



MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS COM NANOTUBOS DE POLIPIRROL E CARBONO PARA APLICAÇÃO EM BIOSENSORES

Nátalie G. D. Müller¹; Rodrigo Morawski²; Mariana Brombatti³; Jacqueline F. L. Santos^{1,2}

¹Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

nataliegd@gmail.com

Palavras-Chave: Biossensores, Pesticidas, Acetilcolinesterase.

Introdução

A utilização de pesticidas se popularizou no cenário mundial por possibilitarem o aumento da produção alimentícia em larga escala e o controle de pragas e vetores de doenças. Entretanto, estes compostos estão associados a contaminação de solos e corpos d'água e a graves problemas a saúde humana e da fauna local (1). Trabalhadores rurais são constantemente expostos a esse tipo de contaminante, estando suscetíveis a doenças como o câncer (2). O Brasil é considerado um dos países que mais consome agrotóxicos no mundo, devido à forte dependência do país com a agroindústria e facilidade de registros de novos pesticidas (3,4).

Entre os pesticidas empregados atualmente está o Carbaril, um composto da classe dos carbamatos utilizado para o controle de insetos (5). Ele atua no bloqueio da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh), um mediador sináptico dos impulsos nervosos dos insetos e mamíferos. Com a presença do inseticida, a ACh é acumulada no organismo, levando a estimulação contínua dos músculos, causando tremores, paralisia, convulsões e, ocasionalmente, a morte (6). Em virtude do seu alto potencial de contaminação e intoxicação, o monitoramento do Carbaril em alimentos e água é de suma importância.

Tendo em vista a necessidade de análises precisas, rápidas e de baixo custo, biossensores eletroquímicos enzimáticos consolidam-se como tecnologias promissoras devido a sua especificidade. Os biossensores podem ser desenvolvidos a partir de eletrodos impressos (SPE), dispositivos que integram, em um único substrato, os três eletrodos necessários para uma célula eletroquímica convencional: eletrodo de trabalho (ET), contraeletrodo (CE) e eletrodo de referência (ER) ou pseudo-referência, fornecendo viabilidade comercial, possibilidade de miniaturização e portabilidade para análises *in situ* (7,8). Além disso, o processo de impressão permite a formulação da tinta condutora utilizada, que influencia diretamente nas propriedades transdutoras finas do dispositivo (8). O eletrodo impresso pode ser otimizado ao modificar a sua superfície com filmes de polímeros condutores, como polipirrol, integrados a nanotubos de carbono, pois assim promove-se o aumento da área superficial e uma superfície adequada para



a imobilização da enzima, podendo melhorar a transferência de elétrons para seus sítios catalíticos (9,10). Dessa forma, ao unir as propriedades singulares de dois nanomateriais distintos à seletividade das biomoléculas, busca-se aprimorar a construção do biossensor de forma a melhorar sua aplicação na detecção de pesticidas.

Neste trabalho produziu-se eletrodos impressos utilizando tinta à base de carbono, que foram posteriormente modificados com nanocompósitos de polipirrol e nanotubos de carbono. Foram avaliadas suas propriedades morfológicas, estruturais e eletroquímicas e, subsequentemente, sua viabilidade para aplicação como sensor eletroquímico para detecção de Carbaril, utilizando como elemento de biorreconhecimento a enzima acetilcolinesterase imobilizada na superfície dos eletrodos.

Material e Métodos

Os SPE foram fabricados utilizando uma tinta à base de carbono adaptada da metodologia de Pradela-Filho, composta por grafite e negro de fumo em proporção 4:1 e misturados a solvente e verniz vitral na proporção 3:2 (11). Os moldes dos eletrodos foram confeccionados em papel adesivo colado sobre uma folha de acetato com auxílio de uma impressora de corte Silhouette. Após a remoção do excesso de papel, a tinta de carbono foi aplicada sobre a superfície e seca a temperatura ambiente. Por fim, o restante do papel adesivo foi retirado.

A modificação dos SPE foi realizada por voltametria cíclica (VC), mergulhando-os em uma solução contendo o monômero pirrol ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas, previamente funcionalizados (FMWCNT, 1 mg.mL^{-1}). Foram aplicados três ciclos na janela de -0,3 a +1,3 V com velocidade de varredura 30 mV.s^{-1} . Para avaliar o efeito da temperatura na eletropolimerização, o processo ocorreu em duas condições: à temperatura ambiente de cerca de 25°C (SPE-TA) e a temperatura controlada de 10°C (SPE-TC), uma vez que temperaturas menores favorecem a produção de filmes mais finos, com cadeias menos defeituosas e com maior condutividade (12,13). Por fim, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q para retirar o excesso do material e secos a temperatura ambiente.

A caracterização morfológica dos SPE modificados foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV Zeiss EVO 10), alocado com tensão de aceleração de 10 kV. Estruturalmente, utilizou-se espectroscopia Raman, empregando um microscópio Olympus conectado a um espectrofotômetro Jobyn Ivon e a um detector CCD (Charge Couple Device) refrigerado a nitrogênio líquido. A caracterização eletroquímica foi feita em triplicata por VC utilizando como eletrólito $200 \mu\text{L}$ de uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol.L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, variando a velocidade de varredura de 10 à 100 mV.s^{-1} durante 3 ciclos com a janela de potencial de -0,4 a 0,3 V, permitindo estimar a área eletroativa com a Equação de Randles-Sevcik (Equação 1) (14):

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



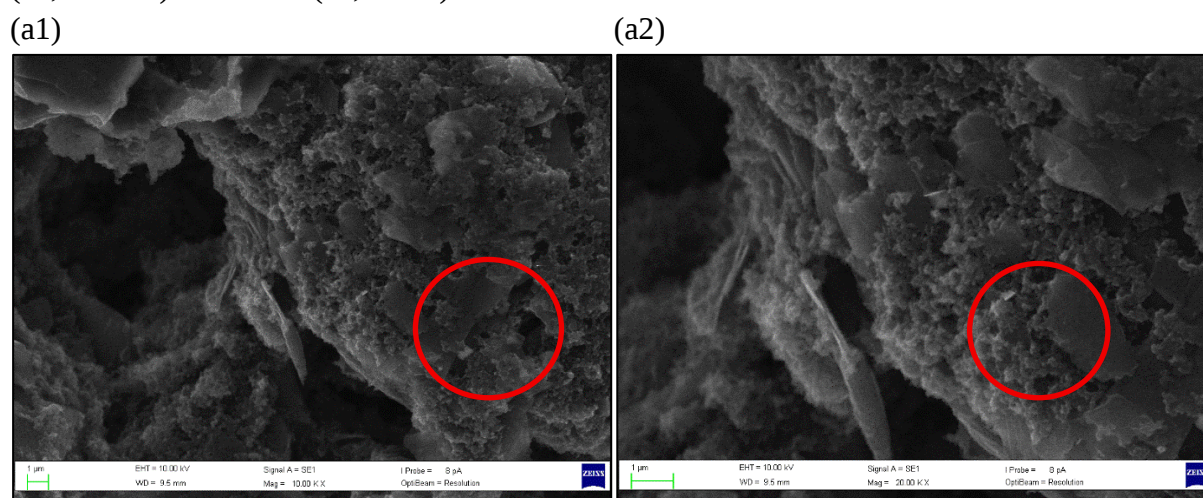
Os SPE modificados atuaram como plataforma para a construção de um biossensor voltado para a detecção do pesticida Carbaril. O dispositivo foi desenvolvido através da imobilização da enzima AChE na superfície pelo método *drop casting*. As análises foram conduzidas em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4, por ser o pH ótimo de atuação da enzima (10).

Primeiramente, a atividade da AChE foi avaliada VC na faixa de potencial entre 0,0 e 1,0 V, com velocidade de varredura de 10 mV.s⁻¹, empregando 200 µL de PBS 0,1 mol.L⁻¹ com 3 mmol.L⁻¹ de ATCL como eletrólito. Para analisar a capacidade de detecção do pesticida, os eletrodos foram incubados por dois minutos em soluções de Carbaril em concentração de 25, 50 e 100 ng.mL⁻¹ preparadas com acetona e PBS 0,1 mol.L⁻¹ (3:7 (v/v)). Após, a medida eletroquímica foi realizada nas mesmas condições iniciais.

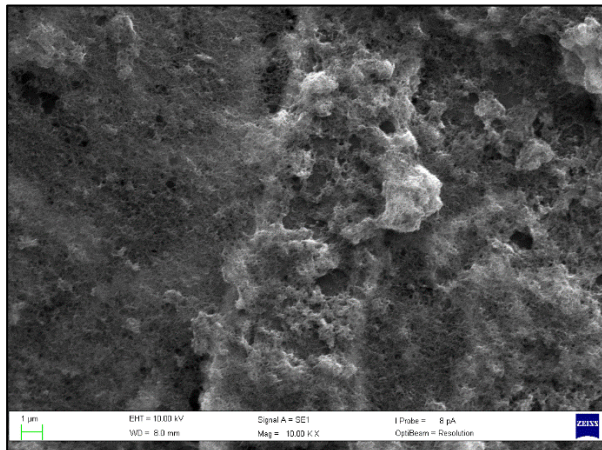
Resultados e Discussão

A análise morfológica por MEV dos SPE sem funcionalização revelou características da composição da tinta condutora, com aglomerados de negro de fumo revestindo as estruturas do grafite. Após a modificação, observa-se a formação de estruturas alongadas, confirmando a deposição do material na superfície. O controle de temperatura de eletrodeposição influenciou na morfologia do filme, que pareceu mais homogêneo em menores temperaturas. As imagens sugerem que, durante a polimerização, o PPI forma-se ao redor da superfície dos FMWCNT (15), que poderia ser promovido pela presença dos grupamentos ácidos decorrentes da funcionalização dos MWCNT, que podem atuar como dopantes na cadeia oxidada no polímero, levando à estrutura resultante.

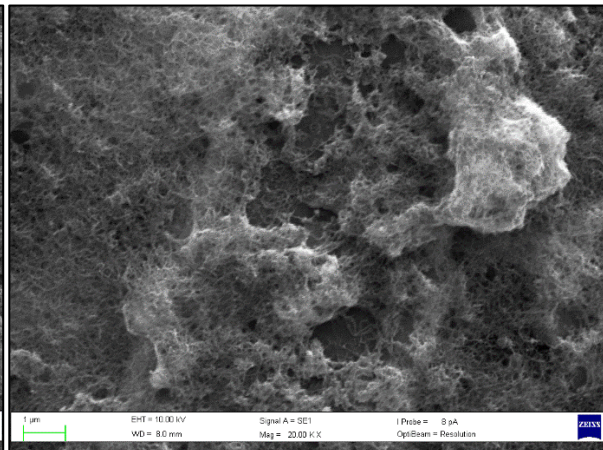
Figura 1. Imagens de MEV dos SPE (a), SPE-TA (b) e SPE-TC (c) com aumento de 10.000x (a1, b1 e c1) e 20.000x (a2, b2 c2).



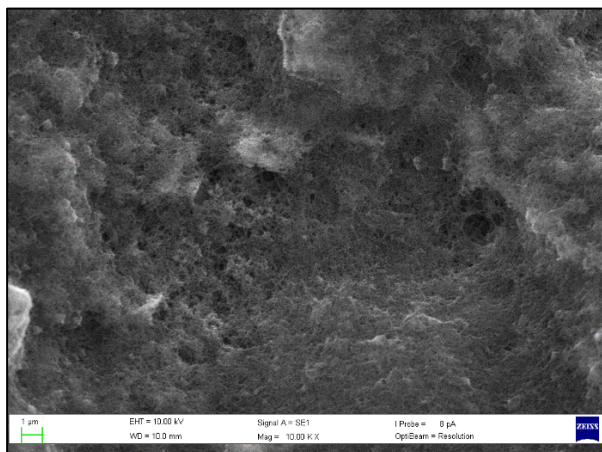
(b1)



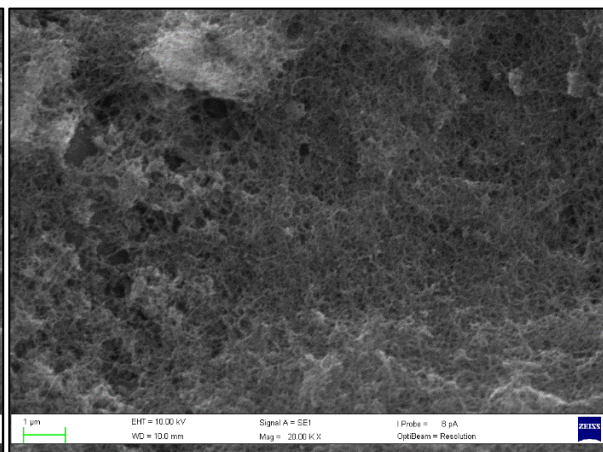
(b2)



(c1)



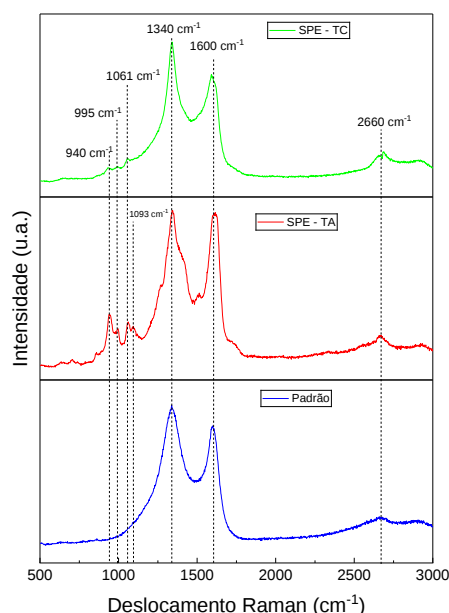
(c2)



Na espectroscopia Raman (Figura 2) observam-se bandas características de materiais a base de carbono: em 1340 cm^{-1} (banda D), referente a defeitos na estrutura do grafite, em 1600 cm^{-1} (banda G), decorrente da vibração dos átomos de carbono nos nanotubos de carbono e nas folhas de grafite e grafeno e em 2660 cm^{-1} (banda 2D ou G'), um *overtone* da banda D que ocorre quando há duas vibrações D ocorrendo no processo de espalhamento, sendo associada a rede cristalina ordenada do material (16,17).

As demais bandas são atribuídas ao PPI, que são dependentes do seu estado redox. A banda presente em 940 cm^{-1} é associada a deformação do anel pirrólico no estado oxidado dicátion (bipolaron), enquanto que a banda encontrada em 995 cm^{-1} se deve a deformação do anel no estado oxidado cátion (polaron) (18). Na faixa de 1000 a 1150 cm^{-1} ocorrem as deformações C-H no plano, que no caso do SPE-TA podem ser divididas em dois picos distintos, em 1061 cm^{-1} se refere ao estado oxidado/cátion (polaron) e em 1093 cm^{-1} ao estado oxidado/dicátion (bipolaron). Outras bandas características do polipirrol são sobrepostas pelas bandas atribuídas aos nanotubos de carbono e a tinta dos eletrodos (19,20).

Figura 2. Espectroscopia Raman dos SPE sem funcionalização (Padrão), SPE-TA e SPE-TC.



A caracterização eletroquímica forneceu informações sobre a transferência de cargas no eletrodo. Na Figura 3 é possível observar que há o aumento da corrente de pico nos eletrodos após a eletrodeposição de PPI-FMWCNT, independente da temperatura em que este processo foi realizado, indicando que os filmes favorecem a transferência de elétrons na interface eletrodo|solução. Avaliando a diferença de potencial entre o pico anódico e catódico (ΔE_p), idealmente próxima a $0,059 \text{ V}/n$ (sendo n o número de elétrons envolvidos na reação) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e a razão entre a corrente de pico anódica e catódica, idealmente igual a 1, observa-se que todos os eletrodos apresentaram $|I_{pa}|/|I_{pc}|$ próximas ao ideal, porém diferem nos resultados de ΔE_p , nos quais os eletrodos modificados obtiveram valores menores. Dessa forma, todos os eletrodos exibiram características de um sistema *quasi-reversível*.

Figura 3. Voltamogramas cíclicos em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol.L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 20 mV.s^{-1} para os SPE, SPE-TA e SPE-TC.

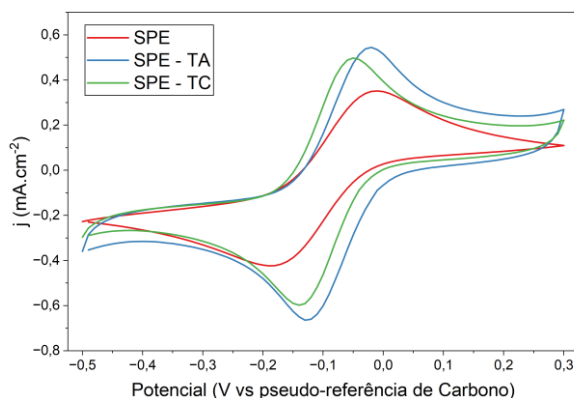
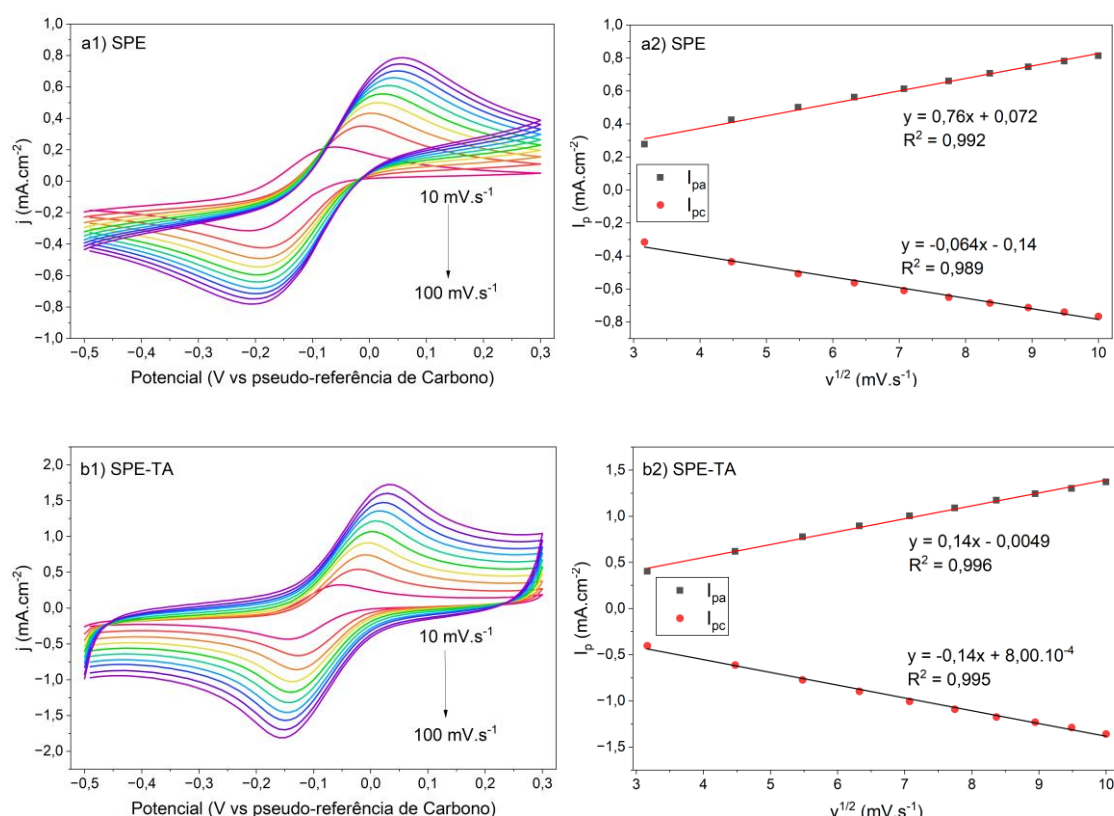


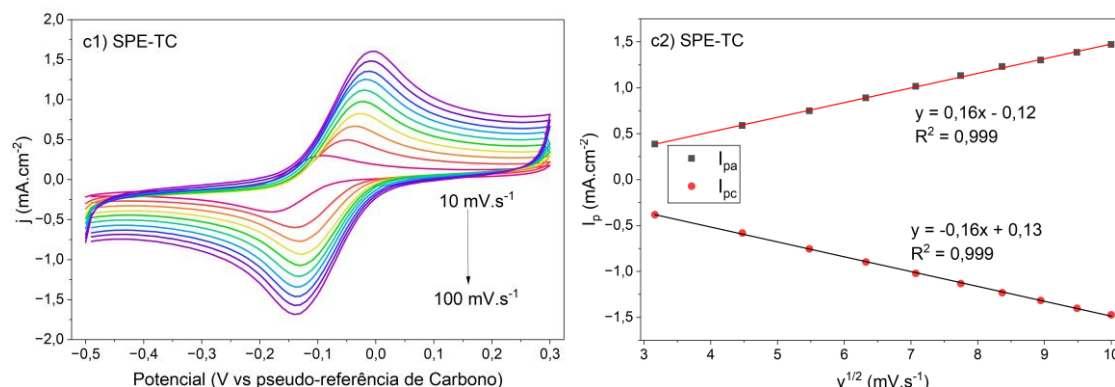
Tabela 1. Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 3.

Parâmetros	SPE	SPE-TA	SPE-TC
$ I_{pa} / I_{pc} $	$0,98 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,01$
ΔE_p (V)	$0,16 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$

Para investigar se o mecanismo controlador da reação eletroquímica na interface eletrodo|solução é difusional ou adsorptivo, avaliou-se a dependência da corrente de pico (I_p) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. A linearidade obtida nesta relação indica um mecanismo difusional, ou seja, a transferência de elétrons é limitada pela difusão das espécies eletroativas na solução em direção à interface eletrodo|solução (21).

Figura 4. Voltamogramas cíclicos em solução de $K_3Fe(CN)_6$ 5 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura (a1, b1, c1). Dependência linear da I_p com a $v^{1/2}$ (a2, b2, c2) para os SPE (a), SPE-TA (b) e SPE-TC (c).





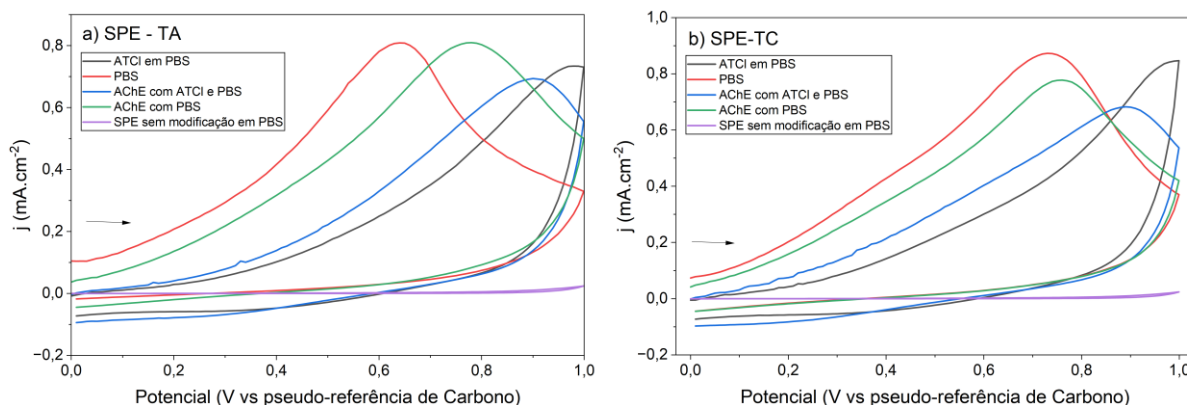
Considerando um comportamento quase-reversível, aplicou-se a Equação de Randles-Sevcik (Equação 1) para estimar a área eletroativa dos SPE. Os resultados mostraram que a modificação superficial promoveu um aumento considerável da área eletroativa, com destaque para os SPE-TC. Isso se deve ao fator citado anteriormente, no qual temperaturas menores possibilitam que a cinética de polimerização do pirrol seja mais lenta, dessa forma, levando a formação de cadeias mais ordenadas, menos defeituosas e, conseqüentemente, maior condutividade.

Tabela 2. Área eletroativa média e desvio padrão para os eletrodos impressos e modificados.

Tinta 2	Área Eletroativa (cm ²)
SPE	0,044 ± 0,003
SPE-TA	0,082 ± 0,003
SPE-TC	0,109 ± 0,015

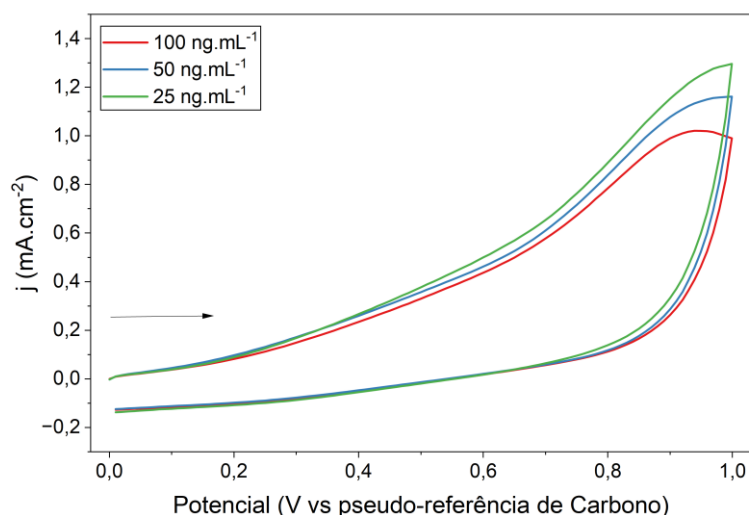
A etapa final do estudo avaliou a aplicabilidade desses eletrodos modificados na construção de um biossensor baseado na inibição da atividade da enzima AChE. Análises de VC mostraram a presença de picos de oxidação em todos os eletrodos modificados, incluindo aqueles sem a AChE imobilizada. No SPE sem modificação esse padrão não é observado, sugerindo que a eletroatividade do nanocompósito é favorecida em PBS 0,1 mol.L⁻¹. Porém, a adição de ATCL ao PBS desloca os potenciais para valores mais altos, além disso, os testes realizados com a enzima imobilizada em ATCL apresentaram potencial de pico de 0,9 V, enquanto apenas em PBS apresentou o valor de 0,77 V, possibilitando a diferenciação do sinal analítico da enzima.

Figura 51. Voltamogramas cíclicos dos SPE-TA (a) e SPE-TC (b) sem imobilização da enzima em ATCL e em PBS, dos eletrodos modificados com imobilização da enzima em ATCL e em PBS e do eletrodo sem modificação.



Por fim, os testes de detecção do pesticida Carbaril confirmaram o princípio de funcionamento do dispositivo. Os voltamogramas resultantes mostraram uma diminuição progressiva da corrente com o aumento da concentração do pesticida, evidenciando a inibição da AChE. O biossensor operou em faixa de concentração compatível com os limites estabelecidos pela resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que restringe o Carbaril a $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$ (águas doces de classe I), 70 ng.mL^{-1} (águas doces de classe III) e $0,32 \text{ ng.mL}^{-1}$ (águas salinas). Estes resultados demonstram o potencial da plataforma desenvolvida para o monitoramento ambiental.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos dos SPE-TA após a incubação em soluções de diferentes concentrações de Carbaril.



Conclusões

O presente trabalho demonstrou a viabilidade e eficiência da produção própria de eletrodos impressos, bem como a sua modificação via eletrodeposição de nanocompósitos de polipirrol e nanotubos de carbono. As técnicas de caracterização confirmaram a formação dos filmes de nanocompósitos em todos os eletrodos avaliados, entretanto os SPE modificados à temperatura



controlada de 10 °C resultaram em superfícies mais homogêneas, com maior área eletroativa e menor quantidade de material depositado, comportamento compatível com a redução da cinética de polimerização em temperaturas mais baixas.

As análises eletroquímicas evidenciaram, para todos os eletrodos modificados, aumento da área eletroativa, maiores correntes faradaicas e comportamento de transferência de carga característico de sistemas *quasi-reversíveis* controlados por difusão. A avaliação do desempenho dos eletrodos como plataforma para biossensores enzimáticos, utilizando a enzima AChE imobilizada na matriz do nanocompósito revelou a ocorrência de potenciais de oxidação relativamente elevados, os quais podem comprometer a estabilidade da biomolécula. Apesar dessa limitação, os ensaios realizados na presença do pesticida Carbaril evidenciaram uma diminuição da densidade de corrente com o aumento da concentração do analito, indicando a ocorrência de inibição da atividade enzimática e demonstrando o potencial do sistema para aplicações em detecção de pesticidas. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram a viabilidade da utilização de filmes de nanocompósitos de polipirrol e nanotubos de carbono como plataforma para biossensores eletroquímicos enzimáticos. No entanto, são necessários estudos adicionais visando tornar sua aplicação prática mais eficiente e confiável.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPERGS e CMMBr-Sul.

Referências

- [1] ABUBAKAR, Y. et al. Pesticides, History, and Classification. Em: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 29–42.
- [2] ERICKSON, P. A. et al. Carbaryl use and incident cancer in the Agricultural Health Study: an updated analysis. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 268, p. 114615, jul. 2025.
- [3] GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; PANIS, C. Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. **Hygiene and Environmental Health Advances**, v. 8, p. 100080, dez. 2023.
- [4] NUNES, A. et al. The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health / O uso de pesticidas no Brasil e os riscos associados à saúde humana. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37885–37904, 13 abr. 2021.
- [5] **C03 – Carbaril. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4219json-file-1/view>>
- [6] SAHANA, A.; AGARWAL, S. Carbaryl and Human Health: A Review. **JOURNAL OF SCIENCE**, v. 2, n. 5, p. 12–22, 10 jan. 2018.
- [7] CARVALHO, J. H. S. et al. Disposable and low-cost lab-made screen-printed electrodes for voltammetric determination of L-dopa. **Sensors and Actuators Reports**, v. 3, p. 100056, nov. 2021.
- [8] NAZIR, S. Advancing point-of-care testing with nanomaterials-based screen-printing electrodes. **Sensors International**, v. 6, p. 100328, 2025.
- [9] WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 7–14, jan. 2005.



- [10] LOGUERCIO, L. F. et al. Efficient acetylcholinesterase immobilization for improved electrochemical performance in polypyrrole nanocomposite-based biosensors for carbaryl pesticide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 339, p. 129875, jul. 2021.
- [11] PRADELA-FILHO, L. A. et al. Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 305, p. 127433, fev. 2020.
- [12] ANSARI, R. Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 186–201, jan. 2006.
- [13] LIANG, W.; LEI, J.; MARTIN, C. R. Effect of synthesis temperature on the structure, doping level and charge-transport properties of polypyrrole. **Synthetic Metal**, v. 52, p. 227–239, [s.d.].
- [14] PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.
- [15] SAHOO, N. G. et al. Polypyrrole coated carbon nanotubes: Synthesis, characterization, and enhanced electrical properties. **Synthetic Metals**, v. 157, n. 8–9, p. 374–379, maio 2007.
- [16] JORIO, A.; SAITO, R. Raman spectroscopy for carbon nanotube applications. **Journal of Applied Physics**, v. 129, n. 2, p. 021102, 14 jan. 2021.
- [17] LEHMAN, J. H. et al. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2581–2602, jul. 2011.
- [18] HAN, G. et al. Electrodeposition of polypyrrole/multiwalled carbon nanotube composite films. **Thin Solid Films**, v. 474, n. 1–2, p. 64–69, mar. 2005.
- [19] INOUE, F. et al. Spectroscopic Characterization of Carbon Nanotube-Polypyrrole Composites. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 31, p. 18240–18248, 7 ago. 2014.
- [20] SCHNOOR, T. I. W. et al. The production of aligned MWCNT/polypyrrole composite films. **Carbon**, v. 60, p. 229–235, ago. 2013.
- [21] REHMAN, N.; PANDEY, A.; PANDEY, A. Thermal reduction synthesis approach of reduced graphene oxide for the preparation of a label-free and prompt immuno sensing of Salmonella enterica via electrochemical techniques. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 48, p. 100789, jun. 2025.