

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO

### ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012

Maria Alice Martins  
Morsyleide de Freitas Rosa  
Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Nicodemus Moreira dos Santos Junior  
Odílio Benedito Garrido de Assis  
Caue Ribeiro  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

**Editores**

Fortaleza, CE  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**  
Rua XV de Novembro, 1452,  
CEP 13560-970 – São Carlos, SP  
Fone: (16) 2107-2800  
Fax: (16) 2107-2902  
<http://www.cnpdia.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,  
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
<http://www.cnpat.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpat.embrapa.br](mailto:sac@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa  
Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira  
Milori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra  
Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.  
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula  
Herrmann Júnior

**Comitê de Publicações da Embrapa  
Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama  
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim  
Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana  
Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano  
Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley  
Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner  
Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures  
Mourão, Viviane Soares  
Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares  
Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabrício Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes,  
Viviane Soares  
Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice,  
Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares  
Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior  
Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui  
violação dos direitos autorais (Lei nº. 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Instrumentação

---

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São  
Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa. Morsyleide de  
Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemos Moreira  
dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz  
Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria  
Tropical.



## UTILIZAÇÃO DE LUPC<sub>2</sub> COMO ENZIMA ARTIFICIAL PARA A DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS VISANDO A INDÚSTRIA DE VINHOS

Edson Giuliani R. Fernandes<sup>1,2\*</sup>, Lais C. Brazaca<sup>1</sup>, Maria Luz Rodríguez-Méndez<sup>3</sup>, Luiz Henrique C. Mattoso<sup>2</sup>, Valtencir Zucolotto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicidade, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brasil

\*efernandes@ursa.ifsc.usp.br

<sup>2</sup>Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química Inorgánica, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, 47011 Valladolid, España

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: PA3

### Resumo

O estudo da composição fenólica em vinhos é de grande importância uma vez que a qualidade e propriedades organolépticas dos vinhos estão diretamente relacionadas com sua composição fenólica. A utilização de enzimas artificiais para aplicação em sensoriamento se mostra interessante uma vez que enzimas são relativamente caras e podem desnaturar. Demonstramos a possibilidade de se utilizar a bisftalocianina de lutécio (LuPc<sub>2</sub>) como enzima artificial na detecção de compostos fenólicos, em filmes LbL. Hidrocloro de polialilamina (PAH) foi utilizado como polication nos filmes LbL.

Palavras-chave: Enzima artificial, Sensor amperométrico, Filme LbL, LuPc<sub>2</sub>, Catecol

### Publicações relacionadas

E. G. R. Fernandes; L. C. Brazaca; M. L. Rodríguez-Mendez; J. A. de Saja; V. Zucolotto. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 4715.

### Introdução

A detecção de compostos fenólicos é de grande interesse em áreas como meio ambiente e indústria de alimentos [1]. Em particular, o estudo da composição fenólica em vinhos é importante para a qualidade dos mesmos a fim de garantir sua autenticidade e propriedades organolépticas [2].

Entre os métodos utilizados para a quantificação de polifenóis, sensores eletroquímicos têm sido a melhor escolha, por serem simples e baratos. O

desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em filmes finos automontados, em particular, tem sido enfatizado uma vez que exibem um grande potencial de miniaturização.

Comumente se utilizam biossensores baseados na enzima tirosinase para a detecção de compostos fenólicos (CFs). A substituição da enzima por alguma molécula que possua certa seletividade e sensibilidade a CFs é altamente desejável. As metalofalocianinas se mostram moléculas promissoras como enzimas artificiais já que

possuem estrutura molecular semelhante ao grupo prostético de proteínas heme (como a hemoglobina).

Este estudo descreve o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em filmes automontados LbL de bisftalocianina de lutécio (LuPc<sub>2</sub>) e hidrocloreto de polialilamina (PAH).

## Materiais e métodos

LuPc<sub>2</sub> foi sintetizada pelo grupo da professora Maria Luz Rodríguez-Méndez (Universidad de Valladolid, Espanha) através da reação direta do 1,2-dicianobenzeno (ftalonitrila) com acetato de lutécio de acordo com publicação anterior [3]. Eletrodos de ITO foram adquiridos da Delta Technologies. Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico e usados sem qualquer purificação prévia. A água ultrapura, utilizada para os filmes automontados, os experimentos eletroquímicos e as soluções, foi obtida a partir do sistema de água Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ.cm). Os filmes automontados foram fabricados através da deposição alternada de LuPc<sub>2</sub> e hidrocloreto de polialilamina (PAH). Inicialmente, os eletrodos foram imersos em solução de PAH (água, 1 g.L<sup>-1</sup>) por 3 min, em seguida, lavados em água por alguns segundos e gentilmente secos em fluxo de N<sub>2</sub>. A segunda camada foi formada pela imersão do eletrodo em uma solução de LuPc<sub>2</sub> (clorofórmio, 1 g.L<sup>-1</sup>) por 3 min, e secagem ao ar. O processo foi repetido manualmente até se obter o número desejado de bicamadas (PAH/LuPc<sub>2</sub>). Medidas de rugosidade dos filmes foram realizadas com um perfilômetro Veeco Dektak 150. Medidas de cronoamperometria foram realizadas sob um potencial de trabalho aplicado de +0,3 V (vs. SCE) por adições sucessivas de 50 μM de catecol (volume da célula de 10 mL). Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25,0 °C). A solução de catecol foi preparada em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). O sinal de resposta foi obtido após 2 min. Antes de cada medida, a solução era agitada suavemente por 1 min (para sua homogeneização) e o sistema, colocado em circuito aberto pelo mesmo período de tempo. Soluções padrão novas de catecol foram preparadas antes de cada experimento.

## Resultados e discussão

O crescimento do filme foi monitorado através da medição da absorção máxima da banda Q da

metaloftalocianina em função do número de bicamadas depositadas (Fig. 1).

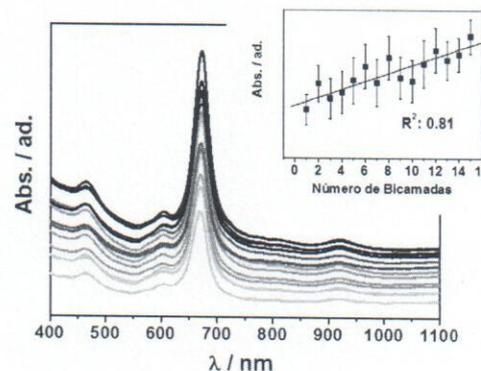


Fig. 1. Crescimento do filme LbL PAH/LuPc<sub>2</sub> por UV-vis. A inserção mostra dependência linear da absorbância em 620 nm como função do número de bicamadas.

A rugosidade média e rugosidade média quadrática (para filmes com 2, 7 e 13 bicamadas) estão mostradas na Tabela 1:

Tabela 1 - Rugosidades médias (Ra e Rq) obtidas com resolução de 0,033 μm/medida.

Rugosidade (nm)	ITO	Filme 2-Bicamadas	Filme 7-Bicamadas	Filme 13-Bicamadas
R <sub>a</sub> (100 μM)	2,00±0,11	1,60±0,32	1,05±0,05	1,07±0,16
R <sub>q</sub> (100 μM)	2,50±0,04	1,97±0,37	1,25±0,05	1,28±0,22
R <sub>a</sub> (400 μM)	2,04±0,05	1,51±0,05	1,06±0,04	1,14±0,04
R <sub>q</sub> (400 μM)	2,45±0,04	1,25±0,08	1,25±0,08	1,32±0,03

O valor da rugosidade para os filmes LbL se apresentam menores que a do substrato de ITO. O filme com maiores valores de rugosidade foi aquele contendo 2 bicamadas: a rugosidade para filmes contendo maior número de bicamadas não se altera significativamente (como mostrado na Tabela 1). Consequentemente, uma melhor sensibilidade é esperada para filmes contendo poucas bicamadas, devido à maior área efetiva do filme. Foi escolhido para a fabricação dos sensores filmes contendo 2 bicamadas.

Os filmes automontados se mostraram estáveis, mesmo após 40 ciclos (VC) sem mudança significativa no potencial dos picos.

Para se confirmar o melhor potencial de aplicação para os filmes LbL, estudou-se a resposta de corrente como função do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em presença de catecol (400 μM). A resposta de corrente anódica cresceu até +0,4 V, após o qual, permaneceu constante em valores de aproximadamente 10 μA (Fig. 2). Cerca de 80% da corrente de resposta é alcançada no

potencial escolhido de +0.3 V, para medidas amperométricas.

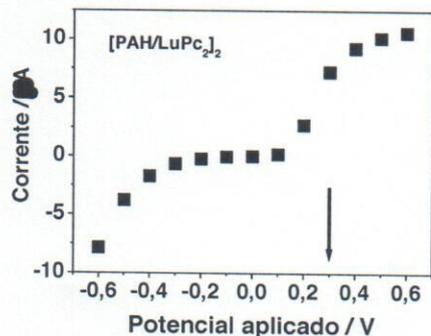


Fig. 2. Resposta cronoamperométrica para o sensor [PAH/LuPc<sub>2</sub>]<sub>2</sub> vs. Potencial aplicado (vs. SCE) em solução de catecol (400 μM) em PBS.

Foi escolhido o catecol como representante de compostos fenólicos (CFs). O catecol é o melhor substrato para a enzima tirosinase, usualmente utilizada em biossensores para detecção de CFs

Os resultados de cronoamperometria para adições sucessivas de catecol, em potencial de trabalho de +0,3 V vs SCE em PBS (0,1 M, pH 7,0), são apresentados na Fig. 3. Uma curva analítica aparece na inserção da Fig. 3. Os desvios padrão dos pontos na curva tratam-se da média de três eletrodos distintos (resposta em 60 s). A relação entre a corrente de resposta e a concentração de catecol apresentou uma faixa dinâmica de até 900 μM (Fig. 3) ( $R^2 = 0,994$ ) [4].

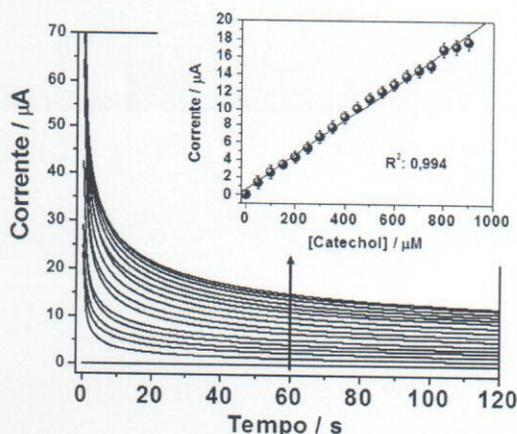


Fig. 3. Curvas cronoamperométricas típicas para o sensor [PAH/LuPc<sub>2</sub>]<sub>2</sub>. Inserção: curva analítica para catecol (cada ponto corresponde à média para 3 eletrodos distintos).

O limite de detecção (LD) para o catecol foi calculado de acordo com o critério  $3S/b$ , onde  $S$  é o desvio padrão ( $n=10$ ) do branco (solução tampão) e  $b$  é a inclinação da curva analítica. O LD foi

estimado em  $3,75 \times 10^{-7}$  M para a resposta cronoamperométrica. A sensibilidade dos filmes automontados de PAH/LuPc<sub>2</sub> para catecol (coeficiente angular da  $I_p$  vs [catecol]) foi de  $20 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ .

## Conclusões

Neste estudo, apresentamos o desenvolvimento de um sensor de compostos fenólicos baseado em filmes automontados de bisftalocianina de lutécio (LuPc<sub>2</sub>) e policloreto de alilamina (PAH). Por cronoamperometria, os sensores apresentaram uma ampla faixa linear ( $R^2 = 0,994$ ) de até 900 μM e limite de detecção (LD) de  $37,5 \times 10^{-8}$  M (sensibilidade de  $20 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ) para o catecol. O sensor de PAH/LuPc<sub>2</sub> pode ser utilizado em uma grande faixa de concentrações de catecol, e parece ser adequado para a determinação de polifenóis em amostras reais. O sensor aqui desenvolvido tem boa reprodutibilidade e pode ser reutilizado pelo menos por doze vezes, com uma diminuição do sinal de resposta de cerca de 7% (após a primeira medida). Também é importante enfatizar que os sensores baseados em filmes LbL de PAH/LuPc<sub>2</sub> não requerem a adição de peróxido de hidrogênio, comum a outros sensores biomiméticos.

## Agradecimentos

FAPESP, FINEP, CAPES, CNPq, EMBRAPA e ao Ministério de Ciência da Espanha (grant AGL2009-12660/ALI).

## Referências

1. A. J. Quemada; F. L. Mota; S. P. Pinho; E. A. Macedo *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 6582.
2. C. Apetrei; I. M. Apetrei; I. Nevares; M. Del Alamo; V. Parra; M. L. Rodríguez-Méndez; J. A. de Saja *Electrochim. Acta* 2007, 52, 2588.
3. M. Linaje; M. C. Quintanilla; A. Gonzales; J. L. Del Valle; G. Alcaide; M. L. Rodríguez-Méndez *Analyst* 2000, 125, 341.
4. E. G. R. Fernandes; L. C. Brazaca; M. L. Rodríguez-Méndez; J. A. de Saja; V. Zucolotto. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 4715.