatográficas é a impossibilidade de poder realizar a análise *in situ*.

Com a necessidade de se desenvolver técnicas analíticas para a determinação de pesticidas que não demandem uma grande quantidade de tempo ou recursos financeiros e que possibilite a análise em campo e *in situ*, a eletroanalítica se mostrou uma área promissora em análises de diferentes compostos orgânicos, poluentes ambientais e endócrinos (COLLINS, 1990).

As principais técnicas eletroanalíticas utilizadas na determinação de pesticidas e de poluentes em geral são: Voltametria Cíclica (CV), Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e Voltametria de Onda Quadrada (SWV). Essas técnicas utilizam a usual célula de 3 eletrodos: o eletrodo de trabalho (o qual pode ser modificado com algum nanomaterial, enzima, anticorpo, etc.), o eletrodo de referência (produzido com prata e cloreto de prata – Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar (um fio de platina).

Biossensores enzimáticos

Eletrodos de trabalho convencionais possuem algumas limitações como, por exemplo, bloqueio gradual da superfície por adsorção de subprodutos de um processo redox ou a dificuldade de diferenciar espécies químicas com características eletroquímicas semelhantes (GORTON, 2005). Com esta problemática, os biossensores surgiram como uma alternativa para se obter resultados analíticos que possuam seletividade e especificidade frente a um analito de interesse.

Biossensores são dispositivos que acoplam compostos biológicos (enzimas, anticorpos ou DNA) a transdutores que transformam o sinal de reconhecimento do analito em uma medida analítica (YAMANAKA, *et al.*, 2009).

Cesarino *et al.* (2013), assim como outros autores, relatam o uso de materiais a base de carbono para imobilização de enzimas. Compostos, como nanotubos de carbono e óxido de grafeno, são alguns exemplos de materiais que possuem propriedades eletroanalíticas interessantes e, quando combinados com componentes biológicos, podem aumentar a sensibilidade do sensor frente a um substrato (analito).

Com o advento de novas tecnologias e de novos materiais para a confecção de biossensores, a determinação de pesticidas se tornou mais sensível e específica. Biossensores baseados em enzimas (biossensores enzimáticos) são usados em conjunto com diferentes materiais em um eletrodo para produzir biossensores específicos.

Biossensor baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A enzima acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos na sinapse. Essa enzima hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) gerando como produtos a colina (Ch) e ácido acético (Figura 3) (RANG, DALE e RITTER, 2001).

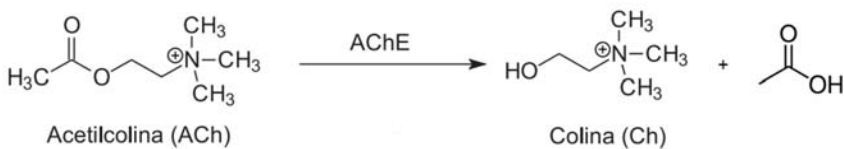


Figura 3. Hidrólise enzimática da acetilcolina

Segundo Patrick (2001), após a transmissão do impulso nervoso, a interação entre a acetilcolina (neurotransmissor) e o receptor deve ser interrompida, caso contrário, o excesso de transmissão nervosa pode levar a problemas de funcionamento do organismo humano. Conseqüentemente, o nosso corpo produz a enzima acetilcolinesterase que, por sua vez, irá hidrolisar o neurotransmissor, em colina e ácido acético, cessando a sinapse.

Pesticidas organofosforados e carbamatos são potenciais inibidores da enzima AChE. A inibição dessa enzima por pesticidas ocasiona a formação de substâncias intermediárias, como, por exemplo, complexos enzima-fosforil, o que leva a diminuição da hidrólise do substrato (JU e KANDIMALLA, 2008)

Pesticidas da classe dos carbamatos, como o carbaril e o metomil atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase, ou seja, diminuem a sua atividade enzimática (CESARINO, MORAES, *et al.*, 2012). Quando essa enzima é inibida, o processo de conversão da acetilcolina em colina fica comprometido, podendo ocasionar sérios problemas neuromotores como, por exemplo, um colapso do sistema nervoso central (DOMINGOS, LONGHINOTTI e MACHADO, 2003).

Biossensor baseado no compósito nanotubos de carbono e polianilina na determinação de pesticidas

Com o intuito de se criar novas metodologias analíticas para a determinação de pesticidas em amostras ambientais, os biossensores enzimáticos baseados no compósito nanotubos de carbono e polianilina se tornaram um excelente material para a imobilização da enzima AChE.

- Nanotubos de Carbono

Quando descobertos em meados de 1990, os nanotubos de carbono (CNTs) atraíram grande interesse de pesquisadores devido as suas propriedades eletroquímicas singulares (QIU e YANG, 2017). Podemos pensar nesse material como uma folha de grafeno (estrutura hexagonal) enrolada na forma de um cilindro. Esses nanotubos podem ser utilizados para modificar a superfície de eletrodos de trabalho, para se melhorar a resposta analítica durante uma análise. CNTs possuem grande aplicação na eletroquímica e bioeletroquímica, devido às propriedades: alta condutividade elétrica, estabilidade química, grande área superficial e elevada força mecânica (MORAES, *et al.*, 2009)

- Polianilina

Considerado um dos melhores polímeros condutores, a polianilina possui alta condutividade elétrica e boa aplicação devido a sua fácil manipulação e preparo. Quando combinada aos CNTs, o material compósito exibe algumas características como, por exemplo, atividade redutora em pHs neutros (DO NASCIMENTO, CORIO, *et al.*).

No presente trabalho, um compósito baseado em nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) e polianilina (PANI) foi eletrodepositado no eletrodo de carbono vítreo (GC) para a imobilização da enzima AChE, no desenvolvimento de um biossensor para a detecção do pesticida carbaril em amostras de maçã.

Experimental

Preparação do Biossensor de AChE

Inicialmente foi realizada uma etapa de limpeza do eletrodo GC. A limpeza constituiu em polimento do eletrodo em suspensão de alumina 0,5 μm , seguido de banho de ultrassom em etanol por cinco minutos e em água ultrapura por mais cinco minutos. Após, o eletrodo GC foi imerso em 25 mL de uma solução H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} contendo 500 μL de anilina (Sigma-Aldrich) e 7,0 mg de MWCNT (Sigma-Aldrich) funcionalizado (MORAES, *et al.*, 2011). A técnica de voltametria cíclica (Autolab PGSTAT128N) foi utilizada para a eletropolimerização do compósito MWCNT/PANI no intervalo de -0,2 a +0,8V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O eletrodo GC modificado com o filme MWCNT/PANI foi removido da solução e, após a secagem em temperatura ambiente, 7,0 μL de uma solução 10 mg/mL da enzima AChE de eritrócitos bovinos (426 U mg^{-1} , Sigma-Aldrich) foi gotejada na superfície do eletrodo. O biossensor foi seco a temperatura ambiente e, após, armazenado em uma solução tampão fosfato (PBS) 0,2 mol L^{-1} pH 7, antes de ser utilizado.

Resultados e Discussão

Caracterização Morfológica do Biossensor

As características morfológicas do biossensor foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons (FEG-SEM). A Figura 4A apresenta a imagem do biossensor GC/MWCNT/PANI/AChE, na qual é possível observar que os MWCNT foram cobertos pela PANI e que a disposição de tal compósito na superfície do eletrodo GC gera cavidades em que as biomoléculas, como enzimas, podem ser adequadamente imobilizadas. Esses compósitos tridimensionais apresentam muitos grupos nitrogênio provenientes da PANI, os quais são responsáveis pela biocompatibilidade entre o compósito e as biomoléculas. Sendo assim, nenhum agente aglutinante (gluteraldeído ou dimida) é necessário para a imobilização da enzima AChE. Isso constitui uma real contribuição do compósito MWCNT/PANI para a eficiência do biossensor, uma vez que os agentes aglutinantes frequentemente se ligam aos sítios ativos das enzimas, inibindo, assim, a sua atividade. A ancoragem de proteínas na superfície do compósito MWCNT/PANI é indicada pelas setas. O material amorfo ligado aos grupos nitrogênio da PANI está associado à enzima AChE. A Figura 4B apresenta a imagem FEG-SEM das cavidades do compósito MWCNT/PANI e a imobilização computacional da enzima AChE nessas cavidades.

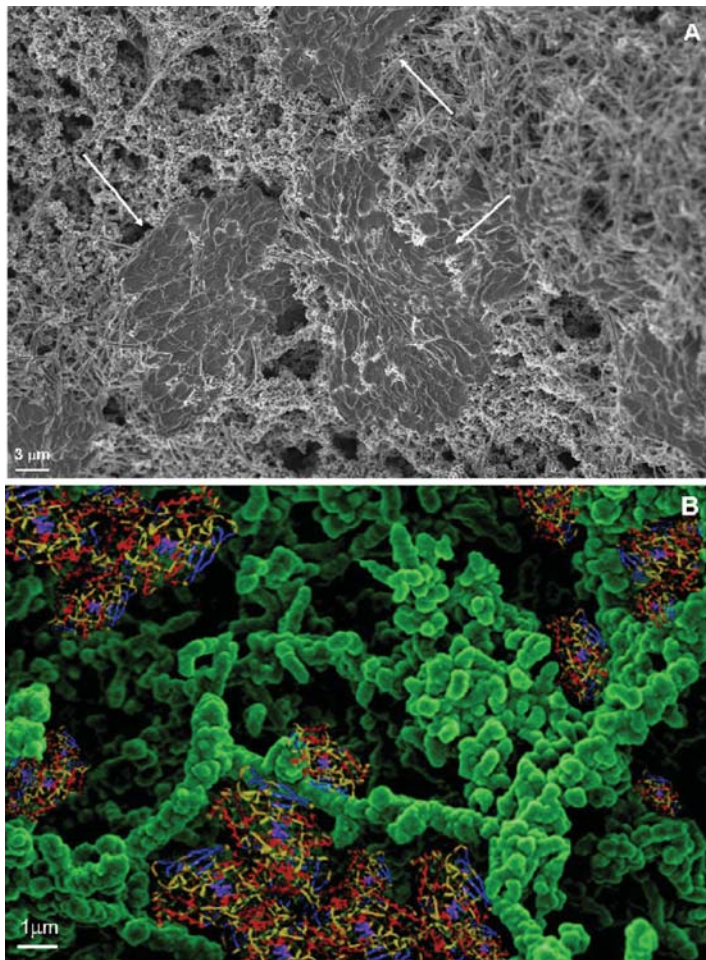


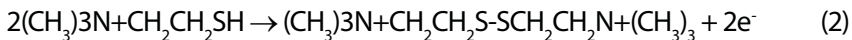
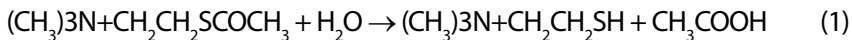
Figura 4. Micrografias FEG-SEM para (A) biossensor GC/MWCNT/PANI/AChE e (B) composto MWCNT/PANI e a imobilização computacional da enzima AChE.

Caracterização Eletroquímica do Biossensor

O biossensor proposto foi avaliado utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada com os seguintes parâmetros: frequência 10 Hz, amplitude de pulso 70 mV, incremento de potencial 2 mV e uma solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7 contendo 20 μmol L⁻¹ do cloreto de acetilcolina (AChC), o substrato da enzima.

O voltamograma de onda quadrada, apresentado na Figura 5A, mostra um pico de oxidação bem definido em aproximadamente +0,1 V. Esse processo

eletroquímico é associado a oxidação da tiocolina gerando o seu respectivo dímero, ditio-bis-colina, como mostrado nas seguintes reações:



O biossensor desenvolvido foi testado na análise do pesticida carbaril, o qual inibe a ação da enzima AChE. É possível observar na Figura 5B que, após a adição de quantidades crescentes de carbaril e um tempo de incubação de 10 min, os voltamogramas de onda quadrada apresentaram correntes de pico menores, embora com o mesmo potencial que o obtido para a oxidação da tiocolina. Isso é associado à adsorção reversível competitiva do carbaril nos sítios ativo da enzima, inibindo sua atividade. Portanto, esse fenômeno pode ser usado para quantificar quantidades de carbaril em amostras de alimentos. Devido ao caráter reversível da inibição dos carbamatos, a atividade do biossensor pode ser restaurada, após o uso, por uma simples imersão do biossensor em solução PBS durante 10 min. Outros testes mostraram que a atividade enzimática recupera seu valor inicial reproduzindo a mesma oxidação da tiocolina obtida antes da inibição.

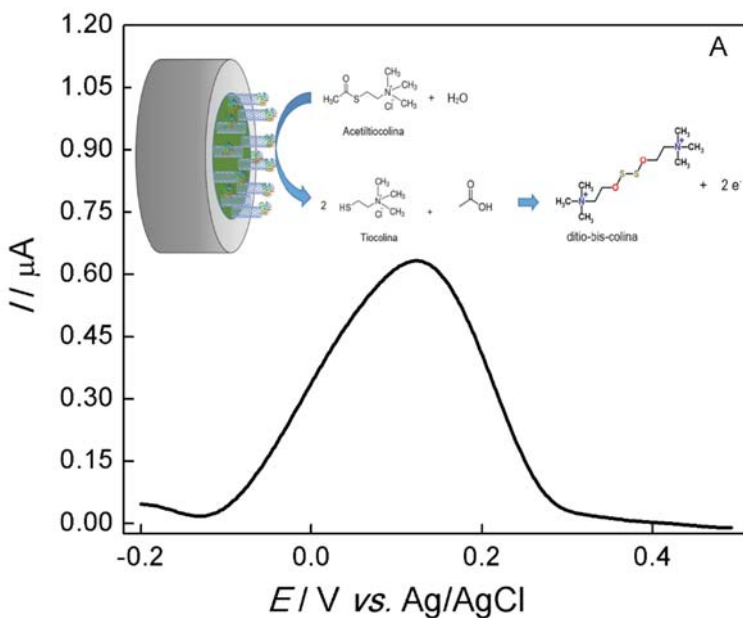


Figura 5. (A) Processo eletroquímico da oxidação da ditio-bis-colina (produto da hidrólise do neurotransmissor)

Um estudo importante realizado foi o tempo em que o biossensor pode ser armazenado sem perda de sensibilidade. Assim, o biossensor GC/MWCNT/PANI/ACHe foi armazenado em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7 a 4 °C durante 60 dias e foram realizados experimentos utilizando o biossensor proposto. Nesse estudo, apresentado na Figura 6, observou-se que, após 60 dias, o biossensor havia perdido somente 8,5 % de sua atividade, o que representa uma estabilidade razoável para este tipo de biossensor.

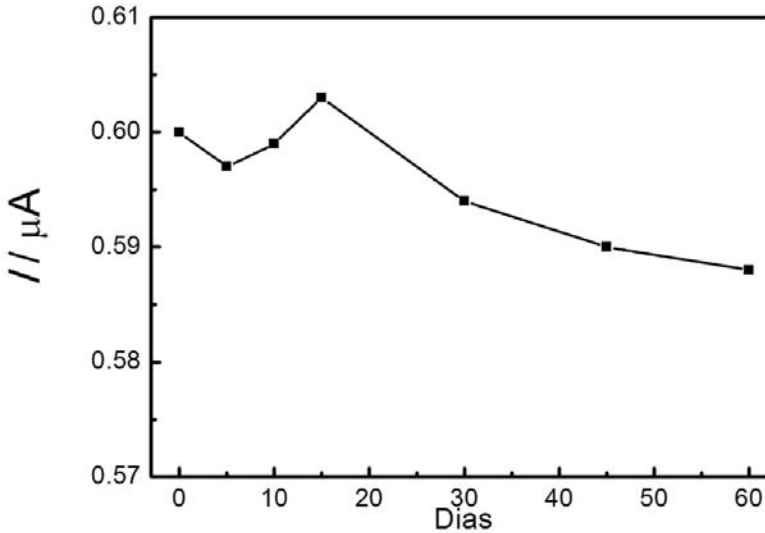


Figura 6. Tempo de vida do biossensor

Desempenho Analítico do Biossensor GC/MWCNT/PANI/ACHe

Com o comportamento voltamétrico do biossensor bem estabelecido, experimentos de voltametria de onda quadrada foram realizados, variando a concentração de carbaril, visando a construção de curvas de calibração como apresentado na Figura 7. Os valores das correntes de pico apresentaram uma resposta linear no intervalo de 9,9 a 49,6 nmol L⁻¹ de acordo com a seguinte equação: $I_{pa} (\mu A) = 0,21 (\mu A) - 0,002 (\mu A/nmol L^{-1}) [carbaril]$, com um coeficiente de correlação de 0,996 (n=5). Um limite de detecção (LOD) de 4,6 nmol L⁻¹ (0,93 µg/kg) foi determinado utilizando três vezes o sinal do branco/coeficiente angular da reta.

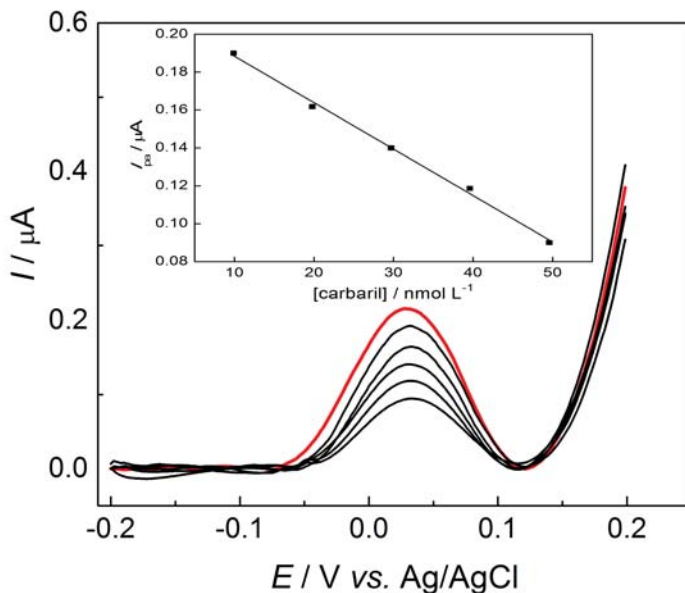


Figura 7. Experimentos de voltametria de onda quadrada para o biossensor GC/PANI/MWCNT/AChE, contendo somente o substrato (linha vermelha) e após adições de carbaril (linha preta). Detalhe: dependência linear da corrente de pico anódica com as concentrações de carbaril.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a aplicação de carbaril é autorizada em algumas culturas como abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, maçã, tomate, dentre outras. O limite máximo de resíduo de carbaril permitido pelas legislações brasileiras varia entre 0,05 a 100 mg/kg, sendo o LOD determinado pelo método proposto baixo o suficiente para determinação de carbaril em relação ao limite máximo de resíduo permitido pelas legislações brasileiras. Sendo assim, o biossensor proposto foi aplicado na determinação de carbaril em amostras de maçã como apresentado na Figura 8. Os resultados obtidos (média \pm SD) utilizando o método de adição de padrão para três determinações foram: $1,68 \pm 0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,34 \pm 0,02 \text{ mg/kg}$), sendo esse valor inferior ao teor máximo de resíduos de carbaril permitido pela ANVISA, que é de 2,0 mg/kg.

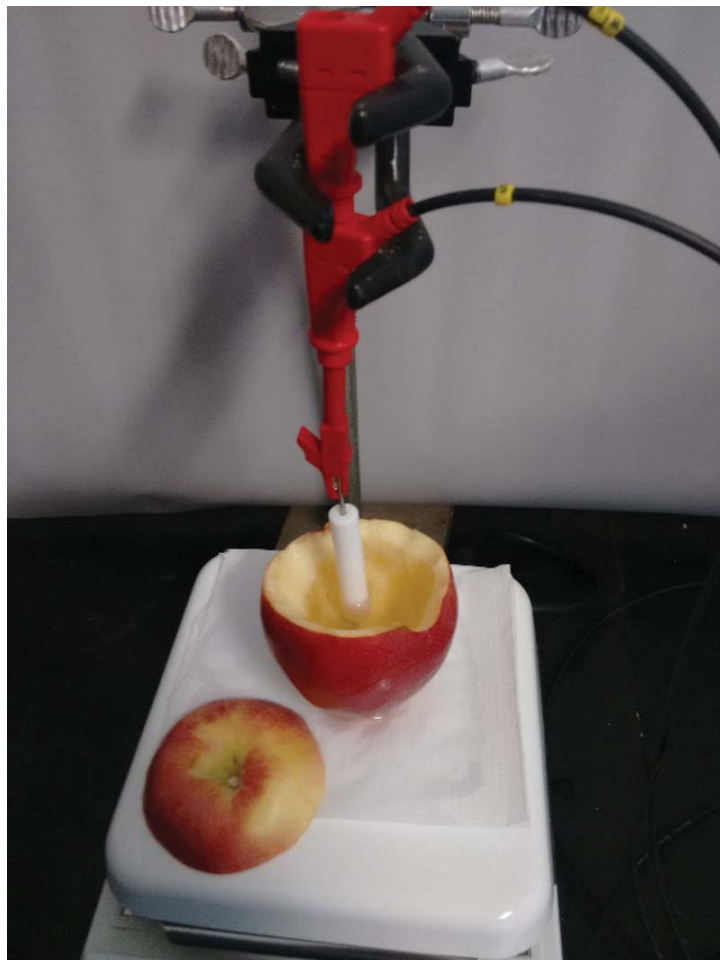


Figura 8. Ensaio eletroquímico do biossensor em amostra de maçã.

Conclusão

O biossensor desenvolvido foi caracterizado e aplicado com sucesso na determinação do pesticida carbaril em amostras de maçã, demonstrando ser uma metodologia conveniente para o controle de pesticidas em alimentos. O biossensor GC/MWCNT/PANI/AChE apresentou estabilidade a longo prazo, sem requer o uso de mediadores ou agentes aglutinantes, sendo promissor para futuras aplicações na área de biossensores.

Referências

- BAIRD, C. **Química Ambiental: Produtos Orgânicos Tóxicos**. 2ª. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BRANCO, S. M. **O Meio Ambiente em Debate**. São Paulo: Moderna, 1988.
- CESARINO, I. et al. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. **Food Chemistry**, São Carlos, v. 135, p. 873-879, Maio 2012.
- CESARINO, I. et al. Biosensor based on electrocodeposition of carbon nanotubes/polypyrrole/laccase for neurotransmitter detection. **Electroanalysis**, São Carlos, v. 25, p. 394-400, 2013. ISSN 2.
- COLLINS, C. H. **Pincípios básicos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 1990.
- DHOUB, I. B. et al. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. **Journal of Applied Biomedicine**, Tunis, v. 4, p. 85-90, 2016.
- DO NASCIMENTO, G. M. et al. Synthesis and characterization of single-wall-carbon-nanotube-doped emeraldine salt and base polyaniline composites. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 815-822.
- DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G. Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 773, p. 49, 2003.
- GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, São Carlos, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
- GORTON, L. **Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques**. 1ª. ed. [S.l.]: Elsevier Science, 2005.
- JORGENSON, J. L. Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition fate, bioaccumulation, toxicology and epidemiology in the United States. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 113-139, Março 2001.
- JU, H.; KANDIMALLA, V. B. Biosensors for pesticides. In: **Electrochemical Sensors, Biosensors And Their Biomedical Applications**. [S.l.]: Academic Press, 2008. p. 35-36.
- LOPEZ, A. et al. Risk assessment of airborne pesticides in a Mediterranean region of Spain. **Science of the Total Environment**, Valencia, v. 574, p. 724-734, Outubro 2016.
- MORAES, F. C. et al. A new indirect electroanalytical method to monitor the contamination of natural waters with 4-nitrophenol using multiwall carbon nanotubes. **Electroanalysis**, São Carlos, v. 21, p. 1091-1098, 2009.
- MORAES, F. C. et al. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. **Surface Science**, São Carlos, v. 605, p. 435-440, 2011.
- PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2ª. ed. [S.l.]: Ed. Oxford, 2001. 432 p.

QIU, H.; YANG, J. Structure and Properties of Carbon Nanotubes. In: ELSEVIER **Industrial Applications of Carbon Nanotubes**. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 47-69.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Drogas que Inibem a Cholinesterase**. 4ª. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2001. 110-115 p.

RODRIGUES, N. R. Agrotóxicos: Análises de Resíduos e Monitoramento. **Multi Ciência - Construindo a História de Produtos Naturais**, Campinas, v. 7, Outubro 2006.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos Agrotóxicos. **Instituto Biológico**, São Paulo, Abril 2014. 91-92.

UNEP. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Global Report. Switzerland: [s.n.], 2003.

YAMANAKA, H. et al. **Biossensores Eletroquímicos**. 1ª. ed. [S.l.]: Instituto de Química - UNESP Araraquara, 2009.