

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Química

MURILO TEODORO MARTINEZ

Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe dos carbamatos

São Carlos

2011

MURILO TEODORO MARTINEZ

Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe dos carbamatos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica.

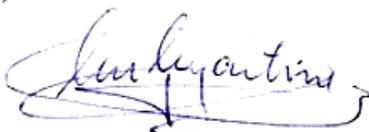
Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 06 / 06 / 2011



Murilo Teodoro Martinez

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Martinez, Murilo Teodoro

Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe dos carbamatos. / Murilo Teodoro Martinez. -- São Carlos, 2011.

111 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2011.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

1. Biossensores. 2. Carbamatos. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela existência e por poder, a cada dia, tornar-me digno de sua essência e luz.

Em especial, agradeço à minha mãe Sandra, meus irmãos Diego e Gustavo, minha querida e santa Vó Zica. Muito obrigado por ser parte de vocês!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela oportunidade, orientação, confiança e profissionalismo dedicados durante esses dois anos.

Também gostaria de agradecer minha namorada, Geissianny. Minha vida é muito mais fácil, clara, bela e plena com você ao meu lado.

Quero agradecer aos meus amigos Eduardo, Dyovani, Deodato, Diego, Fernando, Murilão, Ivana, Rafael, Sâmea, Cláudia, Okumura, Lívia, Milena, Picon, João Tiengo, Marcelo Calegaro e Pimpão, que me acompanharam e ajudaram nesses dois gloriosos anos.

À CNPq pela bolsa concedida.

Obrigado a todos!

"Na simplicidade aprendemos que reconhecer um erro não nos diminui, mas nos engrandece, e que as pessoas não existem para nos admirar, mas para compartilhar conosco a beleza da existência..."

Mário Quintana

"As pessoas não debatem conteúdo, apenas rótulos. Meu tempo tornou-se escasso para debater rótulos, quero a essência, minha alma tem pressa. O essencial faz a vida valer a pena e, para mim, basta o essencial..."

Mário de Andrade

RESUMO

No campo da eletroanalítica existe uma intensa atividade de pesquisa sobre eletrodos de pasta de carbono. As principais vantagens da pasta de carbono são a rapidez e a simplicidade do processo de preparação, e a possibilidade de renovação da superfície do eletrodo a cada nova medida. Isso é possível devido à modificação interna do material eletródico, em que o modificador escolhido está diretamente relacionado com o analito de interesse a ser determinado. Os biossensores de pasta de carbono são muito utilizados na determinação de pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos pelo processo de inibição enzimática. Um dos principais problemas na determinação de substâncias utilizando eletrodos de pasta de carbono e biossensores de pasta de carbono é o seu alto limite de detecção, que dificulta a análises traços de substâncias. Uma opção que há décadas vem sendo adotada é a utilização dos eletrodos de nanotubos de carbono, funcionalizados ou não, na elaboração da pasta. Estes sensores, juntamente com os biossensores de pasta de nanotubos de carbono, possuem propriedades catalíticas e estruturais que fornecem um menor limite de detecção e quantificação na determinação de várias substâncias associadas. Estas características são singulares e inerentes à conformação dos nanotubos de carbono, sendo a elevada área ativa e poder eletrocatalítico umas das propriedades destes nanomateriais mais relatadas na literatura. Diante da falta de trabalhos que descrevam, paralelamente, o desempenho destes biossensores na determinação de carbamatos, neste trabalho objetivou-se explorar comparativamente o comportamento eletroquímico de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para a determinação dos pesticidas carbaril e metomil. Estes nanotubos foram purificados em meio ácido e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura e por voltametria cíclica. Parâmetros cinéticos da enzima acetilcolinesterase como a constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima de hidrólise do substrato acetiltiocolina foram obtidos e analisados pelo método espectrofométrico. Os biossensores confeccionados tiveram seus parâmetros eletródicos de operação otimizados e foram utilizados na determinação do pesticida carbaril em amostra fluvial. Os biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase apresentaram uma repetibilidade com desvio padrão relativo de 2,44% e 1,77%, respectivamente. A reprodutibilidade dos biossensores elaborados apresentou um desvio padrão relativo de 6,60% e 4,13%, respectivamente. Na determinação do pesticida carbaril, os biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase apresentaram um limite

de detecção de 0,0389 e 0,0163 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Na determinação do pesticida metomil, os biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase apresentaram um limite de detecção de 0,0398 e 0,0083 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Em ambas as determinações, o biossensor elaborado com os nanotubos funcionalizados apresentou maior sensibilidade. Quando comparado com o biossensor de pasta de carbono frente à determinação do carbaril, o biossensor de pasta de nanotubos apresentou um limite de detecção aproximadamente 2,4 vezes menor e, quando comparado com o biossensor de pasta de carbono na determinação do pesticida metomil, o biossensor de pasta de nanotubos apresentou um limite de detecção aproximadamente 5 vezes menor. Os limites de quantificação dos biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase, para os pesticidas carbaril e o metomil, foram de 0,1297 e 0,0542 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 0,1323 e 0,0277 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O biossensor de pasta de nanotubos de carbono modificado com a enzima acetilcolinesterase foi aplicado na determinação de carbaril em amostra de água de rio e ácido húmico, fornecendo um LD de 0,0722 e 0,0704 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Comparado com a curva original realizada em tampão fosfato, este biossensor apresentou um limite de detecção e quantificação de aproximadamente 4,32 e 4,43 vezes maior no procedimento utilizando ácido húmico e água fluvial, respectivamente.

ABSTRACT

There in the field of electroanalytical an intense research activity on carbon pastes electrodes. The main advantages of carbon paste are the speed and simplicity of the preparation process, and the possibility of renewing the electrode surface with each new measure. This is possible due to the internal modification of the electrode material, in which the modifier selected is directly related to the analytes to be determined. The carbon paste biosensors are widely used in determining the class of pesticides organophosphates and carbamates by enzyme inhibition process. A major obstacle to the determination of substances with a carbon paste electrode and carbon nanotubes paste biosensors is its high detection limit, which complicates the analysis of trace substances. One option that has for decades been adopted is the use of electrodes of carbon nanotubes, functionalized or otherwise, in elaboration of the paste. These sensors, together with the carbon paste nanotubes biosensors, have structural and catalytic properties that provide a lower limit of detection and quantitation in the determination of several related substances. These characteristics are natural and inherent in the arrangement of carbon nanotubes, the high electrocatalytic active area and catalytic power properties of these nanomaterials are most often reported in the literature. Given the lack of studies that describe, in parallel, the performance of these biosensors in the determination of carbamates, this study aimed, comparatively, to explore the electrochemical behavior of carbon paste and carbon nanotubes paste biosensors modified with enzyme acetylcholinesterase to determine pesticide carbaryl and methomyl in distilled and river water. These nanotubes were purified in acidic medium and characterized by scanning electron microscopy and cyclic voltammetry. The kinetic parameters of acetylcholinesterase as the Michaelis-Menten constant and Maximum Velocity of hydrolysis of acetylthiocholine were obtained and analyzed by spectrophotometric method. Biosensors fabricated electrodes had their parameters optimized operation and were used in the determination of carbaryl pesticide in a sample fluvial. Carbon paste and carbon nanotubes paste biosensors modified with enzyme acetylcholinesterase showed a repeatability with relative standard deviation of 2.44% and 1.77%, respectively. The reproducibility of the biosensor developed showed a relative standard deviation of 6.60% and 4.13%, respectively. In determining the pesticide carbaryl, the carbon paste and carbon nanotubes paste biosensors modified with enzyme acetylcholinesterase showed a detection limit of 0.0389 and 0.0163 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In determining the pesticide methomyl, the carbon paste and carbon nanotubes paste biosensors modified with enzyme acetylcholinesterase showed a detection limit of 0.0398 and 0.0083

$\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In both determinations, the biosensor prepared with functionalized nanotubes showed higher sensitivity. Compared with the carbon paste biosensor in the determination of carbaryl, the nanotubes paste biosensor showed a detection limit of approximately 2.4 times lower and, when compared with the carbon paste biosensor in the determination of the pesticide methomyl, the biosensor elaborated with nanotubes showed a detection limit of approximately five times lower. The limits of quantification of carbon paste and carbon nanotubes paste biosensors modified with enzyme acetylcholinesterase, in the determination of carbaryl and methomyl pesticides, were 0.1297 and 0.0542 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 0.1323 and 0.0277 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The carbon nanotubes biosensor modified with the enzyme acetylcholinesterase was applied to the determination of carbaryl in the sample of river water and humic acid, giving a detection limit of 0.0722 and 0.0704 mol L^{-1} , respectively. Compared with the original curve performed in phosphate buffer, the biosensor showed a detection and quantification limit of approximately 4.32 and 4.43 times higher in the procedure using humic acid and fluvial water, respectively.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do nanotubo de carbono de parede única (A) e de paredes múltiplas (B)..	19
Figura 2: Representação esquemática de uma camada de grafeno (a), e dos modelos de nanotubos que podem ser formados de acordo com a direção com que a folha se enrola: (b) <i>zigzag</i> , (c) <i>armchair</i> e (d) <i>quiral</i> . Adaptado da referência [19].....	20
Figura 3: Diagrama da coordenada da reação comparando as reações catalisadas e não catalisadas por enzimas. G = energia livre; R = caminho reacional; S = substrato; P = produto; $\Delta G^{\ddagger}_{S \rightarrow P}$ = energia de ativação para a reação $S \rightarrow P$; ΔG^{\ddagger}_c = energia de ativação para a reação $S \rightarrow P$ catalisada por enzima; $\Delta G^{\ddagger}_{P \rightarrow S}$ = energia de ativação para a reação $P \rightarrow S$ e ΔG° = variação total da energia livre padrão na direção $S \rightarrow P$. Disponível em http://aloeveraesaude.com/enzima/ . Acessado em 30 de setembro de 2010.....	28
Figura 4: Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. K_m = constante de Michaelis-Mente; $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima.....	30
Figura 5: Reação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina catalisada pela enzima AChE.....	37
Figura 6: Ilustração esquemática da fenda sináptica e suas reações associadas. Disponível em http://www.cnsforum.com/imagebank/item/rcpt_sys_ACH_esterase/default.aspx . Acessado em 30 de setembro de 2010.....	39
Figura 7: Ilustração das formas globulares catalíticas homoméricas (G) e heteroméricas (A) da enzima acetilcolinesterase. Adaptado de [48].....	40
Figura 8: Ilustração da conformação dimérica da AChE existente em mamíferos. Adaptado de [51].....	40
Figura 9: Ilustração esquemática do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase com a molécula de ACh ligada aos aminoácidos presentes por interações não covalentes fracas (pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo). SC: Sítio Catalítico. SA: Sítio Aniônico. Adaptado de [45].....	41
Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da ACh catalisada pela AChE. E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato e P = produto. Adaptado de [45].....	42
Figura 11: Ilustração esquemática dos elementos básicos de um biossensor enzimático.....	44
Figura 12: Ilustração da fórmula estrutural do carbaril.....	53
Figura 13: Ilustração da fórmula estrutural do metomil.....	54
Figura 14: Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) eletrodo de trabalho, (2) referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada e saída de N_2 respectivamente.....	61
Figura 15: Ilustração da reação entre a tiocolina e o DTNB, gerando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato, este responsável pela determinação espectrofotométrica experimental.....	63

Figura 16: Imagens de MEV dos nanotubos de carbono não funcionalizados (A) e com funcionalização em solução de $3\text{H}_2\text{SO}_4 : 1\text{HNO}_3$ (B). Aumento de 29.000X.....	69
Figura 17: Imagens de MEV do pó de grafite utilizado na confecção dos eletrodos de pasta de carbono. Aumento de 15.000X.....	70
Figura 18: Imagens de MEV da pasta de nanotubos de carbono funcionalizada (A) e da pasta de carbono (B). Aumento de 10.000X.....	71
Figura 19: Voltamogramas cíclicos para o EPNTC (—) e do EPC (—) em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	72
Figura 20: Gráfico de Michaelis-Menten obtido experimentalmente pelo método espectrofotométrico.....	74
Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em função do tempo reacional. $[\text{ASChI}] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{AChE}] = 13,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$	75
Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada do potencial de oxidação da tiocolina em função da concentração do substrato em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). (A) biossensor elaborado com NTC e (B) biossensor elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$	76
Figura 23: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) em diferentes potenciais aplicados (A). Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado no biossensor nanoestruturado (B).....	77
Figura 24: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) em diferentes potenciais aplicados (A). Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado no biossensor elaborado com PG (B).....	78
Figura 25: Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função da quantidade de enzima AChE imobilizada nos biossensores. Correntes obtidas por SWV em ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). (A) biossensor elaborado com NTC e (B) biossensor elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$	79
Figura 26: Efeito sobre a corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação do pH da solução do substrato ASChI $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). (A) biossensor (25 % AChE) elaborado com NTC e (B) biossensor (contendo 25 % AChE) elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$	80
Figura 27: Efeito sobre a corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação da temperatura da solução do substrato ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). (A) biossensor (contendo 25 % (m/m) de AChE) elaborado com NTC e (B) biossensor (contendo 25 % (m/m) de AChE) elaborado com PG. Estudo realizado por SWV. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$	81
Figura 28: Cronoamperogramas da oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no potencial de +300 mV e tempo de 200 segundos, em função da porcentagem (m/m) de glutaraldeído 0,1% contido na pasta.....	83

Figura 29: Voltamogramas cíclicos do EPNTC em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (—) e na solução contendo 5,0 mmol L ⁻¹ de ASChI (—). T = 37°C; v = 100 mV.....	84
Figura 30: Voltamogramas cíclicos do biossensor elaborado com NTC em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (—) e contendo 5,0 mmol L ⁻¹ de ASChI (—). (A) biossensor (25 % AChE) elaborado com NTC e (B) biossensor (contendo 25 % (m/m) de AChE) elaborado com NTC na presença de 10% de glutaraldeído 0,1% na pasta. T = 37°C; v = 100 mV.....	85
Figura 31: Efeito na corrente limite de difusão em função do tempo de estocagem do EPNTC-AChE (A) e do EPC-AChE (B) em um congelador. Medida realizada em solução 5,0 mmol L ⁻¹ de ASChI em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) à 37°C. Potencial de +300 mV e tempo de 210 segundos.....	88
Figura 32: Porcentagem de inibição da enzima em relação ao tempo de permanência dos biossensores EPC-AChE (A) e EPNTC-AChE (B) em solução 5,0 μmol L ⁻¹ de carbaril. Inserção: Cronoamperogramas do processo de inibição enzimática causado pelo pesticida carbaril, obtidos num potencial de +300 mV em 210 segundos.....	89
Figura 33: Porcentagem de inibição da enzima em relação ao tempo de permanência dos biossensores EPC-AChE (A) e EPNTC-AChE (B) em solução 5,0 μmol L ⁻¹ de metomil. Inserção: Cronoamperogramas do processo de inibição enzimática causado pelo pesticida metomil, obtidos num potencial de +300 mV em 210 segundos.....	90
Figura 34: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L ⁻¹ . T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L ⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L ⁻¹ de ASChI.....	91
Figura 35: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPC-AChE para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L ⁻¹ . T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L ⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L ⁻¹ de ASChI.....	92
Figura 36: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de metomil em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L ⁻¹ . T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o metomil em concentrações de 0,15 a 0,9 μmol L ⁻¹ de metomil em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L ⁻¹ de ASChI.....	93
Figura 37: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de metomil em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L ⁻¹ . T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o metomil em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L ⁻¹ de metomil em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L ⁻¹ de ASChI.....	94
Figura 38: (A) Curva analítica do EPNTC-AChE em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L ⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L ⁻¹ de ASChI. T = 37°C. (B) Efeito na diminuição da inclinação da reta (sensibilidade) quando a curva analítica do biossensor EPNTC-AChE foi elaborada em tampão fosfato (—) e em tampão fosfato preparado com amostra de água de rio (—).....	97

Figura 39: Efeito na inclinação da reta (sensibilidade) quando as curvas analíticas do biossensor EPNTC-AChE foram elaboradas em tampão fosfato (—), em tampão fosfato preparado com amostra de água de rio (—) e em tampão fosfato contendo uma concentração de 7,63 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido húmico extraído de turfa (—)..... **98**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constantes de Michaelis-Menten (K_m), catalítica (K_{cat}) e de especificidade (K_{cat}/K_m) de algumas enzimas.....	36
Tabela 2: Ingestão diária aceitável, IDA, grupo químico, classe e classificação toxicológica de alguns ingredientes ativos da classe dos carbamatos.....	52
Tabela 3: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	58
Tabela 4: Desvio Padrão Relativo (D.P.R) do EPNTC-AChE e do EPC-AChE na ausência e na presença de 10% (m/m) de glutaraldeído 0,1%.....	86
Tabela 5: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas dos biossensores para o carbaril.....	92
Tabela 6: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas dos biossensores para o metomil.....	94
Tabela 7: Valores da porcentagem de inibição (% <i>I</i>) das curvas analíticas dos biossensores confeccionados na determinação de carbaril e metomil.....	95
Tabela 8: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas do biossensor EPNTC-AChE na determinação de carbaril elaborado em amostra fluvial (A.F) e na presença de ácido húmicos (A.H).....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
A.F – Água Fluvial
A.H – Ácido Húmico
ANDEF – Associação Nacional de Defesa de Vegetal
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASChI – Iodeto de Acetilcolina
ASE – Extração Acelerada com Solvente (*Accelerated Solvent Extraction*)
BuChE – Butirilcolinesterase
CA - Cronoamperometria
CV – Voltametria Cíclica (*Cyclic Voltammetry*)
DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
E – Enzima
EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono
EPC-AChE – Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado com a Enzima Acetilcolinesterase
EPCM – Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado
EPNTC – Eletrodos de Pasta de Nanotubos de Carbono
EPNTC-AChE – Eletrodos de Pasta de Nanotubos de Carbono Modificado com a Enzima Acetilcolinesterase
EPNTCM – Eletrodo de Pasta de Nanotubos de Carbono Modificado
ES – Complexo Enzima-Substrato
GC – Carbono Vítreo (*Glassy Carbon*)
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
IA – Ingredientes Ativos
IDA – Ingestão Diária Aceitável
IS – Intervalo de Segurança
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
 K_{cat} – Constante Catalítica
LbL – Técnica de fabricação de filmes finos (Layer-by-Layer)
LD – Limite de Detecção
LLE – Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)
LMR – Limite Máximo de Resíduo
LQ – Limite de Quantificação
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
NTC – Nanotubos de Carbono
NTCPM – Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
NTCPS – Nanotubos de Carbono de Paredes Simples
P – Produto

PAMAN-Au – Polímero Poliamidoamina Modificado com Nanopartículas de Ouro

PG – Pó de Grafite

PTFE – Politetrafluoretileno

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

SFE – Extração com Fluido Supercrítico (*Supercritic Fluid Extraction*)

SOX – Extração *Soxhlet*

SPE – Extração em Fase Sólida(*Solid Phase Extraction*)

SPME – Micro-Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Micro-Extraction*)

SWV – Voltametria de Onda Quadrada (*Square Wave Voltammetry*)

TNB²⁻ – Ânion 5-tio-2-nitrobenzoato

V_{máx} – Velocidade Máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Eletrodos de Pasta Carbono.....	17
1.2 Nanotubos de Carbono.....	18
<i>1.2.1 Purificação e Funcionalização dos Nanotubos de Carbono.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2.2 Eletrodos de Pasta de Nanotubos de Carbono vs. Eletrodos de Pasta de Carbono.....</i>	<i>24</i>
1.3 Enzimas.....	26
<i>1.3.1 Reações Enzimáticas.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2 Cinética Enzimática.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.3 Acetilcolinesterase.....</i>	<i>36</i>
1.4 Biossensores.....	43
<i>1.4.1 Imobilização Enzimática em Biossensores.....</i>	<i>48</i>
1.5 Agrotóxicos.....	50
<i>1.5.1 Carbamatos.....</i>	<i>51</i>
<i>1.5.1.1 Carbaril.....</i>	<i>52</i>
<i>1.5.1.2 Metomil.....</i>	<i>53</i>
1.6 Técnicas de Detecção de Agrotóxicos e seus Resíduos.....	54
2. OBJETIVOS.....	57
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	58
3.1 Reagentes.....	58
3.2 Soluções.....	59
3.3 Instrumentação utilizada.....	60
3.4 Funcionalização dos NTC.....	62
3.5 Determinação dos Parâmetros Cinéticos da AChE.....	63

3.6 Otimização dos Parâmetros Eletródicos.....	64
3.7 Determinação dos Pesticidas Carbaril e Metomil.....	66
3.7.1 <i>Determinação do Tempo de Incubação.....</i>	66
3.7.2 <i>Reativação do Eletrodo.....</i>	66
3.7.3 <i>Construção da Curva Analítica.....</i>	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	69
4.2 Caracterização por Voltametria Cíclica.....	71
4.3 Parâmetros Cinéticos da Enzima AChE.....	73
4.4 Potencial de Trabalho dos Biossensores.....	75
4.5 Quantidade de Enzima nos Biossensores.....	79
4.6 Efeito do pH.....	80
4.7 Efeito da Temperatura.....	81
4.8 Efeito do Glutaraldeído na Imobilização Enzimática.....	82
4.9 Repetibilidade e Reprodutibilidade dos Biossensores.....	86
4.10 Tempo de Vida dos Biossensores.....	87
4.11 Determinações de Pesticidas da Classe dos Carbamatos.....	89
4.11.1 <i>Tempo de Incubação.....</i>	89
4.11.2 <i>Curvas Analíticas.....</i>	90
4.11.2.1 <i>Determinação do Pesticida Carbaril.....</i>	90
4.11.2.2 <i>Determinação do Pesticida Metomil.....</i>	93
4.11.2.3 <i>Determinação do Pesticida Carbaril em Matriz Fluvial.....</i>	96
5. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 Eletrodos de Pasta de Carbono

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) consistem basicamente de uma mistura de pó de grafite (PG), aglutinante, e no caso de um eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM), um modificador específico incorporado à pasta. Para a preparação da pasta de carbono, o pó de grafite deve apresentar alta pureza, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e possuir uma distribuição granulométrica uniforme. O aglutinante (responsável pela consistência na pasta) deve ser quimicamente inerte, eletroinativo, imiscível com a água e não conter impurezas. Ulakhovich e colaboradores [1] relataram os tipos de EPC, os métodos de fabricação dos EPCM e seu uso como sensores eletroquímicos em diversas aplicações.

Em 1958, o primeiro EPC foi elaborado por Adams [2]. O intuito deste trabalho visava um sistema que viesse substituir o eletrodo gotejante de mercúrio, com a vantagem de poder utilizá-lo em experimentos eletroanalíticos que exigissem varreduras de potenciais em regiões anódicas, nas quais o mercúrio metálico sofre oxidação. O primeiro EPCM foi desenvolvido em 1964 por Kuwana e French [3]. Neste trabalho, foi investigado o comportamento eletroquímico de alguns compostos orgânicos (ferroceno, antraquinona, 5-aminobenzofenona) utilizando o próprio composto como aglutinante na preparação da pasta. Por via desse relato, comprovou-se então que a modificação da pasta de carbono com tais espécies conferia ao eletrodo as características eletroquímicas do material utilizado como modificador. Foi observado também que as correntes de pico dos voltamogramas aumentavam proporcionalmente com o aumento da concentração do modificador na pasta. Estas observações levaram ao desenvolvimento de diversos estudos eletroquímicos utilizando estes sensores, iniciando uma intensa atividade de pesquisa neste campo da ciência [4].

Atualmente, a amplitude de aplicação de sensores baseados em pasta de carbono permeia em diversas finalidades. Como exemplos de aplicações, pode-se mencionar a avaliação da capacidade antioxidante em bebidas [5], a determinação de herbicidas em águas e amostras vegetais [6], do pesticida hidrazina [7], de íons Cd^{2+} e Pb^{2+} [8,9], determinação eletroquímica de ácido oxálico [10], de analitos de interesse farmacêutico [11], de íons sódio em amostras clínicas [12], e aplicação de EPCM com materiais biológicos, por exemplo a enzima acetilcolinesterase (AChE) [13], estes chamados de biossensores (ver seção 1.4).

As principais vantagens da pasta de carbono são a rapidez e a simplicidade do processo de preparação, aliada à possibilidade de renovação da superfície do eletrodo a cada nova medida. Isso é possível devido à modificação interna do material eletrodico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície do transdutor. Outra importante propriedade é a sua baixa corrente residual, que é menor que nos eletrodos de grafite pirolítico e de carbono vítreo [11]. No entanto, a baixa reprodutibilidade e a falta de estabilidade estrutural, especialmente quando ele é empregado por um longo período de tempo ou na presença de solventes orgânicos em solução, são pontos que desfavorecem estes eletrodos em aplicações analíticas.

1.2 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) são sistemas modelo para a nanociência e a nanotecnologia. Essas estruturas de carbono são bastante versáteis para se integrarem a diferentes áreas do conhecimento e são capazes de promover uma inter/multidisciplinaridade muito forte. Hoje, as pesquisas em nanotubos de carbono cruzam as fronteiras da física, da

química, das ciências dos materiais, da biologia e desenvolvem-se rapidamente no campo da farmacologia [14].

As propriedades dos NTC são determinadas pelo tamanho e pela morfologia, originando uma fascinante sintonia em suas propriedades físico-químicas. Talvez os exemplos mais claros e ilustrativos desses fenômenos possam ser tomados da ciência do carbono após a descoberta dos fulerenos, em 1985 por Kroto e colaboradores [15] e, obviamente, dos NTC em 1991 por Iijima [16]. Os nanotubos de carbono têm despertado um grande interesse em diferentes aplicações, devido às suas características peculiares como propriedades eletrônicas, óticas, mecânicas e químicas [17]. Deste modo, esses materiais têm sido usados na confecção de diferentes tipos de dispositivos, como emissores de elétrons para mostradores, sensores de gases e sensores biológicos, pontas para microscópio de força atômica (AFM) e, quando combinados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas [14].

Os NTC são alótropos do carbono que consiste em camadas de grafite (grafeno) enroladas em formatos cilíndricos. Os NTC incluem estruturas com paredes simples (A) e com paredes múltiplas (B) conforme apresentado na Figura 1:

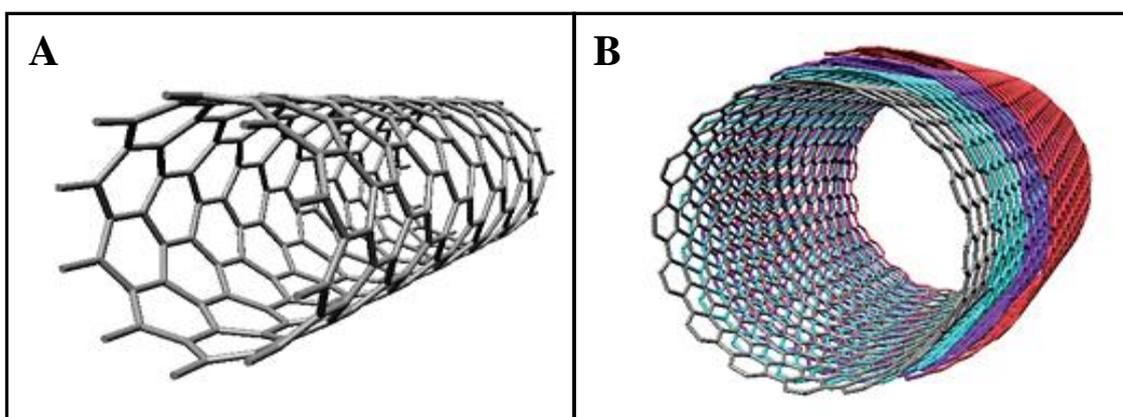


Figura 1: Ilustração do nanotubo de carbono de parede única (A) e de paredes múltiplas (B).

Os nanotubos de carbono de paredes simples (NTCPS) constituem folhas cilíndricas de grafeno com diâmetro nanoescalar, usualmente menores do que 2 nm. Os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) compreendem diversos cilindros concêntricos de folhas de grafeno, com um espaçamento entre as camadas de 0,3 a 0,4 nm. O diâmetro destes materiais varia entre 2 e 100 nm, dependendo do número de folhas presentes [17].

A utilização dos NTC como material para o desenvolvimento de sensores na área de eletroanálise é devido a duas de suas principais propriedades: a alta área superficial, o que permite uma amplificação no sinal analítico e a segunda propriedade pronunciada é a eletrocatalise. A propriedade eletrocatalítica vem do fato dos NTC possuírem um mecanismo de transporte de elétrons que pode variar desde o tipo semicondutor até o tipo metálico, dependendo do seu diâmetro e ângulo *chiral*, também chamado ângulo de helicidade (ϕ). Esses dois parâmetros resultam dos chamados índices de Hamada (n,m) [18].

Um NTC é produzido a partir de uma folha de grafeno enrolada de tal forma que coincidam dois sítios cristalograficamente equivalentes de sua rede hexagonal. O vetor C chamado *chiral*, que define a posição relativa dos dois sítios é definido mediante dois números inteiros (n,m) e pelos vetores unitários da rede hexagonal a_1 e a_2 ($C = na_1 + ma_2$) como mostrado na Figura 2.

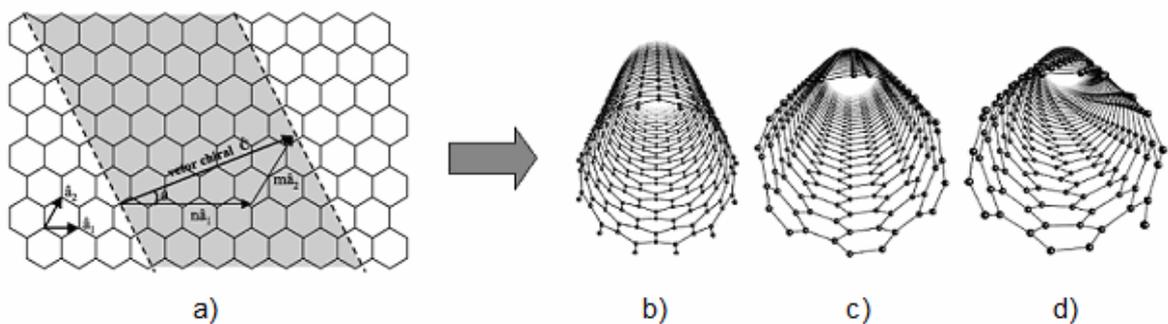


Figura 2: Representação esquemática de uma camada de grafeno (a), e dos modelos de nanotubos que podem ser formados de acordo com a direção com que a folha se enrola: (b) *zigzag*, (c) *armchair* e (d) *quiral*. Adaptado da referência [19].

O avanço das pesquisas em nanotubos de carbono foi claramente impulsionado pelo desenvolvimento dos processos de síntese [20]. Estudos de microscopia [21] e de espectroscopia [22] permitiram comprovar as principais propriedades físicas dos nanotubos, previstas no início da década de 90 [23]. Atualmente, diversos métodos de preparação de nanotubos de carbono foram desenvolvidos e podem ser produzidos nanotubos isolados sobre substratos, suspensos em pilares e dispostos em arquiteturas complexas [14].

Os NTCPS e os NTCPM podem ser sintetizados por diferentes métodos, sendo que cada método apresenta vantagens e desvantagens. As três técnicas mais utilizadas são [24]: descarga por arco (DA), ablação por laser (AL) e deposição química de vapor (DQV). Todos estes métodos apresentam o mesmo problema, a produção de carbono amorfo e a presença inevitável de partículas metálicas oriundas dos catalisadores, sendo necessários processos de purificação dos NTC produzidos.

1.2.1 Purificação e Funcionalização dos Nanotubos de Carbono

A qualidade e a pureza dos nanotubos de carbono dependem fortemente da técnica utilizada para sintetizá-los. Em geral, depois de sintetizados, as amostras apresentam quantidades variáveis de impurezas (carbono amorfo, grafite e metais catalisadores) que variam de 10 a 70% [23].

Os processos oxidativos utilizados na purificação dos NTC incluem modificações em sua morfologia, diminuição do tamanho, abertura das extremidades ou pontas, aumento dos defeitos na estrutura, aparecimento de grupamentos químicos na superfície (carboxilatos, hidroxilas, amidas, etc.), aumento da área superficial e melhoria da dispersão em soluções aquosas e solventes orgânicos.

A purificação, também usualmente chamada de funcionalização, dos NTC através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento tem sido vista como uma forma de explorar o potencial dos materiais no campo da nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas que são substancialmente diferentes dos nanotubos não funcionalizados e este fenômeno é explorado para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletro-mecânicos. NTC quimicamente modificados podem ser usados de forma a facilitar sua interação com moléculas orgânicas e biológicas [25], fármacos [26] e, até mesmo, com vírus e bactérias [27], tornando-os sensores capazes de detectar pequenos traços da espécie alvo e com alta seletividade.

A funcionalização dos NTC ocorre por meio de interações não-covalentes (sistemas que interagem fracamente com os nanotubos) e covalentes (sistemas que interagem fortemente com os nanotubos de carbono, gerando modificações drásticas nas suas propriedades), como descrito a seguir.

A química da funcionalização não-covalente dos NTC envolve alguns tipos de interações ou forças fracas nestes sistemas, como ligações de hidrogênio, interações π - π , forças eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e hidrofílicas [28]. Uma das principais vantagens da funcionalização não-covalente é que as propriedades eletrônicas dos nanotubos são mantidas, pois a estrutura sp^2 e a configuração dos átomos de carbono do tubo são conservadas. A funcionalização não-covalente dos NTC pode ser realizada através do uso de surfactantes, polímeros, proteínas, carboidratos entre outros.

Uma das propriedades dos NTC é possuírem superfícies com alta estabilidade química, o que dificulta a introdução covalente de grupos funcionais em sua superfície. Assim, a ligação covalente de grupos funcionais ocorre apenas em regiões de instabilidade na superfície dos NTC e são necessários métodos altamente reativos. Estas regiões instáveis

eletronicamente são os sítios de defeitos, também conhecidos como defeitos Stone-Wales, vacâncias e as pontas e extremidades curvadas (cotovelos) [29].

Existe uma grande diversidade de rotas químicas para funcionalização covalente de NTC. Entre elas, o processo oxidativo realizado por ácidos fortes é tido como padrão neste tipo de proposta [14], pois aumentam as regiões de instabilidade na estrutura dos NTC. Os ácidos comumente utilizados nestes processos são: HNO_3 , $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$, HClO_4 , $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{KMnO}_4$ e H_2O_2 . Os tratamentos em meio ácido geram a abertura das pontas e defeitos na estrutura dos nanotubos, com a inserção covalente de grupos funcionais carboxilas (COOH) na superfície, aumentando a reatividade dos NTC. Outro fator aliado a este tipo de funcionalização é a redução do tamanho dos nanotubos. Os NTC tratados em meio ácido podem interagir com reagentes acopladores (crosslinking), sendo esta uma das mais utilizadas para a imobilização covalente de NTC com polímeros, DNA, peptídeos e enzimas.

Outra forma de funcionalização covalente é através da dopagem substitucional de átomos. Os exemplos mais típicos desse tipo de funcionalização são os nanotubos de carbono dopados com nitrogênio [30], boro [31], ou ambos [32]. Esses sistemas dopados são muito interessantes, pois também aumentam significativamente a reatividade dos nanotubos. Banerjee e colaboradores [33] resumiram as principais rotas químicas utilizadas na funcionalização de nanotubos. Essas rotas químicas têm sido utilizadas com sucesso para modificar a superfície dos NTC e obter sistemas auto-organizados.

Alguns estudos relataram o funcionamento do transporte eletrônico nos NTC. Masheter e colaboradores [34] demonstraram, em 2007, que o transporte eletrônico nos nanotubos de carbono pode ocorrer de forma balística no plano basal. Entretanto, o aumento da velocidade no transporte eletrônico é devido à presença de grupos funcionais dispostos nos NTC. Esses grupos estão localizados principalmente nos planos de borda, que surgem nos

nanotubos via tratamento em meio oxidante, por exemplo, em meio ácido. Esses planos de borda encontram-se, principalmente, em defeitos presentes no corpo do tubo além das extremidades, chamada de “boca do tubo”. Dessa forma, tanto a condução balística, quanto a presença de planos de borda fornecem a esses materiais a capacidade de mediar a transferência de elétrons em reações com espécies em solução.

Assim, os NTC atendem as principais características de um material no desenvolvimento de sensores eletroquímicos: alta velocidade na transferência de elétrons, alta área superficial e a presença de grupos funcionais que fazem com que os sensores baseados em NTC sejam atrativos para serem modificados com diversos tipos de espécies. A literatura possui vários exemplos de diferentes tipos de sensores de NTC modificados com as mais variadas substâncias [35, 36].

1.2.2 Eletrodos de Pasta de Nanotubos de Carbono vs. Eletrodos de Pasta de Carbono

De maneira análoga aos EPC, os eletrodos de pasta de nanotubos de carbono (EPNTC) são elaborados a partir de uma mistura de pó de nanotubos, aglutinante, e no caso de um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado (EPNTCM), um modificador específico incorporado à pasta. No entanto, devido às características inerentes aos NTC, como a elevada condutividade elétrica, área superficial e poder catalítico, os EPNTC passam a ter atributos eletródicos que os tornam excelentes sensores em aplicações eletroanalíticas. Alguns relatos comparativos destes eletrodos são descritos a seguir.

Rubianes e Rivas [37] descreveram o desempenho do EPNTC comparado com os EPC convencionais para o ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina. Quando comparado com o EPC, o EPNTC apresentou uma excelente eletrocatalise, tendo uma redução no potencial de

oxidação de 230 e 160 mV para o ácido ascórbico e o ácido úrico, respectivamente. Além disso, a reversibilidade no comportamento eletroquímico destas substâncias foi melhorada com a utilização do EPNTC, pelo fato da elevada transferência eletrônica destes materiais.

Valentini e colaboradores [38] analisaram alguns parâmetros eletroquímicos (corrente e potencial de pico, densidade de carga e área eletroativa) de diversas moléculas eletroativas utilizando EPC e EPNTC elaborados com óleo mineral aglutinante numa proporção de 60% (m/m) e 40% (m/m). Os autores avaliaram também o comportamento do EPNTC frente a espécies como a dopamina, catecol, serotonina antes e depois do tratamento em HNO_3 2,20 mol L^{-1} , relatando uma melhora significativa no sinal analítico do sensor utilizando os nanotubos tratados em meio ácido. A área eletroativa do EPNTC e EPC foi encontrada pela equação de Cottrel ($I \times t^{-1/2}$), fornecendo os valores de 0,040 e 0,030 cm^2 , ligeiramente diferente da área geométrica do eletrodo (0,031 cm^2).

He e colaboradores [39] avaliaram a adsorção e oxidação da quercetina em EPC e EPNTC pelas técnicas de cronoamperometria e voltametria de redissolução anódica. Comparado com o EPC, o EPNTC apresentou um alto poder adsorptivo e um considerável melhoramento do sinal analítico para a quercetina. A determinação da quercetina adsorvida pelos NTC (em virtude do efeito da pré-concentração) mostrou uma reação de oxidação quase-reversível envolvendo dois elétrons e dois prótons. O EPNTC apresentou uma faixa linear para este flavonóide de 0,1 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Chicharo e colaboradores [40] utilizaram EPNTC elaborado com NTC de diferentes diâmetros (curtos, de 1-5 μm e longos, de 5-20 μm) para demonstrar a viável utilização deste eletrodo em análises por injeção em fluxo e eletroforese capilar. Comparado com o EPC clássico, o limite de detecção do EPNTC foi duas vezes menor para a dopamina, norepinefrina e epinefrina e cinco vezes menor para o ácido ascórbico e o dopac. O EPNTC elaborado com nanotubos de diâmetro curto apresentou melhor reversibilidade e corrente de

pico anódica do que o EPNTC feito com NTC longos, frente à determinação dos analitos em questão.

Em todos os casos apresentados anteriormente, fica evidente o melhor desempenho e eficiência dos EPNTC em relação ao EPC. Esta notável diferença do EPNTC em parâmetros como reversibilidade e sinal analítico está relacionada com todas suas singulares propriedades físicas e químicas já relatadas.

1.3 Enzimas

Enzimas são proteínas conhecidas por seu extraordinário poder catalítico. Elas possuem um alto grau de especificidade em relação aos seus substratos, aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições moderadas de temperatura e pH. Atuando em sequências organizadas, elas catalisam as centenas de reações que degradam passo a passo as moléculas dos nutrientes, conservam e transformam a energia química.

A atividade catalítica de uma enzima depende da integridade de sua conformação nativa de proteína. Se a enzima for desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é usualmente perdida. Se uma enzima é degradada em seus componentes aminoácidos, sua atividade catalítica é sempre perdida. Desta forma, as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias protéicas das enzimas são essenciais para sua atividade catalítica [41].

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que elas catalisam. Por exemplo, a enzima acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina; a urease, a hidrólise da uréia. Pode observar que muitas enzimas foram nomeadas de acordo com seu substrato, adicionando o sufixo “ase” ao final deste. A característica que distingue uma reação catalisada

por uma enzima é que ela ocorre num bolsão confinado da estrutura protéica, chamado de sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo das enzimas é chamada de substrato. O sítio ativo contém resíduos de aminoácidos com grupos funcionais que se ligam ao substrato e catalisam sua transformação química. O complexo enzima-substrato é uma etapa fundamental para a ação das enzimas, pois este complexo é o ponto inicial no tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos associados [41,42], como veremos na próxima seção.

1.3.1 Reações Enzimáticas

Uma reação enzimática simples pode ser descrita como:



onde E, S e P representa respectivamente a enzima, substrato e o produto. ES é o complexo de transição da enzima com o substrato.

As enzimas, sendo catalisadores biológicos, aumentam a velocidade da reação não afetando no equilíbrio desta. A energia nos sistemas biológicos é definida em termos de variação da energia livre de Gibbs, ΔG . Estas reações podem ser descritas por um diagrama de coordenada da reação, onde a energia livre varia durante uma reação. O diagrama da Figura 3 compara os níveis energéticos necessários à formação dos estados de transição das reações catalisadas (linha azul) e não catalisadas (linha vermelha) por enzimas.

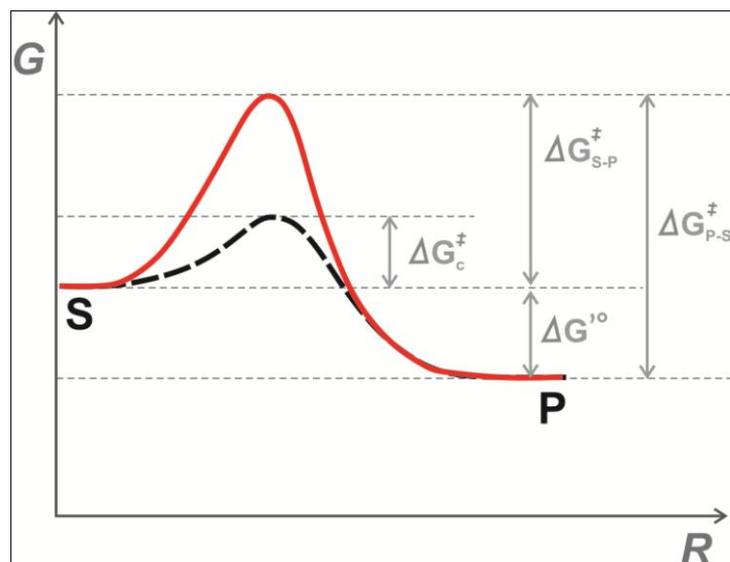


Figura 3: Diagrama da coordenada da reação comparando as reações catalisadas e não catalisadas por enzimas. G = energia livre; R = caminho reacional; S = substrato; P = produto; $\Delta G^{\ddagger}_{S-P}$ = energia de ativação para a reação $S \rightarrow P$; ΔG^{\ddagger}_c = energia de ativação para a reação $S \rightarrow P$ catalisada por enzima; $\Delta G^{\ddagger}_{P-S}$ = energia de ativação para a reação $P \rightarrow S$ e $\Delta G'^o$ = variação total da energia livre padrão na direção $S \rightarrow P$. Disponível em <http://aloeveraesaude.com/enzima/>. Acessado em 30 de setembro de 2010.

Nas reações químicas, existe uma barreira energética entre S e P que está relacionada com o alinhamento dos grupos funcionais reacionais, formação de cargas transitórias instáveis, rearranjos de ligações e outras transformações requeridas para a reação prosseguir em qualquer direção. O estado de transição (topo das “montanhas energéticas” da Figura 3) é um momento do deslocamento molecular em que certos eventos, como a formação ou quebra de ligação, ou formação de cargas, prosseguem até um ponto preciso no qual o decaimento quer para o substrato quer para o produto é igualmente provável. A diferença entre os níveis de energia do estado basal e o estado de transição é a energia de ativação ΔG^{\ddagger} . Como ilustrado na Figura anterior, a presença de uma enzima aumenta a velocidade da reação diminuindo a energia de ativação do sistema. Isso está ligado ao fato de que os catalisadores fornecem um novo caminho reacional, mais factível, onde mais reações catalíticas possam ocorrer num menor intervalo de tempo [41].

1.3.2 Cinética Enzimática

A abordagem central para estudar o mecanismo de uma reação catalisada por uma enzima é determinar a velocidade da reação e a forma que ela se altera em resposta a modificações nos parâmetros experimentais. Um fator chave que afeta a velocidade de uma reação catalisada por enzima é a concentração de substrato, [S]. Uma abordagem muito utilizada nos experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial, V_o , quando [S] é muito maior que a concentração da enzima, [E]. Dessa forma, a V_o pode ser explorada como uma função da [S], e o efeito sobre a V_o ao variar a [S] quando a concentração da enzima é mantida constante é mostrada na Figura 4:

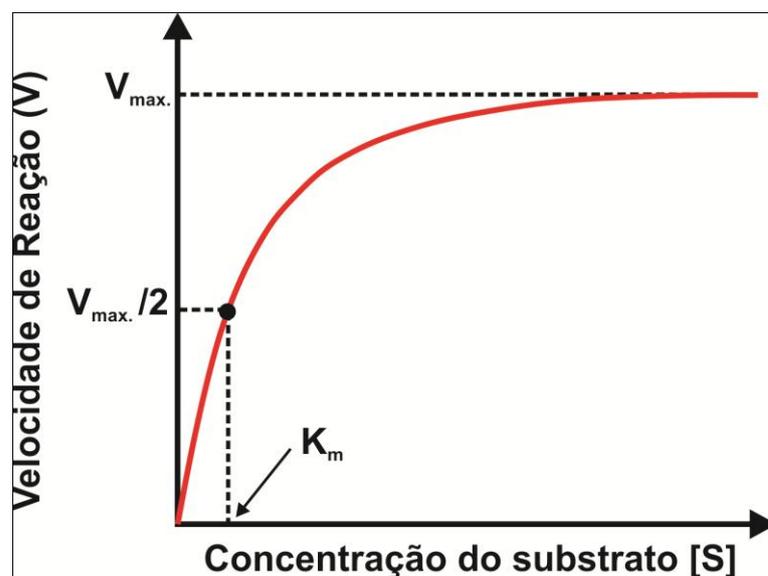
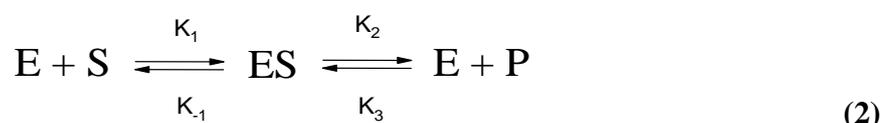


Figura 4: Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. K_m = constante de Michaelis-Mente; $V_{máx}$ = velocidade máxima.

Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_o aumenta quase linearmente com o aumento da [S]. Em concentrações de substrato mais altas, V_o aumenta de quantidades cada vez menores em resposta ao aumento de [S]. Finalmente, um ponto é alcançado, onde

aumentos em V_o tendem a ser pequenos à medida que a $[S]$ aumenta. Essa região de V_o está próxima da chamada velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$.

A teoria geral da cinética e ação enzimática foi desenvolvida por L. Michaelis e M.L. Menten em 1913, sendo mais tarde ampliada por G.E. Briggs e J.B.S. Haldane. Essa teoria considera que a enzima E combina reversivelmente com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES, e este se rompe para formar a enzima livre e o produto P:



Pelo fato desta segunda reação mais lenta limitar a velocidade da reação global, a velocidade global deve ser proporcional à concentração das espécies que reagem na segunda etapa, ou seja, ES.

As enzimas, em suas reações de catálise, existem em duas formas: livre ou não combinada (E) e combinada (ES). Em baixa $[S]$, a maior parte da enzima está na sua forma livre. Neste ponto, a velocidade inicial é proporcional à $[S]$ porque o equilíbrio da equação 2 está no sentido de formação de mais ES à medida que $[S]$ aumenta. A velocidade máxima da reação catalisada é observada quando toda enzima estiver presente como complexo ES e $[E]$ for pequena. Nessas condições, diz-se que a enzima está “saturada” com seu substrato, de forma que aumentos adicionais na $[S]$ não têm efeito na velocidade. Este efeito de saturação é uma característica distinguidora da catálise enzimática e é responsável pelo platô observado na Figura 2. Depois que o complexo ES se dissocia para produzir o produto P, a enzima está livre para catalisar outra molécula de substrato.

Inicialmente na reação, a concentração do produto [P] é insignificante, assim considera-se que a reação reversa, $P \rightarrow ES$ (descrita por K_3), pode ser ignorada. Dessa forma, a reação global reduz-se a:



A V_o é determinada pela dissociação do complexo ES para formar o produto, sendo determinada pela [ES]:

$$V_o = K_2 [ES] \quad (4)$$

Pelo fato de que [ES] não ser facilmente detectado experimentalmente, a expressão [E_t] foi introduzida, representando a concentração de enzima total (a soma da enzima livre E com a ligada ao substrato, ES). De maneira análoga, a concentração de enzima livre [E] pode ser descrita como [E_t] - [ES]. As velocidades de formação e dissociação do ES são determinadas pelas etapas regidas pelas constantes de velocidade K_1 (formação) e $K_{-1} + K_2$ (dissociação), de acordo com as expressões:

$$\text{Velocidade de formação de ES} = K_1 ([E_t] - [ES]) [S] \quad (5)$$

$$\text{Velocidade de quebra de ES} = K_{-1} [ES] + K_2 [ES] \quad (6)$$

A equação de Michaelis-Menten expressa a relação entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, onde milissegundos após a enzima e o substrato serem misturados, a [ES] é obtida e permanece constante, ou seja, a velocidade de formação

de ES se iguala à sua velocidade de decomposição. Essa condição é chamada suposição do estado estacionário. Considerando esta suposição, pode-se estabelecer que:

$$K_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (7)$$

Assim,

$$K_1 [E_t] [S] - K_1 [ES] [S] = (K_{-1} + K_2) [ES] \quad (8)$$

Adicionando o termo $K_1 [ES] [S]$ a ambos os lados da equação, têm-se:

$$K_1 [E_t] [S] = (K_1[S] + K_{-1} + K_2) [ES] \quad (9)$$

Resolvendo-se a equação para [ES]:

$$[ES] = K_1 [E_t] [S] / K_1 [S] + K_{-1} + K_2 \quad (10)$$

Simplificando, temos:

$$[ES] = [E_t] [S] / [S] + (K_2 + K_{-1}) / K_1 \quad (11)$$

O termo $(K_2 + K_{-1}) / K_1$ é definido como a constante de Michaelis-Menten (K_m) que, substituído na Equação 11, simplifica-a para:

$$[ES] = [E_t] [S] / K_m + [S] \quad (12)$$

Expressando V_o em termos de $[ES]$, podemos substituir a Equação 12 na Equação 4, obtendo:

$$V_o = K_2 [E_t] [S] / K_m + [S] \quad (13)$$

Pelo fato da velocidade máxima ocorrer quando a enzima estiver saturada ($[ES] = [E_t]$), a $V_{m\acute{a}x}$ pode ser definida como $K_2 [E_t]$, assim temos:

$$V_o = V_{m\acute{a}x} [S] / K_m + [S] \quad (14)$$

Esta é a conhecida equação de Michaelis-Menten. Ela é uma afirmação quantitativa da relação entre a velocidade inicial V_o , a velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ e a concentração de substrato inicial $[S]$, todas interligadas por meio da constante K_m . Uma relação importante que emerge da constante de Michaelis-Menten é quando V_o é exatamente metade da $V_{m\acute{a}x}$, também ilustrado na Figura 1. Desse modo, pode-se expressar:

$$V_{m\acute{a}x} / 2 = V_{m\acute{a}x} [S] / K_m + [S] \quad (15)$$

Dividindo a equação 15 por $V_{m\acute{a}x}$, obtêm-se:

$$1 / 2 = [S] / K_m + [S] \quad (16)$$

Resolvendo para K_m , obtemos $K_m + [S] = 2 [S]$, ou

$$K_m = [S] \text{ quando } V_o = 1 / 2 V_{m\acute{a}x} \quad (17)$$

Na definição $K_m = [S]$, percebe-se que a constante de Michaelis-Menten pode ser expressa em unidades de concentração (mol L^{-1}). Uma enzima que age num substrato presente em uma concentração muito baixa na célula geralmente possui um K_m menor do que outra enzima que age num substrato que seja mais abundante no ambiente celular. Dessa forma, K_m é geralmente associado como a medida de afinidade de uma enzima pelo seu respectivo substrato [41].

A equação de Michaelis-Menten também pode ser transformada no diagrama de duplo recíproco, convertendo-se na equação de Lineweaver-Burk [41], muito utilizada na distinção de certos tipos de mecanismos de inibição enzimática.

Dependendo do número de etapas envolvidas nas diversas reações enzimáticas, o termo $V_{m\acute{a}x}$ pode variar grandemente de uma enzima para outra. Assim, tornou-se necessário definir uma constante de velocidade mais geral para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por enzima na saturação. Essa constante foi chamada de constante catalítica, K_{cat} . Em reações enzimáticas governadas pela equação de Michaelis-Menten, $K_{cat} = V_{m\acute{a}x} / [E_t]$, e a equação 14 torna-se:

$$V_o = K_{cat} [E_t] [S] / K_m + [S] \quad (18)$$

A constante K_{cat} é uma constante de primeira ordem e, portanto, possui unidade s^{-1} . Ela é também chamada de número de renovação, sendo equivalente ao número de moléculas de substrato que se convertem em produto num certo intervalo de tempo em uma única molécula de enzima quando ela estiver saturada com o substrato. Cada enzima possui valores de K_m e K_{cat} que refletem o seu ambiente celular, como a concentração de substrato

normalmente encontrada *in vivo* na enzima e sua respectiva reação química. Sendo assim, os parâmetros K_m e K_{cat} possibilitam a análise da eficiência comparativa de diferentes enzimas, usando para isso a relação K_{cat} / K_m denominada constante de especificidade, que é a constante da velocidade para a conversão de E + S até E + P. Quando $K_m \gg [S]$ (dependência linear da V_o em função da [S]), a equação 18 torna-se:

$$V_o = K_{cat} / K_m [E_t] [S] \quad (19)$$

Neste caso, a V_o depende da concentração de dois reagentes, [E] e [S]; portanto a equação da velocidade é de segunda ordem, tendo unidades de $\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$. Existe um limite para cada constante específica imposto pela velocidade pela qual E e S podem juntamente se difundir em solução aquosa. Esse limite de difusão controlado é de 10^8 até $10^9 \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$, e as enzimas que possuem um K_{cat} / K_m próximo deste intervalo são consideradas como as que alcançaram a perfeição catalítica, sendo a acetilcolinesterase um exemplo destas enzimas [41]. A Tabela 1 mostra o K_m , K_{cat} e (K_{cat}/K_m) de várias enzimas.

Tabela 1: Constantes de Michaelis-Menten (K_m), catalítica (K_{cat}) e de especificidade (K_{cat}/K_m) de algumas enzimas.

Enzima	Substrato	K_{cat} (s^{-1})	K_m ($mol\ L^{-1}$)	K_{cat}/K_m ($mol^{-1}\ s^{-1}\ L$)
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	$9,5 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Catalase	H_2O_2	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^0$	$4,0 \times 10^7$
Crotonase	Crotonil CoA	$5,7 \times 10^3$	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarato	$8,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^8$
	Malato	$9,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
B-Lactamase	Benzilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^8$
Anidrase Carbônica	CO_2	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	$4,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$

Fonte: Adaptado da referência [41].

1.3.3 Acetilcolinesterase

Colinesterases são uma classe de enzimas amplamente distribuídas em tecidos neuronais e não-neuronais, que podem ser subdivididas em acetilcolinesterase (AChE) ou butirilcolinesterase (BuChE), ambas responsáveis pela hidrólise dos ésteres da colina. Conhecida principalmente por sua propriedade catalítica na regulação da estimulação colinérgica, a AChE também desempenha ações relacionadas à adesão celular e desenvolvimento neuronal [43]. Esta enzima está presente principalmente nas terminações nervosas (neurônios colinérgicos) do sistema nervoso central e periférico, nas hemácias e músculos estriados.

O mecanismo de ação da AChE no sistema nervoso central e periférico está relacionado com a propagação dos impulsos nervosos nas sinapses neuromusculares [44] sendo que esta enzima catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, reação ilustrada na Figura 5:

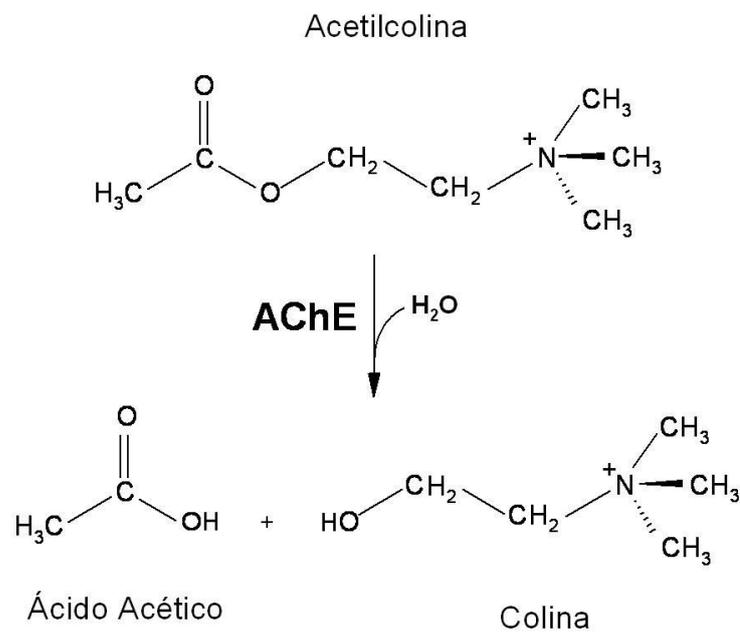


Figura 5: Reação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina catalisada pela enzima AChE.

A enzima AChE possui uma atividade catalítica extremamente eficiente, possuindo uma constante catalítica (K_{cat}) de $1,4 \times 10^4$, ou seja, esta enzima é capaz de hidrolisar 14 mil moléculas de ACh por segundo. A inibição da atividade desta enzima no organismo resulta no acúmulo do neurotransmissor ACh nas sinapses do sistema nervoso central, nas junções neuromusculares, nas terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas, como as glândulas sudoríparas. Isso pode causar a chamada “tempestade parassimpática”, termo associado a uma série de efeitos nocivos como a bradicardia, secreção excessiva, broncoconstrição, etc. Neste

caso, uma alta disponibilidade de acetilcolina é oferecida sem controle a seus receptores, produzindo uma sobre-estimulação do músculo e, como consequência os efeitos associados. O conhecimento da estrutura tridimensional da AChE é essencial para entender sua notável eficácia catalítica, a fabricação de drogas inteligentes (drug delivery's) e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas em casos de intoxicação por organofosforados [45]. Inibidores da enzima acetilcolinesterase tem propiciado a primeira geração de drogas para o tratamento da doença de Alzheimer [46].

O neurotransmissor ACh é o principal neurotransmissor das sinapses e junções colinérgicas do sistema nervoso central e periférico. Ele é sintetizado no citosol do neurônio a partir da acetil coenzima-A (acetil-CoA) e da colina. A acetil-CoA tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela enzima colina acetiltransferase. Depois de sintetizada, a acetilcolina é armazenada nas vesículas sinápticas. No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo acetilcolina ficam armazenadas até que haja um estímulo que as libere. O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao local onde se situam as vesículas sinápticas ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, o que favorece a entrada do íon cálcio no axônio. Assim, a liberação da acetilcolina varia diretamente com a concentração de cálcio [47]. A acetilcolina liberada se difunde no espaço extracelular, sendo degradada a colina e ácido acético pela acetilcolinesterase. Nesta hidrólise, cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axonal que pode ser reutilizada para a biossíntese de acetilcolina [48] ou ainda combinar-se com as moléculas receptoras da membrana pós-sináptica (receptores muscarínicos e nicotínicos [47]) permitindo assim a transmissão do impulso nervoso seguinte. A ilustração da Figura 6 abaixo resume o conjunto de ações presente nos impulsos nervosos do organismo. A parte superior (em roxo) da figura representa o terminal axonal e a parte

inferior (em verde) representa a membrana pós-sináptica. O espaço livre é o espaço intersináptico, também conhecido como fenda sináptica.

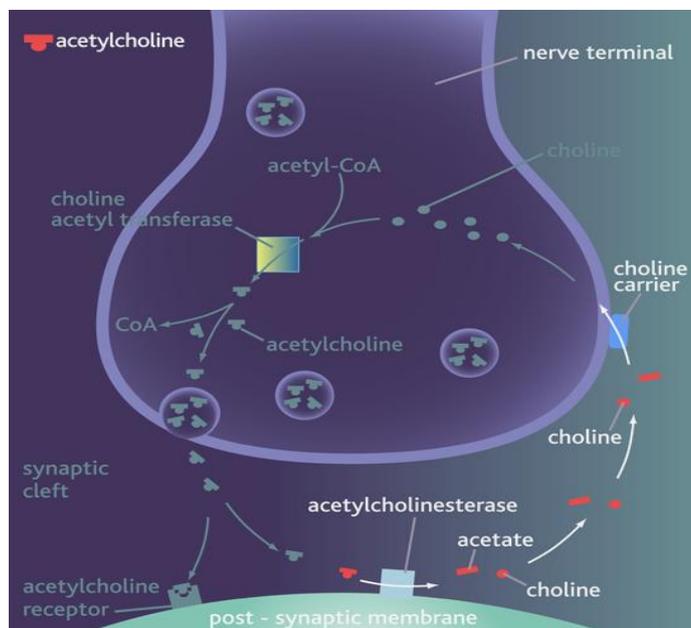


Figura 6: Ilustração esquemática da fenda sináptica e suas reações associadas. Disponível em http://www.cnsforum.com/imagebank/item/rcpt_sys_AChE_esterase/default.aspx. Acessado em 30 de setembro de 2010.

A enzima AChE de vertebrados possui múltiplas formas moleculares (homoméricas ou heteroméricas) que consistem de associações quaternárias de subunidades catalíticas e elementos não-catalíticos [48]. As formas homéricas (também chamadas de globulares) da AChE consistem em monômeros, dímeros e tetrâmeros, chamados de G_1 , G_2 e G_4 respectivamente, ligados por pontes dissulfeto entre as subunidades catalíticas. Já as formas heteroméricas (também chamadas de assimétricas) desta enzima são expressas por A_4 , A_8 e A_{12} , que correspondem respectivamente à associação de um, dois ou três tetrâmeros à subunidade que confere a assimetria às moléculas [48,49]. A Figura 7 ilustra as formas G e A da AChE. A enzima acetilcolinesterase proveniente de eritrócitos bovinos possui uma conformação enzimática homomérica tipo G_2 (Figura 8), sendo esta uma estrutura dimérica

comum em eritrócitos bovinos e humanos [50,51]. A massa de cada subunidade da conformação dimérica da AChE é de aproximadamente 80 kDa [48].

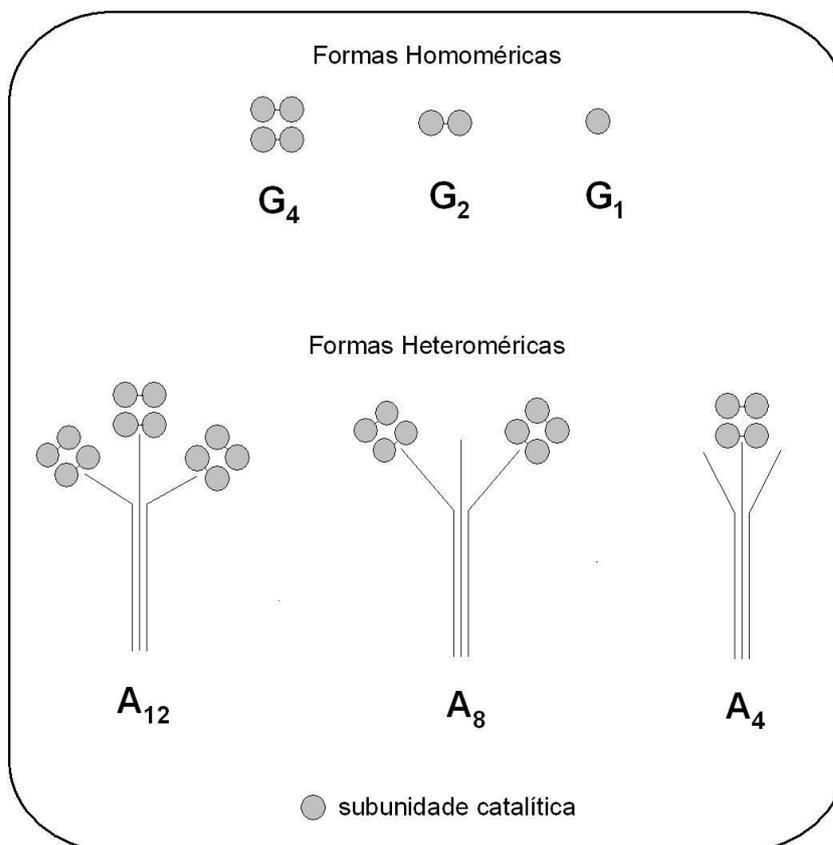


Figura 7: Ilustração das formas globulares catalíticas homoméricas (G) e heteroméricas (A) da enzima acetilcolinesterase. Adaptado de [48].

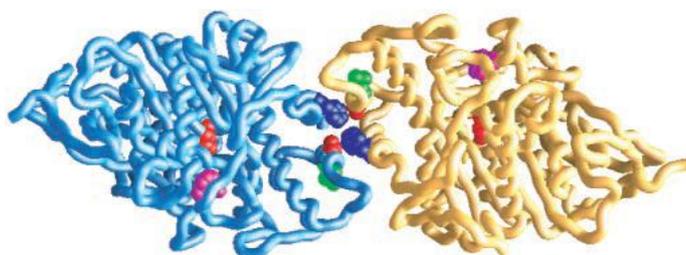


Figura 8: Ilustração da estrutura quaternária dimérica da AChE existente em mamíferos. Adaptado de [51].

O sítio ativo da AChE é constituído pela tríade catalítica de aminoácidos Serina (Ser), Glutamato (Glu) e Histidina (His) [52], localizado no centro simétrico da subunidade enzimática [53]. As cadeias laterais de aminoácidos exercem importantes funções na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico. Seguindo esta afirmação, dentro do sítio catalítico da AChE existe duas regiões de ação: o sítio catalítico (SC) e o sítio aniônico (SA) [54], indicados na representação da Figura 9. No sítio aniônico encontra-se o resíduo de aminoácido Glu, que exerce uma interação sobre o nitrogênio (carregado positivamente) da molécula de acetilcolina. No sítio catalítico, os fragmentos dos aminoácidos Ser e His são responsáveis pela catálise do substrato, especialmente o resíduo de aminoácido Ser, pois seu grupo hidroxila liga-se covalentemente ao carbono do grupo amida da molécula de ACh [55]. O mecanismo de hidrólise da enzima AChE sobre a molécula de ACh é melhor elucidado na reação ilustrada na Figura 10.

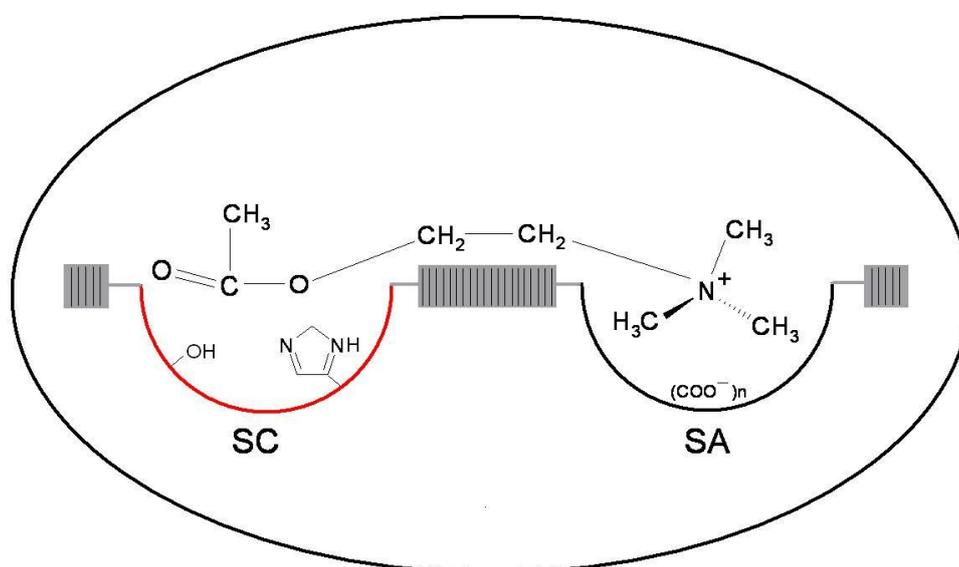


Figura 9: Ilustração esquemática do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase com a molécula de ACh ligada aos aminoácidos presentes por interações não covalentes fracas (pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo). SC: Sítio Catalítico. SA: Sítio Aniônico. Adaptado de [45].

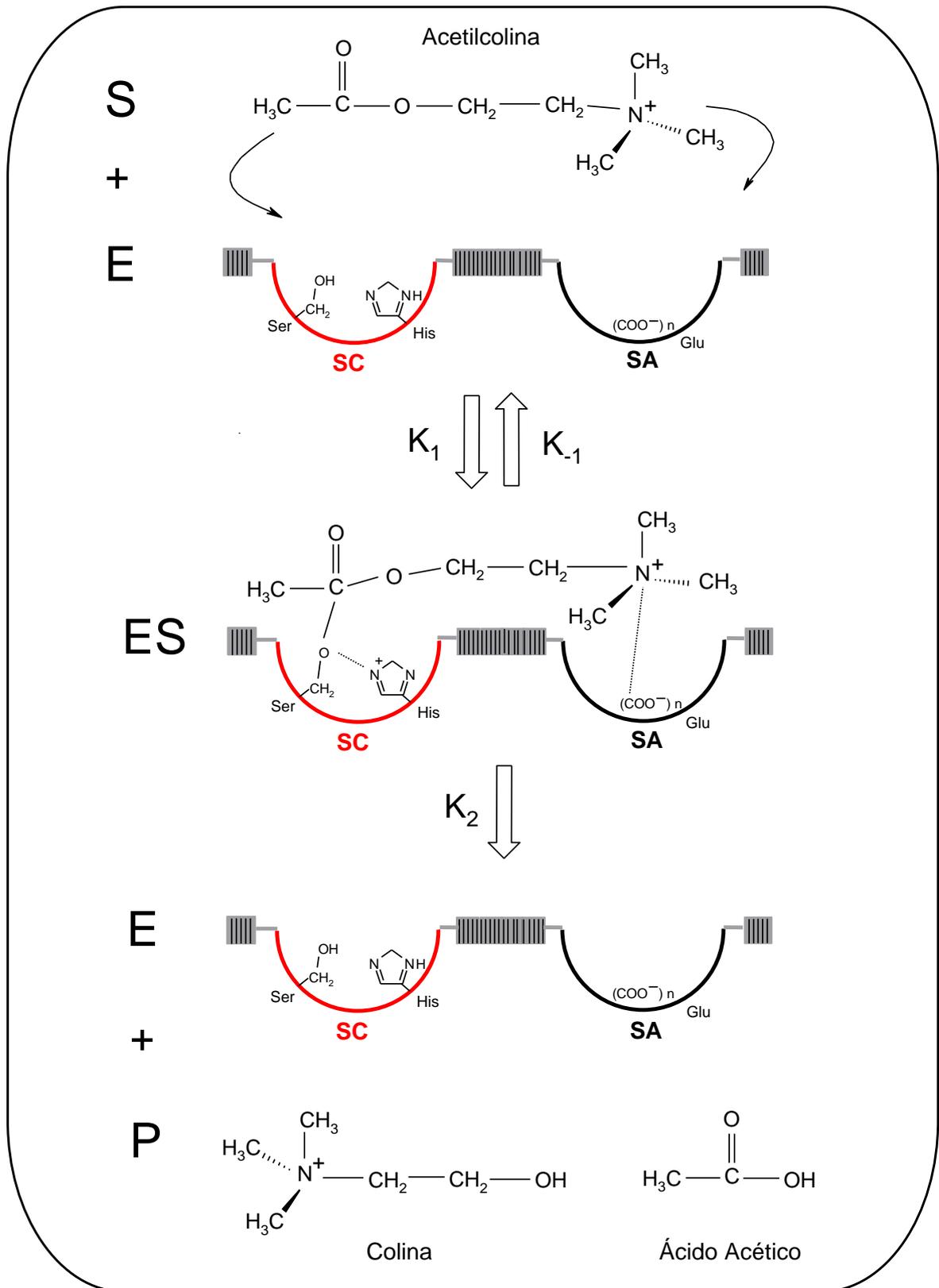


Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da ACh catalisada pela AChE. E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato e P = produto. Adaptado de [45].

A enzima AChE possui um produto reacional (colina) que pode ser oxidado em baixos potenciais. Por ser inibida pelos pesticidas das classes dos carbamatos e organofosforados, a acetilcolinesterase é uma das mais utilizadas na construção de biossensores para a determinação destes agrotóxicos [56-64].

1.4 Biossensores

Nas últimas décadas, a pesquisa no campo dos biossensores tem aumentado significativamente como resultado da necessidade acelerar, facilitar e reduzir custos de plataformas analíticas que sejam capazes de fornecer informações quantitativas e qualitativas sobre a composição de uma amostra com o mínimo de pré-tratamento desta [65].

Um biossensor é definido como um tipo de dispositivo analítico que, incorporado a um material biológico, utiliza a seletividade e a sensibilidade do bioreceptor conectado a um sensor base (transdutor). Este transdutor converte o sinal bioquímico e/ou físico-químico num sinal mensurável como resultado do bioreconhecimento entre a molécula biológica e seu respectivo analito [66]. Geralmente, os biossensores podem ser classificados conforme a natureza do transdutor físico: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, calorimétrico, piezoelétrico ou óptico.

Os biossensores amperométricos, potenciométricos e condutimétricos podem ser classificados como biossensores eletroquímicos [67]. Os amperométricos baseiam-se nas medidas de corrente, resultantes da oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas. Nessa técnica, usualmente o potencial de eletrodo de trabalho (biossensor) é mantido constante em relação ao eletrodo de referência (Ag/AgCl ou Hg/Hg₂Cl₂). A corrente resultante medida é correlacionada com a produção ou com o consumo do produto da reação

enzimática. Os biossensores potenciométricos se baseiam na diferença de potencial entre dois eletrodos em condições de corrente elétrica nula; enquanto nos biossensores condutimétricos as mudanças são observadas nas medidas de condutância, resultante de produtos de reação catalítica. A configuração geral de um biossensor amperométrico enzimático (de terceira geração) é constituído de uma enzima quimicamente imobilizada num eletrodo transdutor, sendo este acoplado simultaneamente a um amplificador, processador e monitor [68], como mostrado na Figura 11.

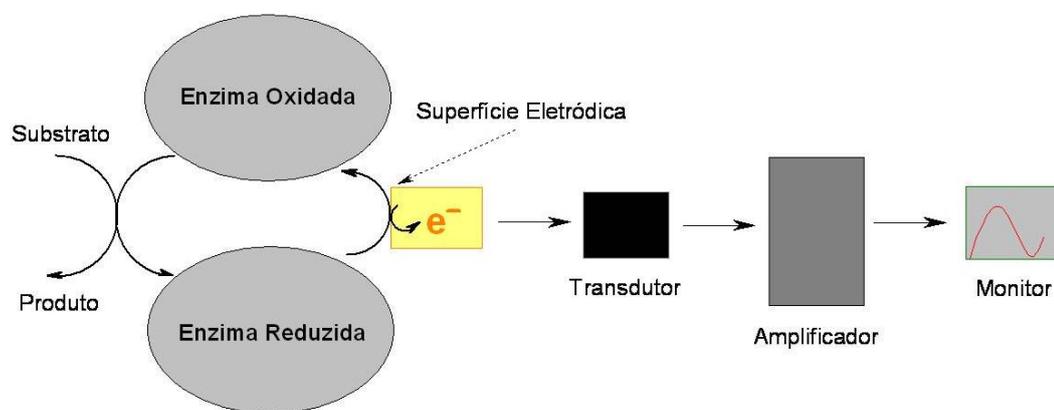


Figura 11: Ilustração esquemática dos elementos básicos de um biossensor enzimático de terceira geração. Adaptado de [68].

O primeiro biossensor amperométrico (anteriormente chamado de eletrodo enzimático) foi feito por Clark and Lions em 1962 [69]. Este sensor foi elaborado fixando-se a enzima glicose oxidase a um eletrodo de oxigênio para a determinação de glicose. Em 1969, Guibault e Montalvo [70] construíram o primeiro biossensor potenciométrico para a uréia imobilizando a enzima urease em uma matriz de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro seletivo a íons amônio. Desde então, numerosos biossensores de diferentes configurações tem sido desenvolvidos. Entre eles, os biossensores amperométricos baseados na inibição da

enzima acetilcolinesterase (AChE) têm surgido como uma técnica de monitoramento em aplicações ambientais [61], agrícolas [64], clínicas [46], alimentares [56], entre outros.

A forma de monitoramento destes biossensores modificados com AChE é relacionada com a inibição da ação da acetilcolinesterase pela adsorção reversível (carbamatos) e irreversível (organofosforados) da molécula do pesticida no sítio ativo da enzima. Inicialmente, a oxidação eletroquímica do produto da eletrólise enzimática fornece, ao eletrodo, uma corrente constante e proporcional à concentração do substrato. A adição do pesticida à solução provoca uma inibição na atividade da enzima, por consequência, na quantidade do produto formado e, finalmente, na corrente medida no eletrodo.

O estado da arte na confecção de biossensores modificados com a enzima acetilcolinesterase para a determinação de pesticidas carbamatos e organofosforados pode ser resumido nos seguintes relatos:

Mavrikou e colaboradores [71] propuseram um novo tipo de biossensor baseado em células de neuroblastoma (N2a) de ratos para a determinação de resíduos dos pesticidas carbaril e clopirifos em folha de fumo. A resposta do sensor foi expressa pela mudança do potencial de membrana das células imobilizadas, devido à inibição da AChE presente nas células pelos pesticidas. Dentre as diversas amostras analisadas em folha de fumo, o limite de detecção obtido para o carbaril e o clopirifos foi de 0,04 e 0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$. O biossensor elaborado apresentou uma reprodutibilidade com um desvio padrão relativo de 8,6% e 7,8% para o carbaril e o clopirifos, respectivamente.

Através da técnica LbL, Qu e colaboradores [72] elaboraram um biossensor com camadas auto-organizadas de filmes da enzima acetilcolinesterase, nanopartículas do polímero poliamidoamina com ouro (PAMAN-Au) e nanotubos de carbono sob um eletrodo de carbono vítreo para determinação de carbofuran em amostras vegetais. O eletrodo

apresentou boa estabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade, tendo uma resposta linear na faixa de $4,8 \times 10^{-9}$ a $0,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $4,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

Em 2008, Du e colaboradores [73] analisaram a imobilização da enzima AChE na superfície de nanotubos de carbono de paredes múltiplas ancoradas em camadas auto-organizadas de alcanotóis sob um eletrodo de ouro para a determinação de carbaril em amostras de alho. Devido às propriedades catalíticas dos nanotubos de carbono, a enzima imobilizada apresentou uma alta afinidade com seu substrato, gerando uma rápida e detectável resposta eletroquímica. O eletrodo apresentou uma resposta linear na faixa de 0.001 a 1 µg mL⁻¹ e 2,0 to 15 µg mL⁻¹, com um limite de detecção de 0,6 ng mL⁻¹ de carbaril.

Sun e Wang [74] propuseram um biossensor para a determinação de organofosforados utilizando a enzima AChE adsorvida num eletrodo de carbono vítreo contendo uma dupla membrana de quitosana e azul da Prússia. A membrana de quitosana foi utilizada para a imobilização da AChE por meio de ligações covalentes cruzadas com glutaraldeído. O azul da prússia foi eletrodepositado na superfície do eletrodo de carbono vítreo, atuando como mediador na transferência eletrônica. Nas condições otimizadas, o biossensor forneceu uma resposta linear para os pesticidas diclorvos, ometoato, triclofon e phoxim na faixa de 0,01 a 10 µg L⁻¹; 0,05 a 10 µg L⁻¹; 0,03 a 5,0 µg L⁻¹ and 0,05 a 10 µg L⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção encontrados foram de 2.5 ng L⁻¹ para o diclorvos, 15 ng L⁻¹ para o ometoato, 5 ng L⁻¹ para o triclofon e 10 ng L⁻¹ para o phoxim.

Milkani e colaboradores [75] elaboraram um novo biossensor para detecção direta de carbamatos utilizando um sensor de ressonância plasmática superficial (SPR) de ouro contendo a enzima AChE adsorvida em camadas auto-organizadas de alcanotiol. A atividade e a densidade superficial da enzima imobilizada foram determinadas usando um método fotométrico padrão. O limite de detecção encontrado para o pesticida neostigmina foi de 10 µmol L⁻¹.

He e colaboradores [76] utilizaram um micro-reator com detecção eletroquímica baseado na inibição do sistema bi-enzimático (acetilcolinesterase e colina oxidase) pelos organofosforados malaoxon, eserine e metomil. O método proposto obteve um limite de detecção de 0,5; 2,0 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o malaoxon, eserine e metomil, respectivamente. Também forneceu diversas vantagens sobre os sistemas já existentes, incluindo uma imobilização enzimática eficiente, mínimo consumo de reagentes e rápida capacidade de análise.

Caetano e Machado [63] utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com a enzima acetilcolinesterase para a determinação de carbaril em amostras “in natura” de tomate. A resposta do biossensor foi baseada na inibição da atividade enzimática pelo pesticida em questão. A curva analítica do biossensor apresentou uma linearidade entre $6,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} com um limite de detecção de $3,6 \times 10^{-6}$ g L^{-1} . O biossensor obteve uma recuperação de 83,4%, evidenciando a baixa interferência dos constituintes da matriz do vegetal.

Um fator significativo que explica o crescente número de relatos de biossensores modificados com AChE está relacionado com sua metodologia, que fornece possibilidades reais de automação e miniaturização [77]. No entanto, a principal desvantagem de biomoléculas imobilizadas em biossensores está associada à falta de estabilidade química e física, que resulta num grande desafio frente ao desenvolvimento de métodos confiáveis de imobilizações destas moléculas no âmbito operacional e de armazenagem. Uma alternativa que tende contornar essa situação são os sensores biomiméticos. Este termo anterior, também chamado de enzymeless biosensors [78], refere-se àqueles sensores nos quais os elementos biológicos, usados nos biossensores convencionais, são substituídos por compostos ou materiais que permitem a ocorrência de interações de reconhecimento de forma seletiva para

um determinado analito, de maneira similar ao que ocorre com o elemento biológico. Os sensores biomiméticos podem ser produzidos pela técnica de impressão molecular [79].

1.4.1 Imobilização Enzimática em Biossensores

Uma etapa crucial na elaboração de biossensores é a imobilização da enzima no eletrodo de trabalho. Este processo é governado por várias interações entre a enzima e o material eletródico, afetando fortemente o desempenho do biossensor em termos de sensibilidade, estabilidade, tempo de vida e reprodutibilidade. Neste contexto, a escolha do tipo de transdutor e da forma de imobilização é essencial para a confiabilidade do biossensor [80]. As principais condições na escolha do tipo de material eletródico são: biocompatibilidade com a enzima; presença de grupos funcionais necessários à fixação da enzima ou ser facilmente funcionalizável; estabilidade e baixo custo de produção [41].

Os procedimentos de imobilização de materiais biológicos em transdutores podem ser classificados em [81]:

Ligação covalente: este tipo de imobilização é realizado por ligações de grupos funcionais não ativos da enzima (não essencial para sua atividade catalítica) a grupos reativos (hidroxila, carboxila, amina, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

Ligação covalente cruzada: esta imobilização baseia-se também na formação de ligações químicas, porém na ausência de suporte. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído; 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno; 2,4, biscloroeto sulfonil fenol; etc.) são empregados tanto para imobilização quanto para a estabilização da enzima. O método baseia-se na formação de

partículas microscópicas (ou rede polimérica) em decorrência de ligações covalentes cruzadas, entre moléculas de enzimas com reagentes funcionais. A imobilização da enzima com glutaraldeído é freqüentemente empregada, pois se observa boa estabilidade da enzima frente às variações de pH, força iônica e temperatura. Contudo, a escolha da proporção enzima/glutaraldeído utilizado na imobilização é um fator crítico, pois a insolubilização da enzima deve resultar numa mínima distorção de sua estrutura, preservando assim sua atividade catalítica [82].

Oclusão em gel ou filme polimérico: este método consiste no confinamento da enzima nos espaços intersticiais de polímeros (ágar, poliacrilamida, álcool polivinílico). Uma solução de enzima a ser ocluída é misturada com uma solução de monômeros e um catalisador para polimerização. As enzimas podem ser ocluídas em poliacrilamida, alginato de cálcio, agarose, entre outros. Uma desvantagem desta técnica é o tamanho dos poros irregulares, falta de rigidez e limitações difusionais para substrato e produtos. Outra técnica de confinamento de enzimas é pelo uso de filmes poliméricos preparados eletroquimicamente. Esses filmes são obtidos por polimerização eletroquímica de compostos orgânicos aromáticos tais como pirrol, tiofeno, fenilenodiamida, fenol, etc., e a imobilização por deposição do filme polimérico sobre a superfície de um eletrodo sobre a qual a enzima tenha sido previamente imobilizada (por adsorção, ligação cruzada, etc.).

Adsorção Física: é um dos processos de imobilização mais simples. Envolve a adsorção de enzimas em suportes insolúveis que resulta geralmente em interações do tipo iônica, polar, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas. Esses suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes que incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, entre outros.

1.5 Agrotóxicos

Agrotóxico é um termo geral de uma gama de produtos químicos utilizados no combate a diversos tipos de pragas, fungos, ervas daninhas, etc. As relevâncias do uso de agrotóxicos na agricultura estão relacionadas com produções de elevadas produtividades, boa qualidade dos produtos e redução do trabalho e gastos de energia.

Quanto à classificação, os agrotóxicos podem ser diferenciados de acordo com a sua ação específica em: pesticidas (combatem pragas em geral), Fungicidas (agem sobre fungos), Herbicidas (impedem o crescimento de ervas daninhas), Rodenticidas (combatem ratos e roedores em geral), Acaricidas (para o extermínio de ácaros), molusquicidas (agem sobre moluscos, principalmente utilizado no combate contra o caramujo da esquistossomose), Algicidas (eliminação de algas), entre outros. Os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com seu grupo químico, incluindo como principais os organoclorados, cloro-fosforados, piretróides, organofosforados e os carbamatos (seção 1.5.1). Outra classificação dos agrotóxicos, realizada pela ANVISA [83], é quanto ao grau de toxicidade destes: I - extremamente tóxico; II - altamente tóxico; III - medianamente tóxico e IV - Pouco tóxico.

Os agrotóxicos começaram a ser utilizados no Brasil na década de 40, inicialmente para controlar doenças endêmicas, tal como a doença de Chagas, Malária e Febre Amarela. O uso de compostos organoclorados, entre eles o DDT, começa a ocorrer também neste mesmo período visando o combate a doenças e pragas nas atividades agrícolas e pecuárias [84].

A partir da década de 70, começam a aparecer os primeiros casos de contaminação ambiental e problemas de saúde associados ao uso excessivo e desordenado dos agrotóxicos, principalmente intoxicações de trabalhadores rurais, contaminações de solos e água e a constatação de resíduos químicos em alimentos cultivados com estes compostos [85]. No entanto, foi no final da década de 80, que se iniciaram os estudos dos pesticidas utilizados no

país, visando as adequações necessárias para enfrentar corretamente o problema das pragas [84].

O Brasil foi, em 2009, o maior mercado de agrotóxicos do mundo [86]. O levantamento foi encomendado pela ANDEF e mostra que essa indústria movimentou no referido ano US\$ 7,1 bilhões, ante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos.

1.5.1 Carbamatos

Dentre os pesticidas mais amplamente utilizados na agricultura estão aqueles da classe dos carbamatos. Estes são compostos por ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico. Estes pesticidas se degradam rapidamente e não possui efeito acumulativo nos tecidos gordurosos. Em relação aos pesticidas organoclorados e organofosforados, os carbamatos possuem toxicidade aguda média, atuando também na inibição da enzima acetilcolinesterase (seção 1.3.3 e 1.4).

Os carbamatos são substâncias altamente cancerígenas. A Tabela 2 fornece os níveis aceitáveis de alguns destes compostos químicos no corpo humano segundo os ingredientes ativos (IA) destinados ao uso agrícola com sua respectiva ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima ingerida diariamente durante toda a vida de um indivíduo. A tolerância a estes compostos varia de pessoa para pessoa.

Tabela 2: Ingestão diária aceitável, IDA, grupo químico, classe e classificação toxicológica de alguns ingredientes ativos da classe dos carbamatos.

Ingrediente Ativo (IA)	IDA (mg/Kg p.c)	Grupo Químico	Classe	Classificação Toxicológica
Aldicarbe	0,003	Metilcarbamato de oxina	Inseticida Acaricida Nematicida	Classe III
Bendiocarbe	---	Metilcarbamato de benzodioxol	Emprego domissanitário	Classe I
Carbaril	0,003	Metilcarbamato de naftila	Inseticida	Classe II
Carbofuran	0,002	Metilcarbamato de benzofuranila	Inseticida Cupinicida Acaricida Nematicida	Classe I
Carbosulfan	0,01	Metilcarbamato de dimetil benzofuranila	Inseticida Acaricida Nematicida	Classe II
Metiocarbe	0,02	Metilcarbamato de fenila	Inseticida	Classe II

(---) dado numérico não disponível. Fonte: ANVISA [83].

1.5.1.1 Carbaril

O carbaril (1-naftil-metilcarbamato) é um inseticida de contato com propriedades sistêmicas, da classe toxicológica II (altamente tóxico). É um sólido branco, cristalino, de odor característico, com ponto de fusão de 142 °C e pressão de vapor de $5,3 \times 10^{-8}$ atm a 25°C. É solúvel em solventes orgânicos e ligeiramente solúvel em água, hidrolisável em pH alcalino. Sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 12:

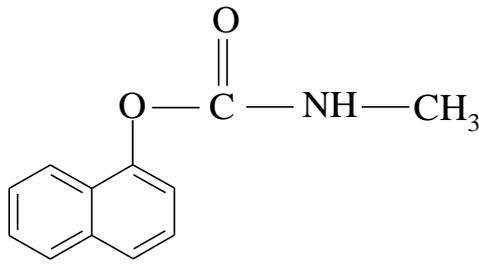


Figura 12: Ilustração da fórmula estrutural do carbaril.

Este pesticida é utilizado em mais de 13 culturas, destacando-se as de tomate, feijão e maçã. Os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) permitido ANVISA para essas culturas são de 0,1, 0,5 e 2,0 mg kg⁻¹ respectivamente [87].

1.5.1.2 Metomil

O metomil (S-metil N(metilcarbamoiloxi) tioacetimidato) é um pesticida utilizado como inseticida e acaricida em diversas culturas, pertencente ao grupo dos metilcarbamatos de oxima e possui classe toxicológica I, ou seja, extremamente tóxico, sendo o Lannate® a formulação mais utilizada deste pesticida para o controle de pragas como a broca pequena do fruto, pulgão verde, lagarta da soja etc. Este agrotóxico é recomendado para as culturas de algodão, batata, brócolis, couve, milho, repolho, soja, tomate e trigo, sendo que o LMR permitido pela ANVISA de metomil em soja, tomate e couve é de 0,1; 1,0 e 3,0 mg/Kg respectivamente [88]. A fórmula estrutural do metomil está apresentada na Figura 13.

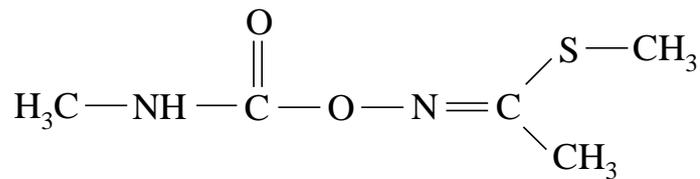


Figura 13: Ilustração da fórmula estrutural do metomil.

Devido ao tempo vida dos pesticidas no ambiente, seus resíduos tóxicos podem persistir no ar, água e solo. Em sua maioria, são altamente tóxicos podendo causar sérios danos à saúde. Esta possibilidade de contaminação de águas e alimentos exige um monitoramento, cada vez mais freqüente, destes poluentes, assim como de seus derivados. Entretanto, a diversificação dos métodos de análise e monitoramento, visando à diminuição dos custos e das dificuldades de implementação, torna-se cada vez mais necessária nos dias atuais.

1.6 Técnicas de Detecção de Agrotóxicos e seus Resíduos

As técnicas analíticas padrão para a detecção de agrotóxicos e seus resíduos é a cromatografia (líquida de alta eficiência, gasosa e de camada delgada), também são utilizadas técnicas espectroscópicas como espectrometria de massa, infra-vermelho, ultra-violeta. Entretanto, a aplicação destas metodologias em matizes complexas como alimentos ou solo normalmente envolve uma rotina complexa de pré-tratamento da amostra, alto custo de instrumentação e impossibilidade de análise em campo. Esta rotina pode ser composta de algumas das seguintes etapas [89]: modificações da matriz, extração (extração soxhlet (SOX), extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), micro-extração em fase sólida

(SPME), dispersão da matriz em fase sólida, extração com fluido supercrítico (SFE), extração acelerada com solvente (ASE), extração assistida por microondas, etc.

Mcgarvey [90] e Yang e colaboradores [91] descreveram, em detalhes, os procedimentos necessários para a extração, purificação e armazenagem das amostras, assim como a aplicação da cromatografia para a quantificação dos pesticidas que as contaminam. Além destas técnicas, também são utilizados imunoenaios [92] e técnicas espectroscópicas (massa, infravermelho [93] e ultravioleta [94]). Entretanto, apesar destas técnicas serem muito sensíveis, elas são dispendiosas e exigem uma intensa manipulação de amostras e um longo tempo de análise.

A aplicação das metodologias de preparação das amostras apresentadas acima é um pouco complicada, exigindo muitas vezes a manipulação de uma quantidade não desprezível de solventes tóxicos, o que implica em riscos à saúde humana decorrentes de seus possíveis efeitos nocivos [95]. Para minimizar estes efeitos, técnicas têm sido desenvolvidas [96]. Entretanto, uma situação ideal seria, obviamente, evitar a aplicação de todo este procedimento para diminuir o tempo e o custo das análises.

Uma alternativa que tem se tornado cada dia mais importante são as técnicas eletroanalíticas. Elas são bastante precisas e sensíveis, permitindo custos e tempos de análises muito menores. Dentre elas, as voltametrias de pulso diferencial e de onda quadrada são as mais utilizadas por serem técnicas simples, aplicação direta, sem a necessidade de manipulação das amostras, de baixo custo e que requerem um pequeno tempo de análise. Desta forma, seu uso tem sido crescente no monitoramento de diferentes poluentes em diversas matrizes e, mais especificamente, para a determinação de pesticidas em diferentes meios [97, 98]. Normalmente, os limites de detecção encontrados são apenas ligeiramente mais elevados àqueles observados em experimentos cromatográficos. Como os limites

máximos permitidos para pesticidas em alimentos são extremamente baixos, na ordem de alguns ppb (partes por bilhão), limites de detecção muito baixos se tornam necessários.

Conhecidos pelas suas características como rapidez e simplicidade na elaboração da pasta, e renovação da superfície do eletrodo a cada nova medida, eletrodos e biossensores de pasta de carbono foram durante muitas décadas e ainda são utilizados em diversos tipos de aplicações. A determinação de pesticidas da classe dos carbamatos com estes biossensores é um exemplo muito comum. No entanto, um dos pontos que desfavorecem estes biossensores em aplicações analíticas são os seus altos limites de detecção. Uma alternativa que surge para tentar diminuir o limite de detecção e a sensibilidade destes eletrodos é a utilização dos nanotubos de carbono como material suporte na confecção dos biossensores. Devido suas características como elevada área ativa e eletrocatalise, estes nanomateriais podem suprir esta lacuna tão importante e necessária frente à determinação de analitos de interesse utilizando técnicas eletroanalíticas.

2. OBJETIVOS

O projeto de pesquisa propôs o desenvolvimento, caracterização, utilização e comparação de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono de parede múltipla modificados com a enzima acetilcolinesterase para a determinação eletroquímica dos pesticidas carbaril e metomil em água destilada e fluvial.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Na Tabela 3 encontram-se listados os reagentes utilizados, a procedência e a pureza.

Tabela 3: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Material	Procedência	Pureza (%)
Acetilcolinesterase de eritrócitos bovino (0,28 U mg ⁻¹ do sólido liofilizado) [AChE]	Sigma	*****
Iodeto de Acetilcolina [ASChI]	Sigma	98
Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas	Aldrich	95
Pó de grafite	Sigma	98
Óleo mineral aglutinante	Nujol [®]	99
Ácido Sulfúrico	Merck	96,4
Ácido Nítrico	Merck	65
Hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado	J.T Baker	99,4
Fosfato de Potássio Monobásico	Merk	99,5
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro	J.T. Baker	99,6
Carbaril	Sigma-Aldrich	99,8
Metomil	Sigma-Aldrich	99,9
Glutaraldeído 25%	Sigma-Aldrich	*****
Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB)	Aldrich	99

3.2 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc. Todo o material de vidro e PTFE utilizado no desenvolvimento do trabalho foi lavado com água e detergente e posteriormente em meio ácido.

A solução sulfonítrica ($3\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})} : 1\text{HNO}_{3(\text{conc})}$, v/v) foi utilizada nas etapas de purificação, “quebra” e funcionalização dos MWCNTs.

As medidas de caracterização voltamétrica dos biossensores foram realizadas em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Neste trabalho foram utilizadas soluções do substrato iodeto de acetiltiocolina (ASChI) em vez do substrato iodeto de acetilcolina (AChI). Isso se deve ao fato de que este último substrato é eletroquimicamente ativo em solução.

Foram preparadas soluções tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos diferentes pH 5,0; 6,0; 7,0; 7,4; 8,0; e 9,0.

Nas análises de UV-Vis para avaliar os parâmetros cinéticos da enzima AChE, utilizou-se as seguintes soluções estoque: DTNB $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$, [ASChI] $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução da enzima AChE 20 U ($71,43 \text{ mg mL}^{-1}$), todas estas soluções preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

Soluções de glutaraldeído 0,05; 0,1; 0,5 e 1% foram empregadas para avaliar qual a melhor porcentagem a ser utilizada nos biossensores.

As soluções de substrato e dos pesticidas não foram armazenadas, sendo preparadas na hora de serem utilizadas. A solução da enzima AChE foi feita solubilizando-se $71,43 \text{ mg}$ da enzima em 1 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) por 3 horas em um banho termostato à 37°C . Esta solução foi armazenada em diversas alíquotas num congelador à -10°C . Cada

uma destas alíquotas foi utilizada e descartada, ficando armazenadas por um período máximo de quinze dias.

As soluções dos pesticidas carbaril e metomil utilizadas na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $1,5$ a $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram feitas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e preparadas a partir de uma solução estoque $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ambos pesticidas. O sólido destes carbamatos foi dissolvido em acetonitrila por agitação ultrasônica antes do preparo das soluções.

3.3 Instrumentação utilizada

Foram utilizadas micropipetas de volume variável Eppendorf Research® com ponteiros esterilizáveis.

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204.

As soluções tiveram seus valores de pH ajustados em um pH-metro Qualxtron modelo 8010.

Para tratamento dos MWCNTs foram utilizados béqueres e um agitador magnético Frisatm modelo 752.

Para a dissolução dos pesticidas carbaril e metomil em acetonitrila foi utilizado o equipamento Ultrasom Chubby.

As imagens de MEV foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura XL Series Philips modelo XL 30 FEG no Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP.

As análises de UV-Vis foram feitas em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G da Varian, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, no Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP.

As medidas de voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e de cronoamperometria (CA) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12/30 da Autolab[®].

As medidas eletroquímicas foram feitas utilizando-se uma célula com camisa de vidro, para controle da temperatura, com compartimento único de 10 mL e tampa de PTFE contendo orifícios para três eletrodos e para entrada e saída de N₂ (desaeração), indicado na Figura 14. Para o controle da temperatura utilizou-se um banho ultratermostato da Nova Ética, modelo 521/2D.

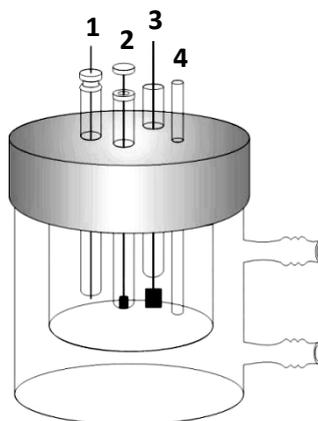


Figura 14: Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) eletrodo de trabalho, (2) referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada e saída de N₂ respectivamente.

Neste projeto utilizaram-se, além dos EPNTC e EPC, foram preparados os biossensores de pasta de nanotubos de carbono modificado com a enzima acetilcolinesterase (EPNTC-AChE) e de pasta de carbono modificado com a enzima acetilcolinesterase (EPC-AChE).

O preparo dos biossensores foi realizado utilizando uma massa de 22,5 mg de pó de grafite ou pó de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, 10,0 mg de Nujol®, 12,5 mg da enzima AChE solubilizada e 5,0 mg de glutaraldeído 0,1% para facilitar a formação das ligações cruzadas entre a enzima e o suporte. A massa total da pasta foi de 50 mg, tendo uma proporção em massa de 45% (suporte), 20% (óleo mineral), 25% (enzima) e 10% (glutaraldeído). A pasta obtida foi misturada por 15 minutos até sua homogeneidade e então introduzida no embolo de uma seringa hipodérmica de 0,50 mL (adaptada com um contato elétrico através do embolo) e compactada manualmente. Os eletrodos confeccionados tinham uma área geométrica de 0,170 cm².

O eletrodo de referência utilizado nos experimentos, constitui-se de um fio de prata imerso em uma solução KCl 3 mol L⁻¹ saturada de Ag⁺ em meio aquoso, cujo o valor de potencial é de 0,222 V em relação ao eletrodo reversível de hidrogênio. Como eletrodo auxiliar utilizou-se uma placa de platina de 2,00 cm² de área geométrica.

3.4 Funcionalização dos NTC

Em um béquer de 500 mL, os NTC foram dispersos em uma solução contendo 150 mL de H₂SO₄(conc), 50 mL de HNO₃(conc) e 100 mL de água ultrapura e submetidos à agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram filtrados num sistema a vácuo e enxaguados com água ultrapura até o pH da solução se tornar neutro. A secagem do material foi efetuada em estufa a vácuo por 12 horas numa temperatura de 180°C.

3.5 Determinação dos Parâmetros Cinéticos da AChE

Os parâmetros cinéticos da enzima, como a constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{máx}$) foram determinados pelo método espectrofotométrico. Este método é simples e rápido, apresenta boa precisão e sensibilidade. Proposto por Ellman e colaboradores [99], baseia-se na medida colorimétrica da reação de hidrólise da acetiltiocolina pela AChE (reação da Figura 15). A tiocolina liberada reage com o DTNB formando um ânion de coloração amarela (5-tio-2-nitrobenzoato), (Figura 15), chamado TNB^{2-} , que é quantificado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de aproximadamente 405 nm.

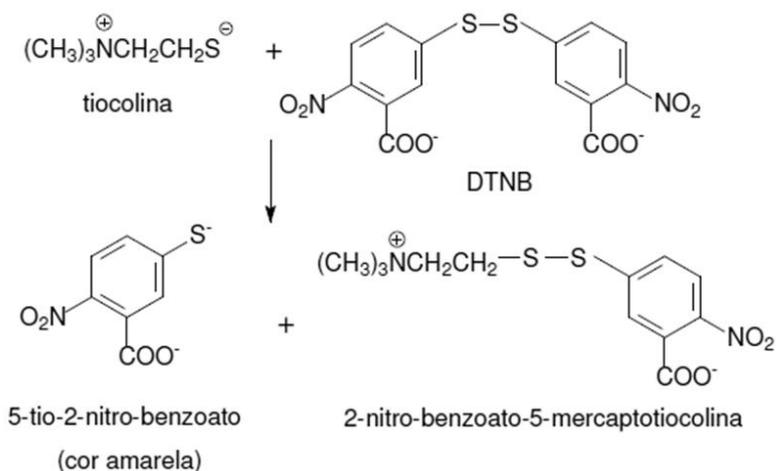


Figura 15: Ilustração da reação entre a tiocolina e o DTNB, gerando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato, este responsável pela determinação espectrofotométrica experimental.

Em uma cubeta de quartzo, adicionou-se o tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), $10 \mu\text{L}$ de solução padrão de AChE $71,43 \text{ mg mL}^{-1}$ e alíquotas crescentes de ASChI e DTNB 15 mmol L^{-1} , restando na cubeta um volume final de 3 mL. Essa cubeta foi classificada como “amostra”. A cubeta denominada “branco” continha todos reagentes, com excessão da enzima

AChE. A absorvância foi medida em um tempo reacional de 60 segundos, sendo que as retas obtidas para cada ponto geraram inclinações ($\text{tg}\theta$) que, ao serem divididas pelo valor do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do ânion TNB^{2-} ($14150 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), forneceram os valores da velocidade reacional em $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A reação espectrofotométrica ocorreu a uma temperatura de 37°C .

Uma unidade (U) da enzima AChE hidrolisa $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto.

3.6 Otimização dos Parâmetros Eletródicos

A determinação dos potenciais de oxidação da tiocolina foi feita por SWV. Os parâmetros utilizados na SWV foram: amplitude de pulso (a) de 50 mV , incremento (ΔE_s) de 2 mV e frequência (f) de 70 s^{-1} , conforme otimização prévia. Toda medida eletroquímica realizada em solução foi previamente borbulhada por 3 minutos com $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Inicialmente determinou-se a região do potencial de oxidação do substrato com a enzima AChE presente em uma solução ($13,5 \text{ mg mL}^{-1}$) utilizando-se o EPNTC (sem enzima) numa proporção de 80% (m/m) de NTC 20% (m/m) de óleo mineral Nujol[®] em solução do substrato ASChI $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 8,0). Neste mesmo estudo, analisou-se o potencial de oxidação da tiocolina com a enzima imobilizada nos biossensores. Para isto, preparou-se uma solução padrão da AChE ($71,43 \text{ mg mL}^{-1}$) solubilizada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) por 3 horas em banho termostatizado. Desta solução, $0,714 \text{ mg}$ ($10\mu\text{L}$) foram misturados com os NTC ou PG e o aglutinante para a elaboração dos biossensores na seguinte proporção em massa: 60% (m/m) NTC ou PG, e 20% (m/m) da enzima AChE e 20% (m/m) de óleo mineral aglutinante.

Utilizando o método cronoamperométrico, observou-se a variação na corrente limite de difusão (I_{ld}) de oxidação da tiocolina com tempo de análise de 210 s , em solução do

substrato ASChI 5,0 mmol L⁻¹ elaborado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). O estudo foi realizado para ambos biossensores.

O efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função da quantidade de enzima AChE imobilizada nos biossensores foi obtidas por SWV em ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). A concentração de enzima utilizada neste experimento variou de 0,178 a 1,071 mg mL⁻¹.

O estudo do efeito do pH foi realizado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em valores de pH de 5,0 a 9,0 com os dois biossensores confeccionados.

O estudo da temperatura reacional foi feito com os biossensores numa concentração de ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) variando-se a temperatura de 20 à 60°C. Esta análise utilizou o banho termostaticado para controlar a temperatura da solução.

Para o estudo do efeito do glutaraldeído sobre a imobilização enzimática utilizou-se o glutaraldeído 0,1% em diferentes proporções (5 a 15%) na pasta de nanotubos de carbono e, utilizando a técnica de cronoamperometria, avaliou-se a corrente limite de oxidação da tiocolina catalizada pela AChE. O estudo foi feito em ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), num potencial de 300 mV e tempo de 200 segundos.

As medidas de repetibilidade foram feitas de maneira consecutiva na mesma solução do substrato. As medidas de reprodutibilidade foram feitas em dias diferentes, preparando-se novamente todo o sistema eletroquímico. Estas medidas de repetibilidade e reprodutibilidade foram feitas com seis biossensores (n = 6), EPNTC e EPC, em solução do substrato ASChI 5,0 mmol L⁻¹ pela técnica de SWV onde calculou-se a média e o desvio padrão.

O tempo de vida dos biossensores foi determinado por cronoamperometria, num potencial de 300 mV e tempo de 210 segundos, numa solução ASChI 5,0 mmol L⁻¹ elaborada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) à 37°C. A análise deste parâmetro foi através da

corrente limite de oxidação obtida em função do tempo de armazenagem dos biossensores em congelador à -10°C .

3.7 Determinação dos Pesticidas Carbaril e Metomil

As medidas cronoamperométricas, com tempo de análise de 210 s, no potencial de +300 mV, foram realizadas a 37°C , em 10 mL de solução do substrato ASChI $85\ \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1\ \text{mol L}^{-1}$, pH 7,0.

3.7.1 Determinação do Tempo de Incubação

Inicialmente determinou-se o tempo de incubação dos biossensores, tempo em que estes devem ficar imersos nas soluções dos pesticidas antes das medidas cronoamperométricas. Os biossensores foram imersos em 10 mL de solução de carbaril e metomil $5,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ por diferentes tempos, de 5 a 30 min. Depois de serem imersos nas soluções dos pesticidas, foram enxaguados e inseridos na célula eletroquímica para as medidas cronoamperométricas.

3.7.2 Reativação do Eletrodo

Regeneração é uma das chaves no desenvolvimento de biossensores baseados no processo de inibição enzimática. Diferentes métodos de reativação têm sido utilizados, como

a simples lavagem do biossensor com tampão, incubação em reagentes de regeneração como o sulfato de atropina e a imersão em altas concentrações do substrato. Neste trabalho a regeneração foi obtida pela permanência do eletrodo, após cada medida, por 5 minutos na célula eletroquímica com uma nova solução do substrato ASChI 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.7.3 Construção da Curva Analítica

Determinado o tempo de incubação, construiu-se a curva analítica para a determinação dos pesticidas carbaril e metomil, variando-se a concentração destes de 1,5 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Depois de imersos por 12 minutos em diferentes concentrações dos pesticidas, os biossensores foram enxaguados e inseridos na célula eletroquímica para as medidas cronoamperométricas. Em cada medida, todo sistema eletroquímico foi renovado (com exceção das determinações em matrizes fluviais e em ácido húmico, onde as determinações foram feitas numa mesma solução). Construiu-se a curva analítica pelo processo de inibição enzimática, utilizando a porcentagem de inibição (%I) em função da concentração do pesticida. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando-se a equação 20 juntamente com as correntes dos cronoamperogramas obtidas no tempo de 210 s:

$$\% I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100 \quad (20)$$

onde I_0 e I_1 são as respectivas correntes medidas antes e após a inibição.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se a equação 21:

$$LD = \frac{3 \times S_B}{b} \quad (21)$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes de 10 brancos, obtidas de cronoamperogramas feitos a 300 mV, e b o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando-se a equação 22:

$$LQ = \frac{10 \times S_B}{b} \quad (22)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização dos materiais suporte utilizados na elaboração dos biossensores foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), indicada na Figura 16. Pode ser observado que os NTC não funcionalizados (Figura 16A) apresentam tubos de diversos comprimentos e diâmetros e estão dispersos de forma não homogênea.

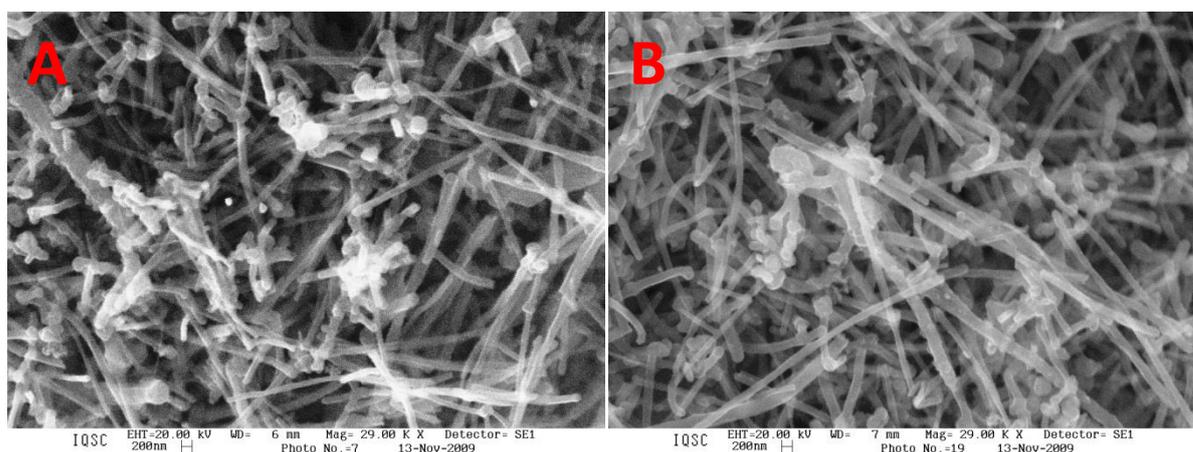


Figura 16: Imagens de MEV dos nanotubos de carbono não funcionalizados (A) e com funcionalização em solução de $3\text{H}_2\text{SO}_4 : 1\text{HNO}_3$ (B). Aumento de 29.000X.

Após a etapa de funcionalização dos nanotubos de carbono em meio ácido $3\text{H}_2\text{SO}_4 : 1\text{HNO}_3$ ocorrem significativas modificações nos tubos, tais como: a remoção das capas protetoras, ou seja, o desbloqueio dos planos de borda, remoção de impurezas e a diminuição tanto do comprimento quanto do diâmetro dos tubos acarretando em uma melhor homogeneização da amostra [100]. A quebra dos nanotubos pode ser observada na Figura

16B na forma de uma melhor compactação, assim como diminuição relativa das suas espessuras.

A Figura 17 mostra a imagem feita por MEV da superfície do pó de grafite utilizado na elaboração dos eletrodos de pasta de carbono.

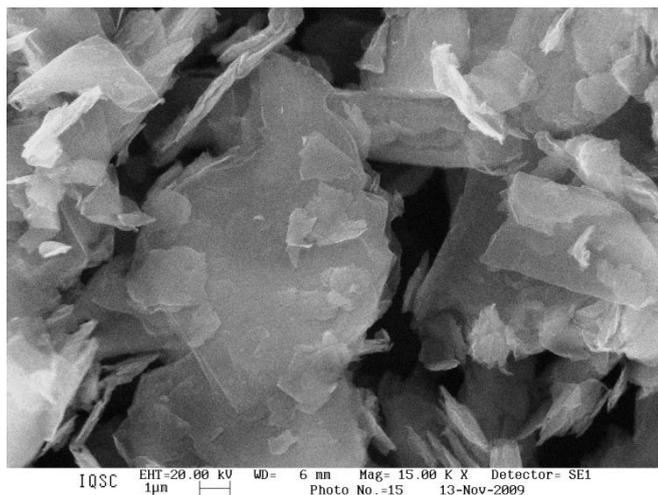


Figura 17: Imagens de MEV do pó de grafite utilizado na confecção dos eletrodos de pasta de carbono. Aumento de 15.000X.

Imagens de MEV da superfície da pasta de nanotubos de carbono funcionalizado (Figura 18A) e da pasta de carbono (Figura 18B) foram realizadas. A pasta dos eletrodos foi elaborada numa proporção de 80% (m/m) de NTC ou PG e 20% (m/m) de óleo mineral Nujol[®]. A estrutura em escala nanométrica da superfície do eletrodo elaborado com os nanotubos pode ser facilmente observada na imagem da Figura 18A.

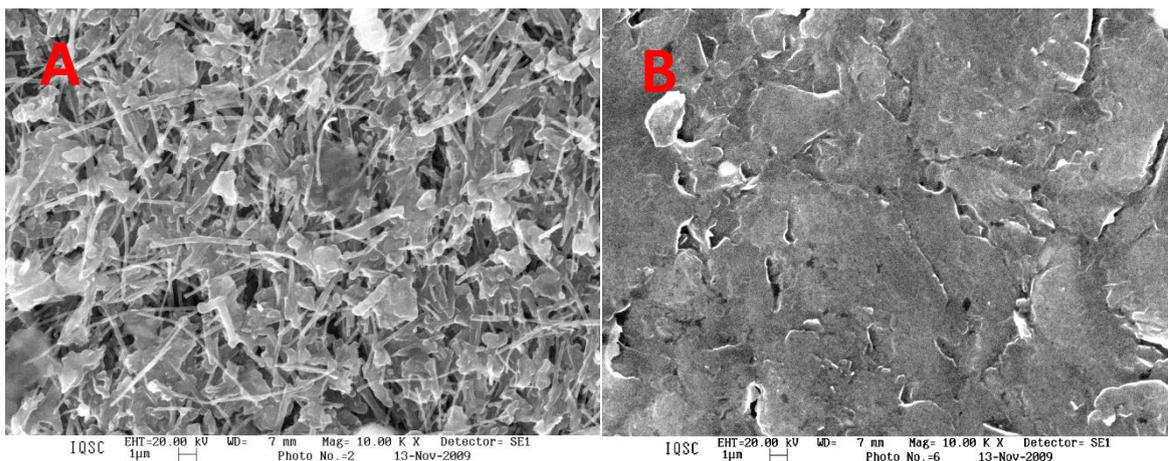


Figura 18: Imagens de MEV da pasta de nanotubos de carbono funcionalizada (A) e da pasta de carbono (B). Aumento de 10.000X

4.2 Caracterização por Voltametria Cíclica

A Figura 19 apresenta o perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de nanotubos de carbono funcionalizados (—) e do eletrodo de pasta de carbono (—), estes numa proporção de 80% (m^2/m) de NTC ou PG e 20% (m^2/m) de óleo mineral. O estudo foi realizado em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

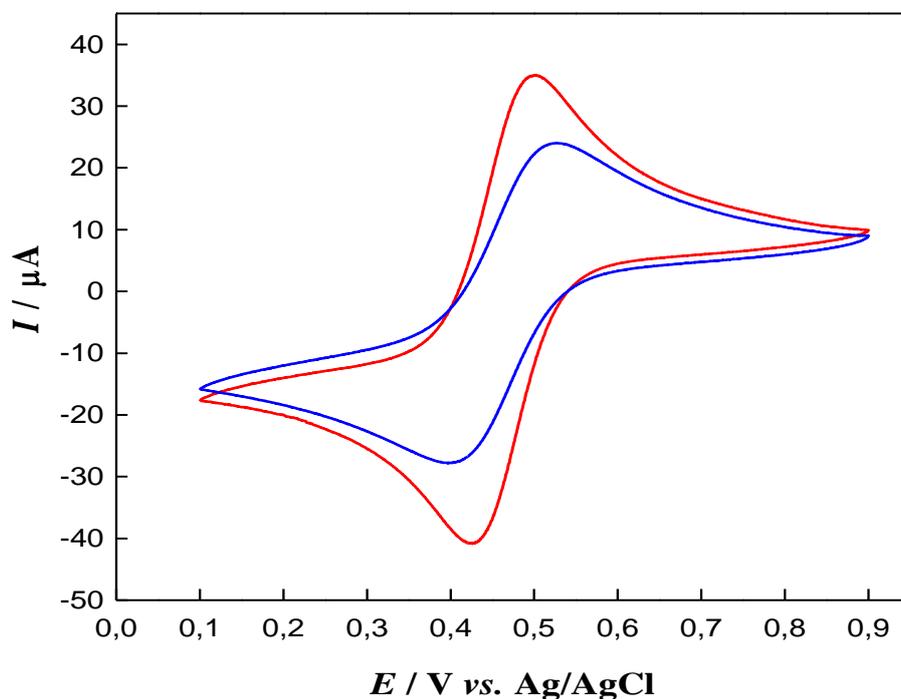


Figura 19: Voltamogramas cíclicos para o EPNTC (—) e do EPC (—) em solução de hexacianoferrato (II) de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O EPNTC elaborado apresentou um $\Delta E = 73 \text{ mV}$ para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, mostrando que a etapa de funcionalização melhora a reversibilidade do sistema quando comparado com EPC, que apresentou um $\Delta E = 126 \text{ mV}$. O potencial de pico de oxidação do Fe(II) para o EPNTC ocorreu em $+490 \text{ mV}$ e para o EPC em $+530 \text{ mV}$, evidenciando um deslocamento de potencial de 40 mV para valores mais negativos, quando comparado ao EPC. O EPNTC também apresentou um aumento de 47% nas correntes de pico anódica (I_{pa}) e 48% na corrente de pico catódica (I_{pc}) em relação ao EPC.

A partir dos estudos de voltametria cíclica, utilizando um par redox com comportamento bem estabelecido, foi possível evidenciar que a funcionalização da pasta de carbono com os nanotubos tratados melhorou o caráter eletrocatalítico e condutor do eletrodo. Estas características foram observadas devido à melhoria da reversibilidade do sistema, ao

deslocamento do potencial de oxidação para valores mais negativos e aos significativos aumentos nas correntes de oxidação e redução. Todo eletrodo de pasta de NTC foi posteriormente elaborado com nanotubos funcionalizados em meio ácido.

4.3 Parâmetros Cinéticos da Enzima AChE

Parâmetros cinéticos como a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da enzima AChE foram determinados através do método de Ellmam [99] modificado utilizando um espectrofotômetro UV-Vis.

Um fator chave que afeta a velocidade de reações catalisadas por enzimas é a concentração de substrato. A abordagem utilizada neste experimento, usualmente empregada em estudos cinéticos enzimáticos, foi medir a velocidade inicial (V_o) quando a concentração do substrato é muito maior que a concentração da enzima, ou seja, no início da reação. Dessa forma, a V_o pode ser explorada como uma função da concentração de ASChI, pois uma relação linear é observada até o ponto $V_{m\acute{a}x}/2$, como ilustrado na Figura 4. O efeito sobre a V_o ao variar a $[ASChI]$, mantendo a concentração da enzima constante, é mostrada no gráfico de Michaelis-Menten obtido (Figura 20).

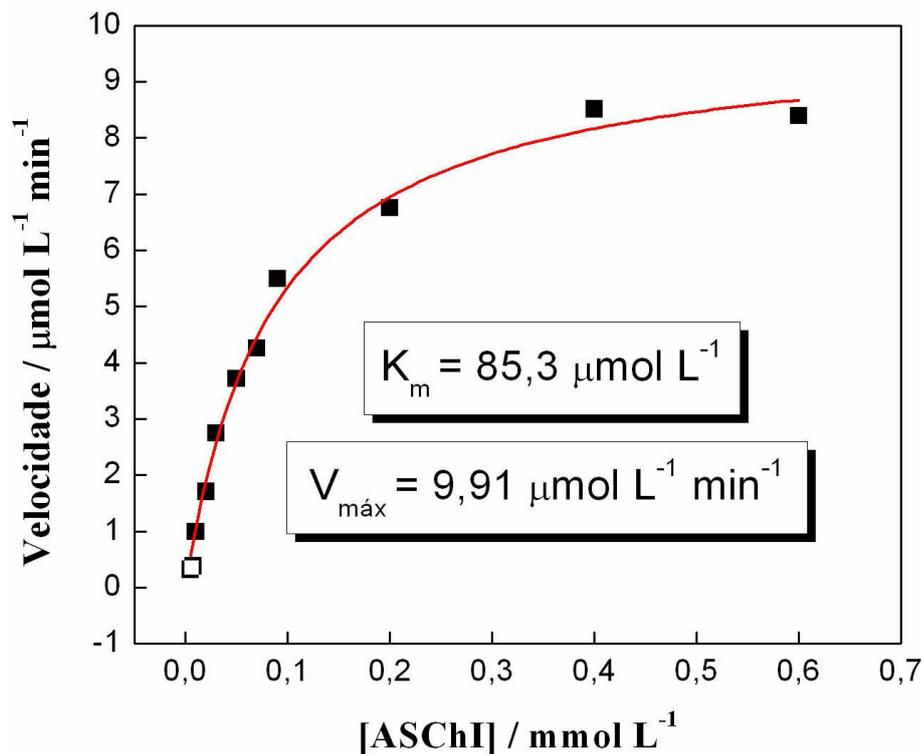


Figura 20: Gráfico de Michaelis-Menten obtido experimentalmente pelo método espectrofotométrico.

A curva de Michaelis-Menten acima foi obtida forneceu valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ igual a $85,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $9,91 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente. Considerando que o K_m da enzima AChE é de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 1), o valor obtido experimentalmente indica uma ótima relação de afinidade entre a enzima e o substrato acetilcolina estudados [41]. Os parâmetros experimentais K_m e $V_{\text{máx}}$ foram obtidos por meio da função hipérbole no software comercial Origin versão 8.5, sendo esta uma função modelo para reações enzimáticas regidas pela cinética de Michaelis-Menten.

4.4 Potencial de Trabalho dos Biossensores

No intuito de conhecer a região do potencial de oxidação do produto da hidrólise do substrato ASChI, um experimento foi realizado com o EPNTC (80% (^{m/m}) NTC e 20% (^{m/m}) de óleo mineral) com a enzima AChE em solução numa concentração de 13,5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 0,5 mmol L⁻¹ do substrato ASChI. O estudo foi feito por voltametria de onda quadrada e os voltamogramas de oxidação do substrato foram medidos em função do tempo de reação enzimática em solução (Figura 21).

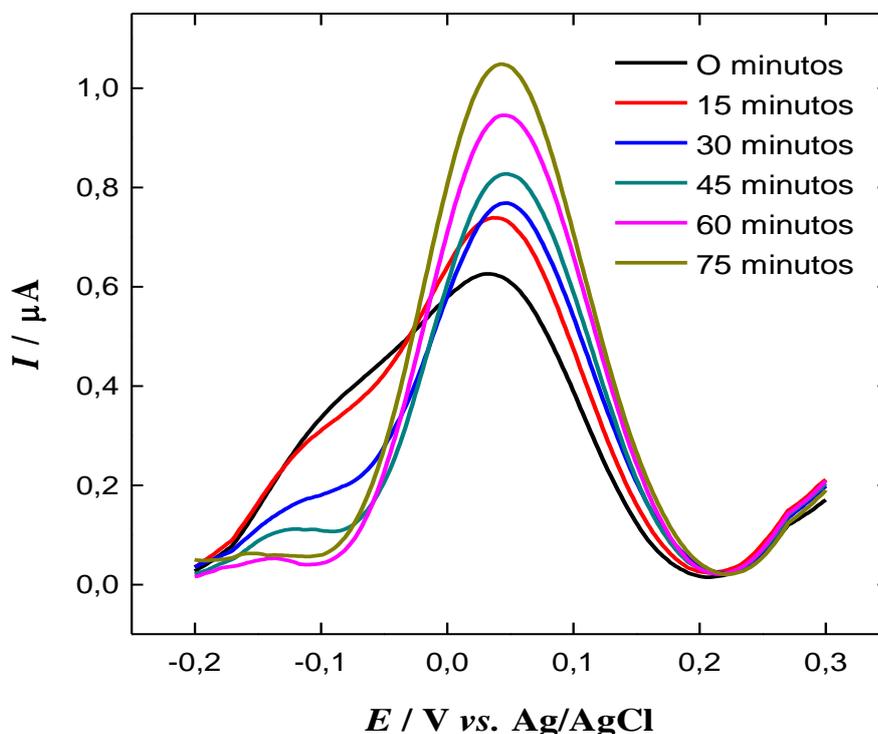


Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em função do tempo reacional. [ASChI] = 0,5 mmol L⁻¹; [AChE] = 13,5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). Amplitude = 50 mV, $f = 70$ Hz.

Pela observação da Figura 21 nota-se que a um potencial de aproximadamente +45 mV foi encontrado na oxidação da tiocolina enzimaticamente catalisada em solução.

Para a análise do potencial de oxidação da tiocolina com a enzima imobilizada nos biossensores, preparou-se a solução padrão da enzima AChE ($71,43 \text{ mg mL}^{-1}$) solubilizada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) por 3 horas em banho termostatizado. Os biossensores utilizados no estudo foram elaborados na seguinte proporção em massa: 60% (m/m) NTC ou PG, e 20% (m/m) da enzima AChE e 20% (m/m) de óleo mineral. A Figura 22 mostra os voltamogramas da oxidação da tiocolina realizado pelos biossensores modificados.

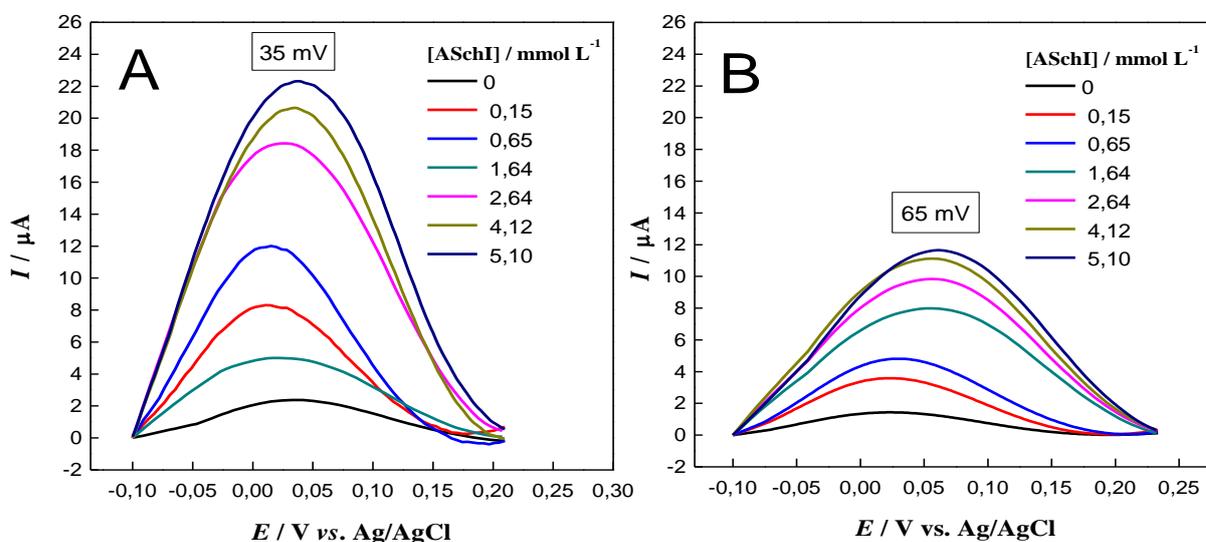


Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada do potencial de oxidação da tiocolina em função da concentração do substrato em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). (A) biossensor elaborado com NTC e (B) biossensor elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$.

Avaliando este último estudo, nota-se que o biossensor elaborado com nanotubos funcionalizados apresenta uma corrente de oxidação aproximadamente duas vezes maior e um potencial de trabalho 30 mV menos positivo do que o biossensor confeccionado com pó de grafite. Resultados semelhantes foram encontrados por Brito e colaboradores [101]. Estes autores fizeram uma comparação na oxi/redução do oxigênio entre o EPNTC e EPC, sendo que o EPNTC apresentou uma corrente de oxidação cerca de cinco vezes maior e um potencial de oxidação em regiões mais anódicas em relação ao EPC. Todos esses resultados

condizem, respectivamente, com a elevada área ativa e poder electrocatalítico dos NTC, o que certamente torna este sensor mais sensível na determinação de pesticidas.

Um estudo de cronoamperometria (Figura 23 e 24) foi realizado com os mesmos biossensores descritos acima (60% (m/m) NTC ou PG, e 20% (m/m) da enzima AChE e 20% (m/m) de óleo mineral) para determinar a influência de outras substâncias sobre a oxidação do substrato iodeto de acetiltiocolina. Sabe-se que a oxidação electroquímica do íon iodeto (I^-), utilizando eletrodos de pasta de carbono, ocorre em aproximadamente +600 mV [102, 103]. Esta oxidação do íon iodeto em solução é visível na corrente limite de difusão das Figuras 23B e 24B a partir do potencial aplicado de +350 mV.

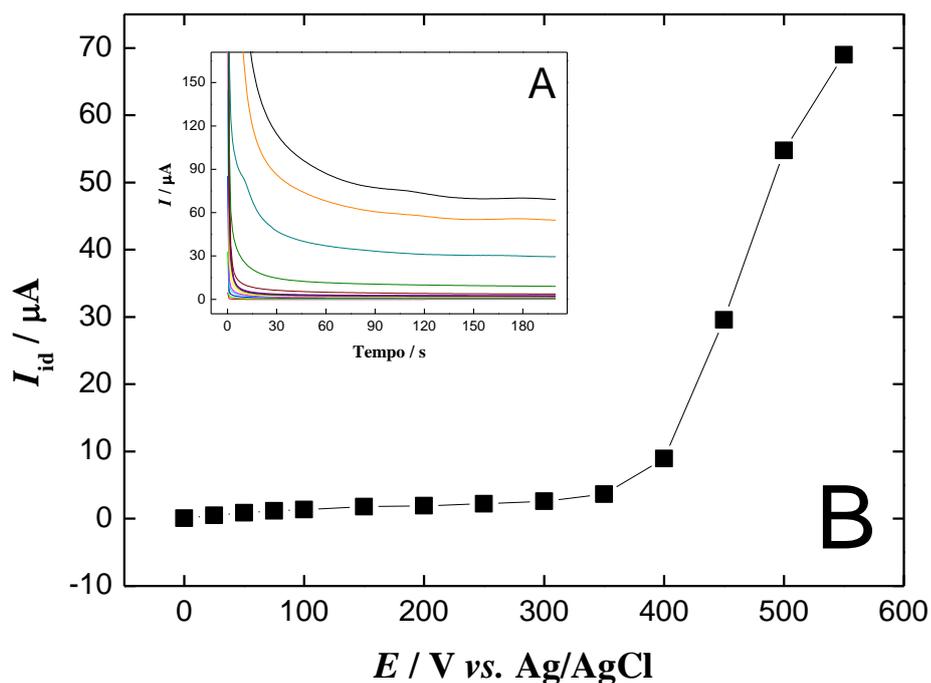


Figura 23: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 5,0 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0) num potencial de 0 a +550 mV aplicado (A). Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado no biossensor nanoestruturado (B).

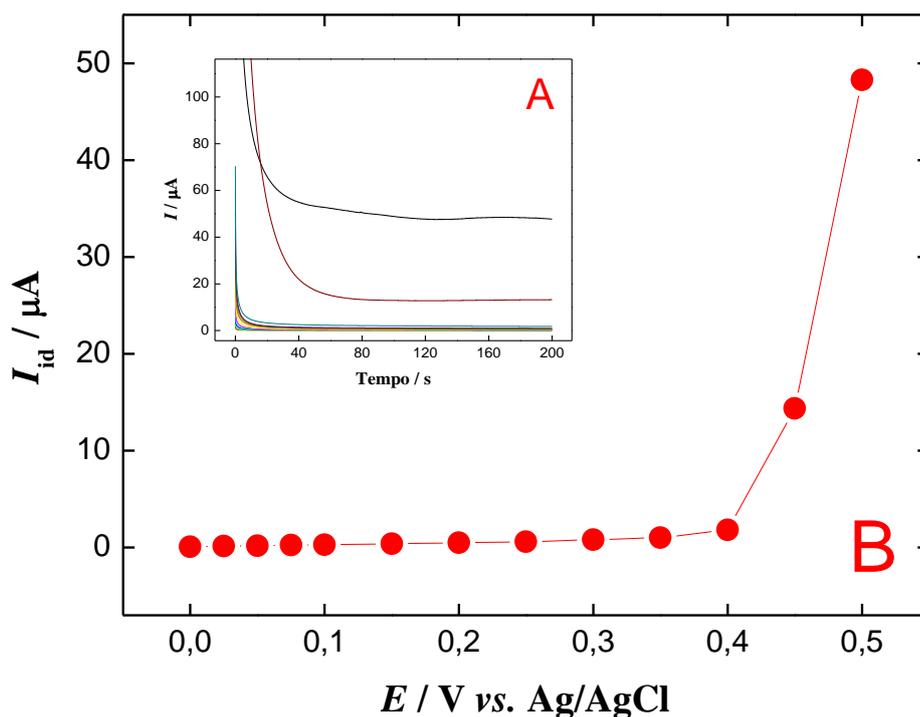


Figura 24: Cronoamperogramas de oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) num potencial de 0 a +550 mV aplicado (A). Correntes limites no tempo de 200 s em função do potencial aplicado no biossensor elaborado com PG (B).

Desse modo, têm-se uma faixa abrangente onde se pode escolher um potencial de trabalho mais adequado sem que haja a interferência da oxidação do íon iodeto (I⁻) na aplicação dos biossensores. Assim, o potencial de trabalho +300 mV foi escolhido como ideal para os biossensores quando estes forem submetidos ao processo de inibição enzimática no levantamento da curva analítica entre outros estudos.

4.5 Quantidade de Enzima nos Biossensores

A quantidade da enzima AChE imobilizada nos biossensores foi avaliada por SWV. A Figura 25 mostra o efeito da corrente de oxidação da tiocolina em função do aumento da quantidade de enzima AChE imobilizada dentro dos biossensores.

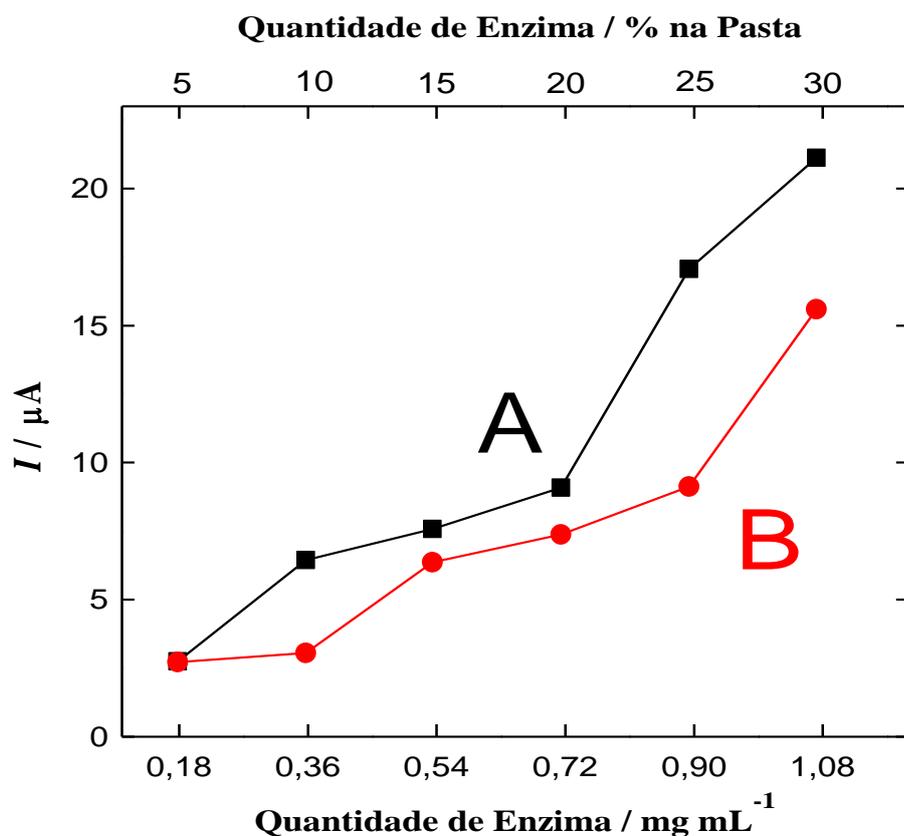


Figura 25: Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função da quantidade de enzima AChE imobilizada nos biossensores. Correntes obtidas por SWV em ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). (A) biossensor elaborado com NTC e (B) biossensor elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70$ Hz.

Observa-se que com o aumento da quantidade de enzima nos biossensores ocorre um aumento na corrente oxidativa da tiocolina, e a quantidade de AChE 0,893 mg mL⁻¹ ou 25% (m/m) de enzima na pasta, foi escolhida como adequada para os experimentos posteriores.

4.6 Efeito do pH

Na tentativa de encontrar o melhor pH no processo de oxidação da tiocolina, um estudo realizado por SWV analisou a corrente de pico anódica para os biossensores elaborados nos valores de pHs entre 5,0 e 9,0. De acordo com a Figura 26, observou-se uma diminuição da intensidade da corrente em função do aumento do pH da solução.

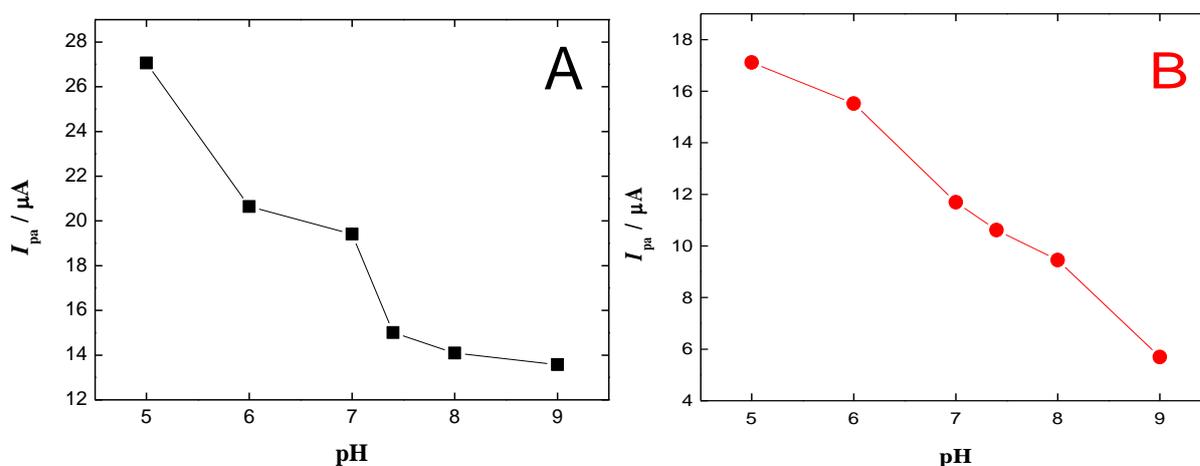


Figura 26: Efeito sobre a corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação do pH da solução do substrato ASChI $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). (A) biossensor (contendo 25 % AChE) elaborado com NTC e (B) biossensor (contendo 25 % AChE) elaborado com PG. Amplitude = 50 mV, $f = 70 \text{ Hz}$.

O fato observado na Figura acima foi relatado por Pandey e colaboradores [104]. Estes pesquisadores relataram que a hidrólise espontânea da ASChI depende do pH reacional, sendo que em meio ácido esta hidrólise não-enzimática do substrato é mais intensa, o que aumenta de forma errônea o sinal obtido.

O pH ótimo de uma enzima é relacionado com o valor de pKa dos aminoácidos presentes em seu sítio ativo. Os aminoácidos serina e histidina são responsáveis pelas reações de acilação e deacilação do substrato acetilcolina no sítio catalítico da AChE (Figura 10). Como o processo de catálise do substrato envolve a estabilização de cargas, um fator muito importante em estudos utilizando a AChE é o pKa do aminoácido histidina, que possui um

valor aproximado de 6,5 [44]. Em valores de pH próximo ao pH fisiológico (7,4) o grupo imidazol do aminoácido histidina pode captar ou liberar prótons do meio, sendo este um importante mecanismo na catálise do neurotransmissor acetilcolina. Desta forma, um valor de pH foi escolhido, sendo o pH 7,0 tido como ideal para estudos posteriores.

4.7 Efeito da Temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a corrente de oxidação da tiocolina, os biossensores foram submetidos na solução de ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) variando-se a temperatura de 20 à 60°C (Figura 27). Os experimentos de temperatura para os biossensores foram realizados no intuito de se avaliar a perda da atividade enzimática com o aumento de temperatura da solução contendo o substrato.

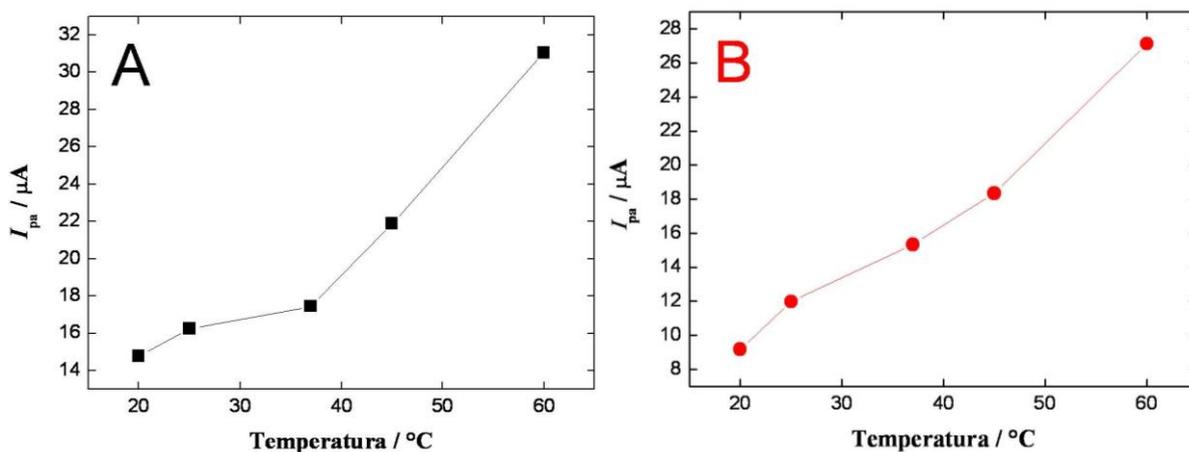


Figura 27: Efeito sobre a corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação da temperatura da solução do substrato ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0). (A) biossensor (contendo 25 % AChE) elaborado com NTC e (B) biossensor (contendo 25 % AChE) elaborado com PG. Estudo realizado por SWV. Amplitude = 50 mV, f = 70 Hz.

De acordo com a Figura 27, observou-se um aumento da intensidade de corrente em função do aumento da temperatura reacional. Apesar de que estudo anterior não apresentou uma diminuição da atividade enzimática com o aumento da temperatura da solução, sabe-se que elevadas temperaturas, principalmente quando o biossensor é submetido por longos períodos de análise, pode desnaturar a estrutura protéica da enzima, interferindo negativamente em sua atividade catalítica. Dessa forma, a temperatura de 37°C foi escolhida, pois é próxima da temperatura normal de operação da biomolécula no organismo.

4.8 Efeito do Glutaraldeído na Imobilização Enzimática

O glutaraldeído, 1,5 pentanodial, é um dos reagentes mais utilizados na imobilização de proteínas devido sua ligação covalente cruzada, “crosslinking”, fornecer uma ótima estabilidade térmica e química [105]. As principais espécies reativas envolvidas no processo de crosslinking são as formas monoméricas e poliméricas do glutaraldeído em equilíbrio [106,107]. A escolha da proporção AChE/glutaraldeído é muito importante na elaboração do biossensor, pois a insolubilidade e a estabilidade gerada pelo reticulador na enzima imobilizada deve resultar num mínimo de distorção sobre a estrutura conformacional da mesma, no intuito de preservar sua atividade catalítica. Desta forma, para o estudo do processo de reticulação polimérica sobre a enzima utilizou-se o glutaraldeído 0,1% em diferentes proporções na pasta de nanotubos de carbono e, utilizando a técnica de cronoamperometria, avaliou-se a corrente de oxidação da tiocolina catalizada pela AChE (Figura 28).

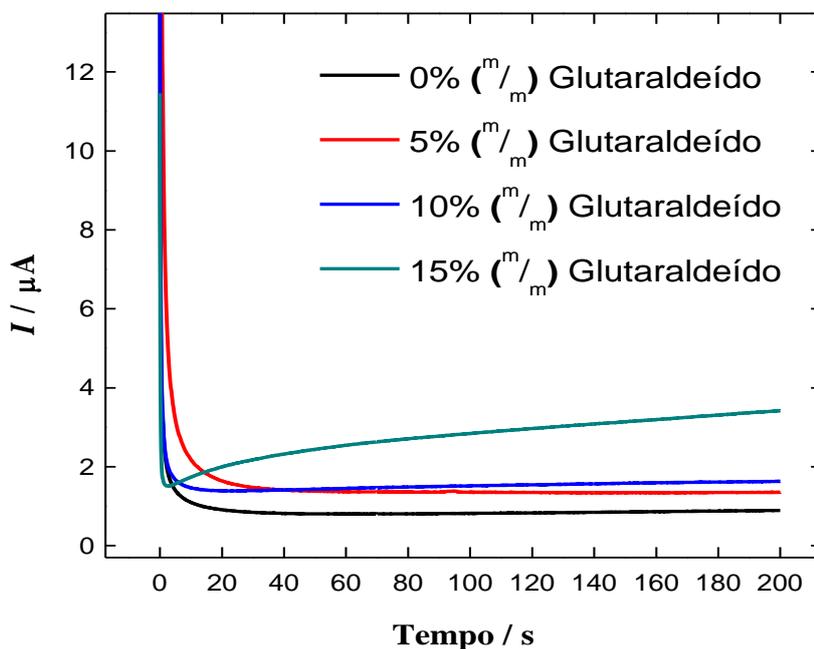


Figura 28: Cronoamperogramas da oxidação da tiocolina em solução do substrato ASChI 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) no potencial de +300 mV e tempo de 200 segundos, em função da porcentagem (m/m) de glutaraldeído 0,1% contido na pasta.

Pela análise da Figura acima, observou-se um aumento da corrente até a proporção de 10% (m/m) de glutaraldeído 0,1% no biossensor, sendo que acima deste ocorreu uma instabilidade na corrente medida, fato possivelmente relacionado com a elevada distorção e agregação da estrutura enzimática dentro da pasta de NTC [106]. Deste modo, a proporção de 10% (m/m) de glutaraldeído 0,1% na pasta dos biossensores foi mantida em estudos posteriores.

Voltamogramas cíclicos foram realizados para observar o efeito do glutaraldeído na corrente capacitiva do biossensor. A Figura 29 fornece o voltamograma cíclico do EPNTC (proporção de 80% (m/m) de NTC e 20% (m/m) de Nujol[®]) sem a presença da enzima AChE.

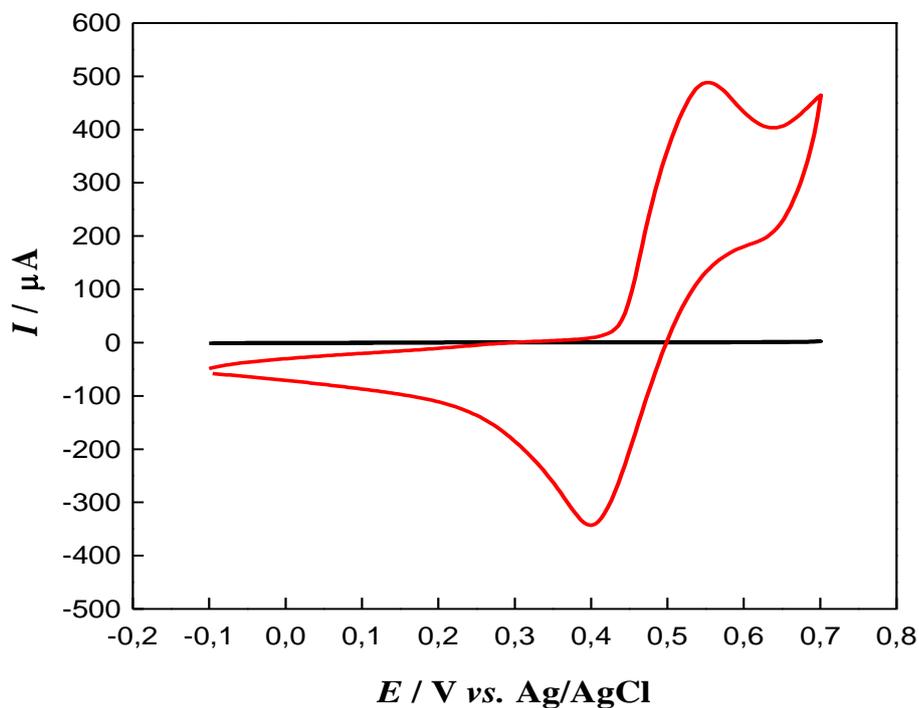


Figura 29: Voltamogramas cíclicos do EPNTC em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (—) e na solução contendo 5,0 mmol L⁻¹ de ASChI (—). T = 37°C; ν = 100 mV.

A presença de 25% (^m/_m) da enzima AChE na pasta do biossensor elaborado com NTC gerou um aumento na corrente capacitiva e na distorção no perfil voltamétrico do biossensor (Figura 30A). No entanto, quando o mesmo biossensor foi elaborado com 10% (^m/_m) de glutaraldeído 0,1% (Figura 30B), ocorreu uma significativa diminuição em sua corrente capacitiva. Desta forma, torna-se evidente que o glutaraldeído possui um importante papel na elaboração do biossensor, tanto na imobilização e estabilidade da enzima quanto na diminuição da corrente capacitiva do mesmo.

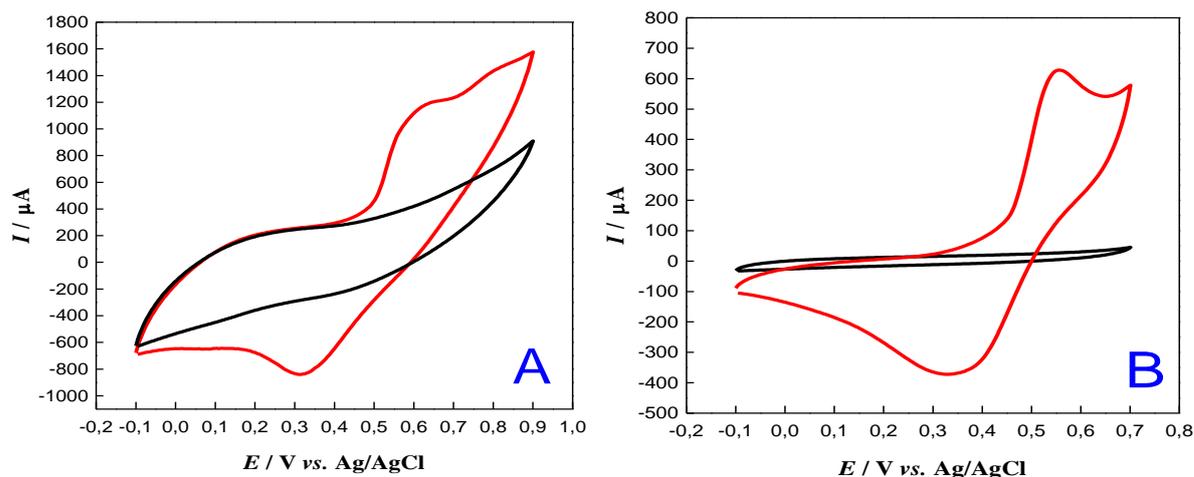


Figura 30: Voltamogramas cíclicos do biossensor elaborado com NTC em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (—) e contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ASChI (—). **(A)** biossensor (contendo 25 % (m/m) de AChE) elaborado com NTC e **(B)** biossensor (contendo 25 % (m/m) de AChE) elaborado com NTC na presença de 10% (m/m) de glutaraldeído 0,1% na pasta. $T = 37^\circ\text{C}$; $v = 100 \text{ mV}$.

O tipo e a forma de ligação que o reagente glutaraldeído exerce nas estruturas enzimáticas são bastante difundidos no meio científico [106]. Okuda e colaboradores [107] relataram que o glutaraldeído reage com grupos tióis apenas na presença de amins primárias e sua reação ocorre reversivelmente com grupamentos amino numa ampla faixa de pH ($\geq \text{pH } 3,0$) exceto entre o pH 7,0 e 9,0 onde a reação é praticamente irreversível, dada à pequena reversibilidade observada.

A enzima acetilcolinesterase possui, além das cadeias laterais de aminoácidos, a tríade dos aminoácidos serina, histidina (sítio catalítico) e glutamato (sítio aniônico) localizados em seu sítio ativo. Como a maioria das enzimas, a AChE também possui resíduos do aminoácido lisina em sua superfície. Estes resíduos de lisina geralmente não estão envolvidos no sítio catalítico das enzimas e as ligações covalentes cruzadas moderadas ocorrem entre o grupamento amino destes resíduos e o glutaraldeído, o que preserva conformação protéica das enzimas [108] e a atividade biológica destas [109].

O biossensor anterior foi confeccionado na proporção de 45% (^m/_m) de NTC, 20% (^m/_m) de óleo aglutinante Nujol[®], 25% (^m/_m) da enzima AChE e 10% (^m/_m) de glutaraldeído 0,1% na pasta, sendo denominado EPNTC-AChE. Quando este mesmo biossensor foi elaborado utilizando pó de grafite como suporte, obteve a denominação de EPC-AChE.

4.9 Repetibilidade e Reprodutibilidade dos Biossensores

As medidas de repetibilidade foram feitas de maneira consecutiva na mesma solução do substrato. As medidas de reprodutibilidade foram feitas em dias diferentes, preparando-se novamente todo o sistema eletroquímico. Estas medidas de repetibilidade e reprodutibilidade foram feitas com seis biossensores (n = 6) em solução do substrato ASChI 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por cronoamperometria num tempo de 210 segundos onde calculou-se a média e o desvio padrão. O desvio padrão relativo dos biossensores preparados na ausência e na presença de 10% (^m/_m) de glutaraldeído 0,1% está indicado na Tabela 4:

Tabela 4: Desvio Padrão Relativo (D.P.R) do EPNTC-AChE e do EPC-AChE na ausência e na presença de 10% (^m/_m) de glutaraldeído 0,1%.

Parâmetro	EPC-AChE (D.P.R)/%	EPNTC-AChE (D.P.R)/%
Repetibilidade	3,97	3,18
Reprodutibilidade	10,4	8,93
Repetibilidade com Glutaraldeído 10%	2,44	1,17
Reprodutibilidade com Glutaraldeído 10%	6,60	4,13

Analisando a Tabela 4, observa-se a importância da utilização do glutaraldeído na elaboração dos EPC e dos EPNTC modificados com a enzima AChE. Além de diminuir o efeito capacitivo dos biossensores (seção 4.8), as ligações covalentes cruzadas realizadas pelo glutaraldeído revelaram uma ótima imobilização e estabilização estrutural da AChE contida na pasta, melhorando significativamente a repetibilidade e a reprodutibilidade dos biossensores. Desta forma, torna-se indispensável à utilização do agente amino-reativo na fabricação dos biossensores eletroquímicos estudados.

4.10 Tempo de Vida dos Biossensores

As medidas do tempo de vida do eletrodo (tempo que o mesmo pode ser estocado sem perda da atividade) foram realizadas por cronoamperometria com cada biossensor, os quais foram estocados em congelador (aproximadamente $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). As correntes limite de difusão dos biossensores em função do tempo de estocagem destes estão indicadas na Figura 31.

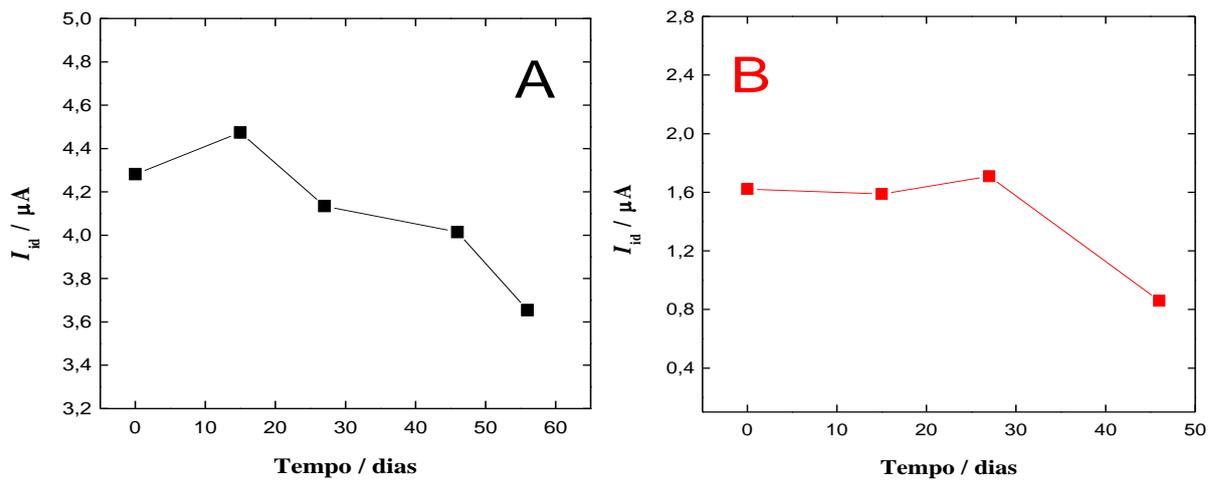


Figura 31: Efeito na corrente limite de difusão em função do tempo de estocagem do EPNTC-AChE (A) e do EPC-AChE (B) em um congelador. Medida realizada em solução 5,0 mmol L⁻¹ de ASChI em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) à 37°C. Potencial = +300 mV e tempo de 210 segundos.

O EPNTC-AChE e o EPC-AChE apresentaram um sinal eletroquímico confiável até o período de 45 e 30 dias de estocagem, respectivamente. Acima destes períodos, uma perda de mais de 10% da corrente original foi observada nos eletrodos, sendo resultado de uma instabilidade na conformação enzimática imobilizada nas pastas de carbono e de nanotubos de carbono elaboradas.

Os biossensores elaborados podem ser utilizados em medidas eletroquímicas até o período limite de estocagem para cada eletrodo. Quando utilizado para determinações, os biossensores são usados no levantamento de várias curvas analíticas até que a quantidade de pasta seja totalmente utilizada por meio das renovações da superfície eletródica.

4.11 Determinações de Pesticidas da Classe dos Carbamatos

4.11.1 Tempo de Incubação

O tempo de permanência dos biossensores em solução dos pesticidas é um importante parâmetro frente à determinação de pesticidas por inibição enzimática. A Figura 32 mostra o efeito na porcentagem de inibição (%I) da AChE em função do tempo de incubação em solução de carbaril $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o EPNTC-AChE (A) e EPC-AChE (B). A Figura 33 fornece o mesmo estudo anterior, porém utilizando o pesticida metomil $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução. As análises cronoamperométricas foram feitas numa solução contendo $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI (valor da constante de Michaelis-Menten e a concentração de substrato normalmente encontrada *in vivo* na enzima AChE [41]) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) à 37°C juntamente com os pesticidas, num potencial de $+300 \text{ mV}$ aplicado.

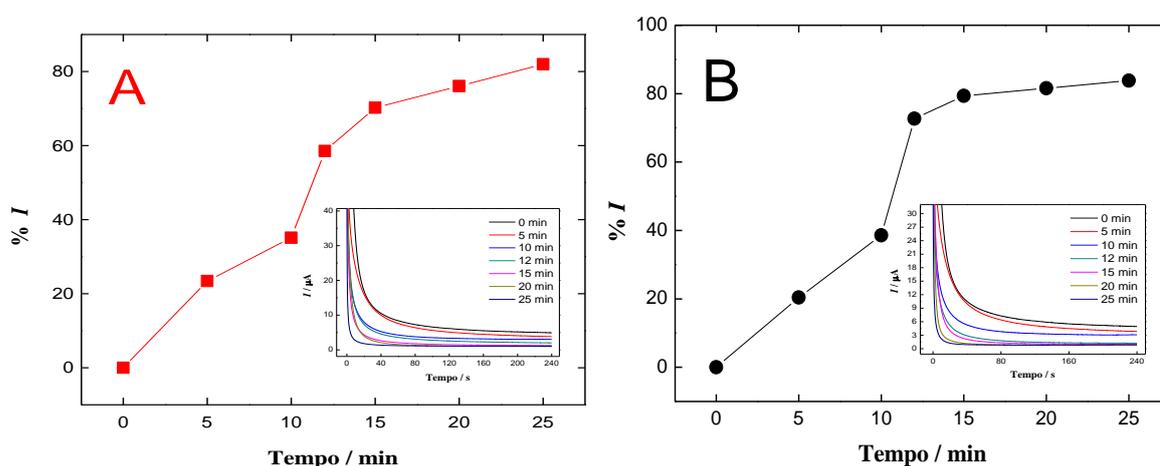


Figura 32: Porcentagem de inibição da enzima em relação ao tempo de permanência dos biossensores EPC-AChE (A) e EPNTC-AChE (B) em solução $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril. Inserção: Cronoamperogramas do processo de inibição enzimática causado pelo pesticida carbaril, obtidos num potencial de $+300 \text{ mV}$ em 210 segundos.

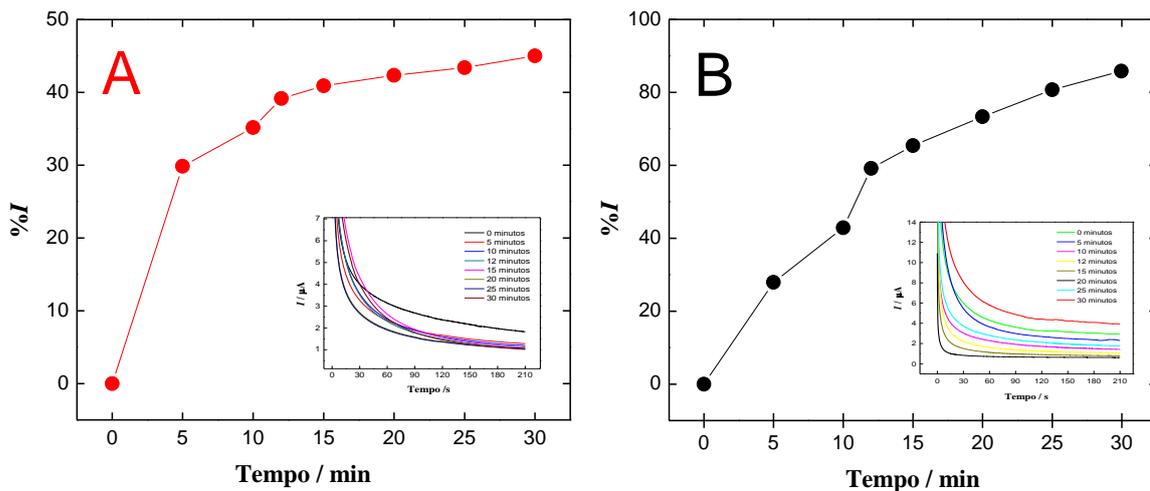


Figura 33: Porcentagem de inibição da enzima em relação ao tempo de permanência dos biossensores EPC-AChE (A) e EPNTC-AChE (B) em solução $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metomid. Inserção: Cronoamperogramas do processo de inibição enzimática causado pelo pesticida metomid, obtidos num potencial de +300 mV em 210 segundos.

Observando as Figuras 32 e 33 podemos notar, principalmente nos biossensores submetidos em solução do pesticida carbaril (Figura 32), que houve um aumento da corrente de porcentagem de inibição até o tempo de 15 minutos, sendo que a partir deste tempo as correntes tendem a se estabilizarem. Desse modo, considerando a %I obtida e o tempo analítico em questão, optou-se por trabalhar com um tempo de incubação de 12 minutos no levantamento das curvas analíticas.

4.11.2 Curvas Analíticas

4.11.2.1 Determinação do Pesticida Carbaril

As Figuras 34A e 35A apresentam os cronoamperogramas dos EPNTC-AChE e EPC-AChE obtidos em um tempo de incubação de 12 minutos sob diferentes concentrações de

carbaril, respectivamente. As Figuras 34B e 35B apresentam a curva analítica da porcentagem de inibição em função da concentração do pesticida para o EPNTC-AChE e EPC-AChE, respectivamente. As curvas analíticas para este pesticida foram obtidas pelo processo de inibição enzimática numa mesma superfície eletrodica, não havendo renovações desta entre as medidas realizadas.

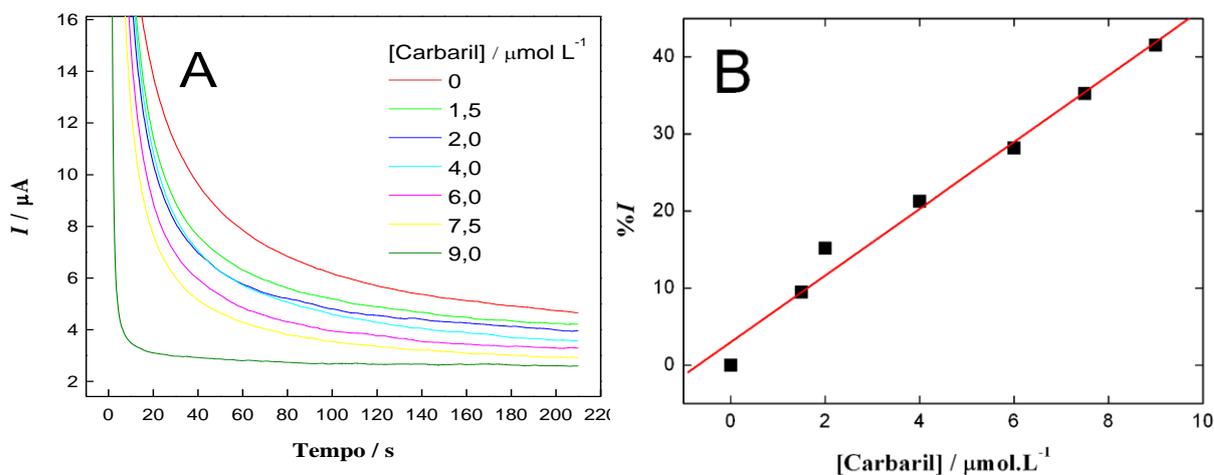


Figura 34: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L⁻¹. T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L⁻¹ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L⁻¹ de ASChI.

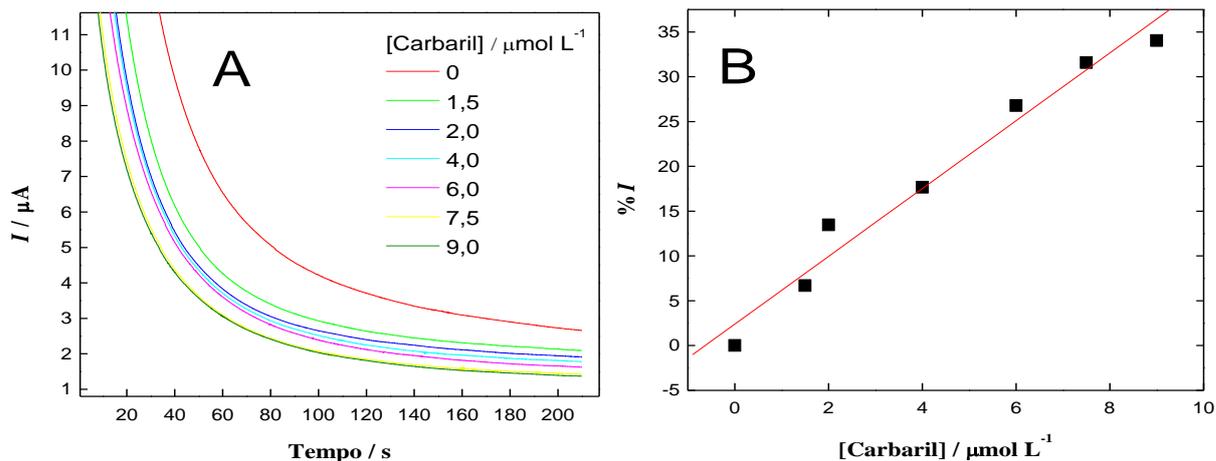


Figura 35: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPC-AChE para diferentes concentrações de carbaril em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). $[\text{ASChI}] = 85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o carbaril em concentrações de 1,5 a $9,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI.

O desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos (S_B), o coeficiente de linearidade (R), a inclinação da reta ($\text{tg}\theta$), o desvio padrão da reta (SD) e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos biossensores confeccionados estão indicados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas dos biossensores para o carbaril.

Eletrodo	Inclinação ($\text{tg}\theta$)	SD	n	R	S_B (μA)	Limite de Detecção (LD) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de Quantificação (LQ) / $\mu\text{mol L}^{-1}$
EPC	3,78514	2,4237	7	0,99503	0,0491	0,0389	0,1297
EPNTC	4,33310	2,15847	7	0,99986	0,0235	0,0163	0,0542

Analisando a Tabela acima, na determinação do pesticida carbaril o EPNTC-AChE apresentou uma maior sensibilidade e um limite de detecção e de quantificação aproximadamente 2,4 vezes menor quando comparado ao EPC-AChE.

4.11.2.2 Determinação do Pesticida Metomil

As Figuras 36A e 37A apresentam os cronoamperogramas dos EPNTC-AChE e EPC-AChE obtidos em um tempo de incubação de 12 minutos sob diferentes concentrações de metomil, respectivamente. As Figuras 36B e 37B apresentam a curva analítica da porcentagem de inibição em função da concentração do pesticida para o EPNTC-AChE e EPC-AChE, respectivamente. As curvas analíticas para este pesticida foram obtidas pelo processo de inibição enzimática numa mesma superfície eletródica, não havendo renovações desta entre as medidas realizadas.

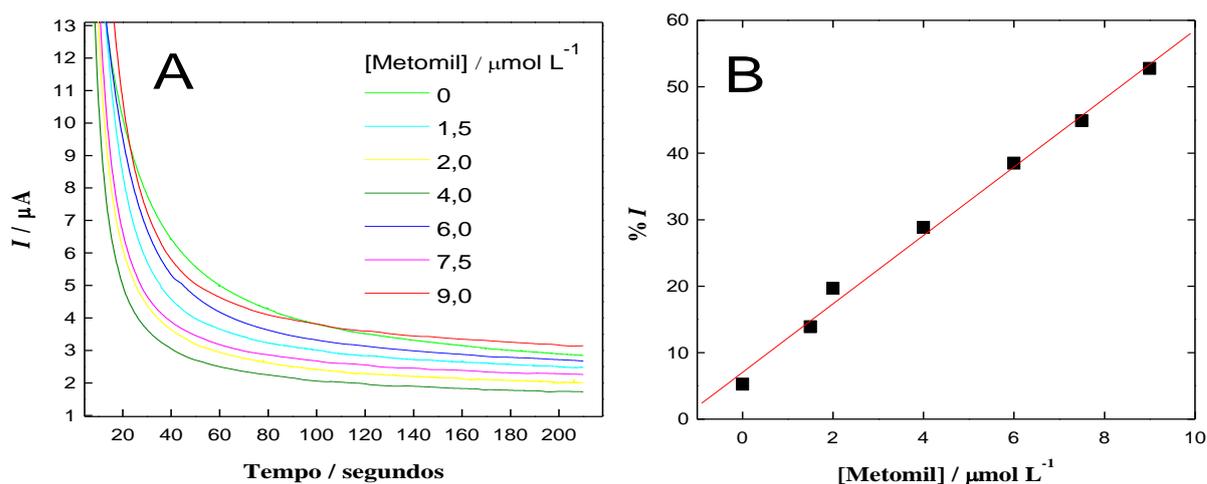


Figura 36: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de metomil em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). [ASChI] = $85 \mu\text{mol L}^{-1}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o metomil em concentrações de 1,5 a $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metomil em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI.

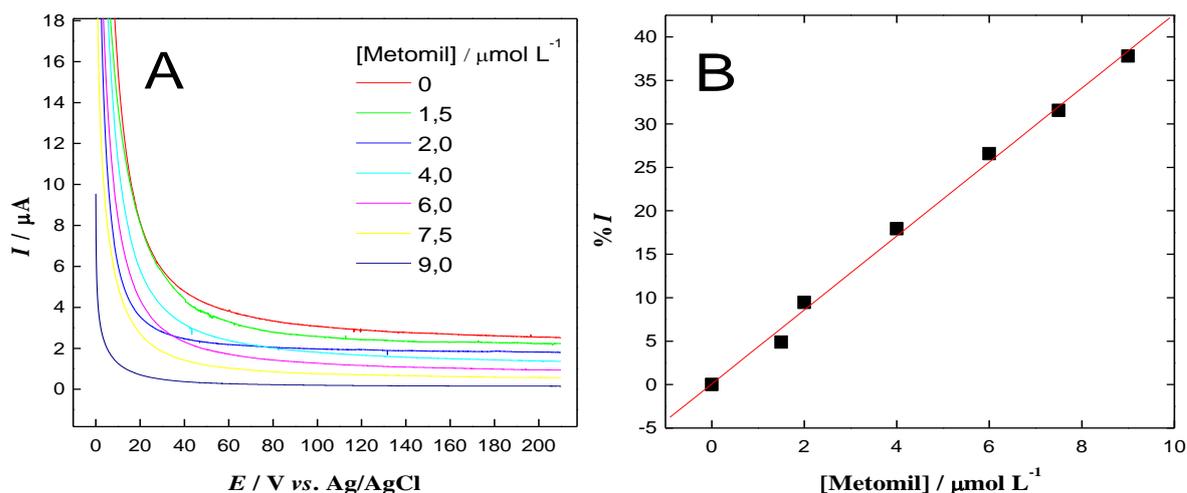


Figura 37: (A) Resposta amperométrica do biossensor EPNTC-AChE para diferentes concentrações de metomid em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). [ASChI] = 85 μmol L⁻¹. T = 37°C. Potencial de +300 mV num tempo de 210 segundos. (B) Curva analítica para o metomid em concentrações de 1,5 a 9,0 μmol L⁻¹ de metomid em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 85 μmol L⁻¹ de ASChI.

O desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos (S_B), o coeficiente de linearidade (R), a inclinação da reta ($\text{tg}\theta$), o desvio padrão da reta (SD) e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos biossensores confeccionados estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas dos biossensores para o metomid.

Eletrodo	Inclinação ($\text{tg}\theta$)	SD	n	R	S_B (μA)	Limite de Detecção (LD) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de Quantificação (LQ) / $\mu\text{mol L}^{-1}$
EPC	4,2567	1,0330	7	0,99871	0,0563	0,0398	0,1323
EPNTC	5,1507	1,5584	7	0,99660	0,0143	0,0083	0,0277

Analisando a Tabela 6, na determinação do pesticida metomil o EPNTC-AChE apresentou uma melhor sensibilidade e um limite de detecção e de quantificação aproximadamente cinco vezes menor quando comparado ao EPC-AChE. Estes resultados condizem com os estudos de Chicharo e colaboradores [40] que utilizaram e compararam o EPC e o EPNTC na determinação de alguns neurotransmissores e outras substâncias. O melhor desempenho dos EPNTC em relação aos EPC tem sido relatado por diversos outros autores [37-39, 101].

Outro parâmetro também observado foi que, em ambos biossensores, a porcentagem de inibição (%*I*) foi maior quando estes foram utilizados na determinação do pesticida metomil. A Tabela 7 fornece os valores da porcentagem de inibição (%*I*) das curvas analíticas dos biossensores confeccionados para a determinação dos pesticidas carbaril e metomil.

Tabela 7: Valores da porcentagem de inibição (%*I*) das curvas analíticas dos biossensores confeccionados na determinação de carbaril e metomil.

Pesticida	Porcentagem de Inibição dos biossensores / %	
	EPNTC-AChE	EPC-AChE
Carbaril	41,50	34,03
Metomil	59,62	37,81

Entre os pesticidas metomil e carbaril, uma diminuição de 1,81% e 3,78% foi obtida no processo de inibição enzimática para o EPNTC-AChE e o EPC-AChE, respectivamente.

Por ser um carbamato de classe toxicológica I (extremamente tóxico), o efeito inibidor do metomil no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase ocorre de forma mais drástica, sendo que a reversibilidade competitiva com o substrato ASChI é mais favorável à este pesticida quando

comparada ao pesticida carbaril, que possui uma classe toxicológica II (altamente tóxico). As propriedades físico-químicas inerentes aos NTC, juntamente o aspecto toxicológico do pesticida metomil, foram responsáveis pelos menores LD e LQ do EPNTC-AChE na determinação dos pesticidas da classe dos carbamatos.

4.11.2.3 Determinação do Pesticida Carbaril em Matriz Fluvial

No intuito de avaliar a interferência de diferentes matrizes na sensibilidade e resposta analítica do biossensor EPNTC-AChE, uma curva analítica para o carbaril foi levantada com este sensor em solução de amostra de água de rio. Para dinamizar as determinações, esta curva foi obtida através da inibição da AChE em função do aumento da [carbaril] numa mesma solução. A quantidade de tiocolina foi cronoamperometricamente mensurada em cada inibição obtida num potencial de +300 mV em 210 segundos. As concentrações do pesticida carbaril utilizadas foram idênticas às da seção 4.11.1.

A curva analítica do biossensor EPNTC-AChE elaborada com amostra de água de rio (ou água fluvial - A.F) está indicado na Figura 38A. A Figura 38B fornece as inclinações das curvas analíticas do EPNTC-AChE elaborado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI em diferentes concentrações do pesticida carbaril à 37°C (—) e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), elaborado com amostra fluvial, contendo $85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI em diferentes concentrações do pesticida carbaril à 37°C (—).

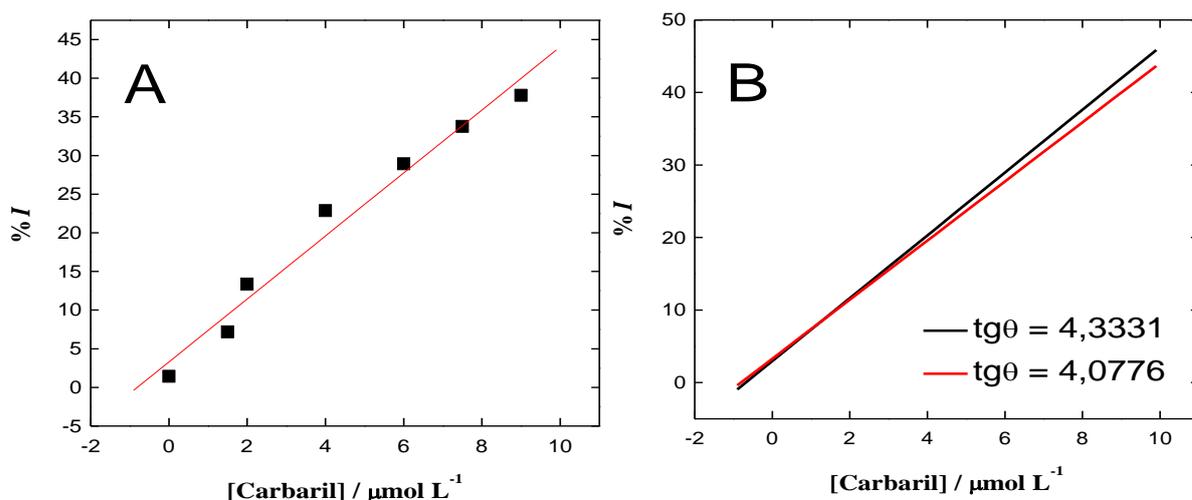


Figura 38: (A) Curva analítica do EPNTC-AChE em concentrações de 1,5 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaril em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI. $T = 37^\circ\text{C}$. (B) Efeito na diminuição da inclinação da reta (sensibilidade) quando a curva analítica do biossensor EPNTC-AChE foi elaborada em tampão fosfato (—) e em tampão fosfato preparado com amostra de água de rio (—).

Uma diminuição de 0,255 $\%I/\mu\text{mol L}^{-1}$ é observada na sensibilidade do método na determinação do pesticida carbaril com o EPNTC-AChE em tampão fosfato elaborado com a amostra fluvial. Este fato é possivelmente relacionado com a presença de grandes moléculas orgânicas existentes em águas de matrizes fluviais, os chamados ácidos húmicos (A.H). Por possuírem grandes cadeias carbônicas, estas substâncias podem obstruir a superfície do biossensor eletroquímico, interferindo negativamente tanto no processo de inibição pelo pesticida quanto na tiocolina enzimaticamente gerada na superfície eletródica.

Para avaliar o efeito passivador dos ácidos húmicos sobre a superfície do biossensor, outra curva analítica foi elaborada com o EPNTC-AChE em tampão fosfato contendo, além das concentrações do substrato e carbaril anteriormente descritas, uma concentração conhecida de ácido húmico extraído de turfa [108] na cela eletroquímica (Figura 39).

A Figura 39 compara as três inclinações das curvas analíticas do biossensor EPNTC-AChE: realizada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI em diferentes concentrações do pesticida carbaril à 37°C (—), em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH

7,0), elaborado com água de rio, contendo $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI em diferentes concentrações do pesticida carbaril à 37°C (—) e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASChI e $7,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido húmico extraído de turfa em diferentes concentrações do pesticida carbaril à 37°C (—).

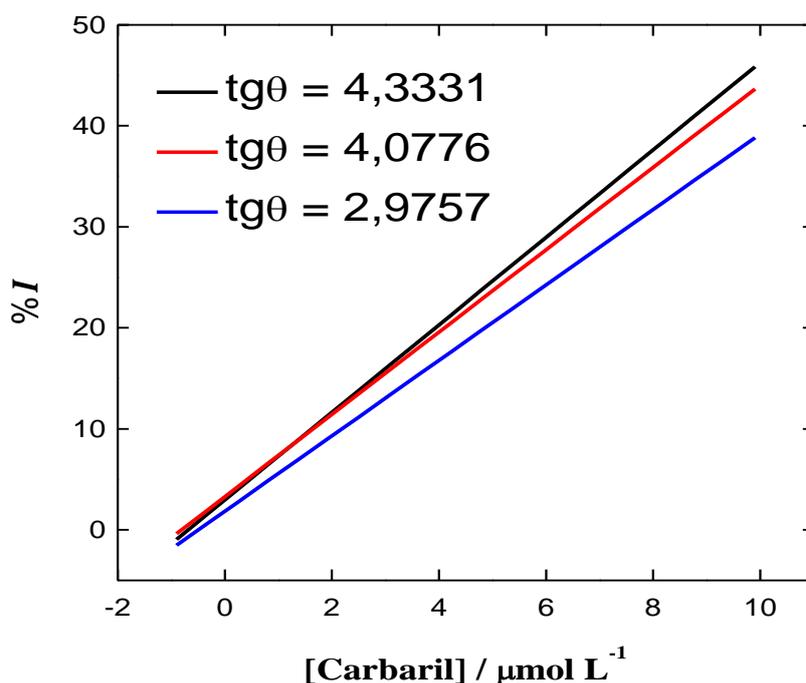


Figura 39: Efeito na inclinação da reta (sensibilidade) quando as curvas analíticas do biossensor EPNTC-AChE foram elaboradas em tampão fosfato (—), em tampão fosfato preparado com amostra de água de rio (—) e em tampão fosfato contendo uma concentração de $7,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido húmico extraído de turfa (—).

Quando o EPNTC-AChE foi submetido na determinação do pesticida carbaril em amostras fluviais contendo uma concentração conhecida de ácido húmico sua sensibilidade foi diminuída e, conseqüentemente, sua porcentagem de inibição (Figura 39). Esta diminuição da inclinação da reta e sensibilidade do método está relacionada com a elevada quantidade de ácidos húmicos presente nas matrizes aquáticas estudadas.

A Tabela 8 fornece o desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos (S_B), o coeficiente de linearidade (R), a inclinação da reta ($\text{tg}\theta$), o desvio padrão da reta (SD) e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) das curvas analíticas utilizando o biossensor EPNTC-AChE confeccionado na determinação do carbaril em A.F e A.H.

Tabela 8: Valores dos parâmetros eletródicos das curvas analíticas do biossensor EPNTC-AChE na determinação de carbaril elaborado em amostra fluvial (A.F) e na presença de ácido húmicos (A.H).

EPNTC-AChE	Inclinação ($\text{tg}\theta$)	SD	n	R	S_B (μA)	Limite de Detecção (LD) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de Quantificação (LQ) / $\mu\text{mol L}^{-1}$
A.F	4,0776	2,4069	7	0,98723	0,0982	0,0722	0,2410
A.H	2,9757	1,6532	7	0,99237	0,0698	0,0704	0,2345

A interferência negativa das matrizes utilizadas na sensibilidade e no LD e LQ do EPNTC-AChE frente à determinação de carbaril foi observada. Em comparação com o biossensor EPNTC-AChE utilizado apenas em tampão fosfato, o LD e o LQ das curvas diminuíram de aproximadamente 4,3 e 1,85 vezes no procedimento utilizando A.H e A.F, respectivamente. Dessa forma, o efeito da matriz sobre na diminuição da sensibilidade do método foi confirmado.

5. CONCLUSÃO

Biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono de parede múltipla modificados com a enzima acetilcolinesterase foram desenvolvidos e utilizados na determinação dos pesticidas carbaril e metomil em água destilada e amostra fluvial.

A atividade eletrocatalítica dos NTC promoveu um aumento na detecção eletroquímica do produto tiocolina enzimaticamente gerado, incluindo um baixo potencial de oxidação (+35 mV) e uma corrente de oxidação duas vezes maior em relação ao EPC.

Em virtude das suas ligações covalentes cruzadas realizadas no processo de imobilização enzimática dentro das pastas confeccionadas, o reagente glutaraldeído mostrou-se indispensável para a elaboração dos biossensores, pois forneceu uma diminuição no efeito da corrente capacitiva e no desvio padrão relativo dos processos de repetibilidade e reprodutibilidade destes eletrodos.

Os biossensores de pasta confeccionados puderam ser utilizados na determinação de várias curvas analíticas, apresentando uma reprodutibilidade aceitável.

O biossensor elaborado com os nanotubos funcionalizados apresentou melhor desempenho na determinação dos pesticidas carbaril (LD 2,4 vezes menor) e metomil (LD 5 vezes menor) em relação ao biossensor de pasta de carbono. A elevada área ativa e capacidade eletrocatalítica dos NTC favoreceram o EPNTC-AChE na determinação dos pesticidas da classe dos carbamatos. Desse modo, torna-se evidente que a utilização dos NTC funcionalizados contribuiu em termos sinal analítico e sensibilidade para biossensor enzimático em questão, gerando os menores LD e LQ relatados.

Os biossensores confeccionados podem ser utilizados na determinação qualitativa de pesticidas inibidores da enzima AChE. A utilização de outros óleos aglutinantes e métodos de funcionalização nos NTC podem fornecer melhores desempenhos eletroquímicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ULAKHOVICH, N.A.; MEDYANTSEVA, E.P.; BUDNIKOV, G.K. Carbon-paste electrode as a sensor in voltammetric analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 48, p. 682-694, 1993.
- [2] ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576-1577, 1958.
- [3] KUWANA, T.; FRENCH, W.G. Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solutions using carbon paste electrode. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 241-242, 1964.
- [4] ŠVANCARA, I.; WALCARIUS, A.; KALCHER, K.; VYTRÁS, K. Carbon paste electrodes in the new millennium. **Central European Journal of Chemistry**, v. 7, p. 598-656, 2009.
- [5] BARROSO, M.F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; TUÑÓN-BLANCO, P. DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2396-2401, 2011.
- [6] DE LIMA, F.; GOZZI, F.; FIORUCCI, A.R.; CARDOSO, C.A.L.; ARRUDA, G.J.; FERREIRA, V.S. Determination of linuron in water and vegetable samples using stripping voltammetry with a carbon paste electrode. **Talanta**, v. 83, p. 1763-1768, 2011.
- [7] MAZLOUM-ARDAKANI, M.; RAJABI, H.; MIRJALILI, B.B.F.; BEITOLLAHI, H.; AKBARI, A. Nanomolar determination of hydrazine by TiO₂ nanoparticles modified carbon paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemical**, v. 14, p. 2285-2292, 2010.
- [8] GANJALI, M.R.; ASGARI, M.; FARIDBOD, F.; NOROUZI, P.; BADIEI, A.; GHOLAMI, J. Thiomorpholine-functionalized nanoporous mesopore as a sensing material for Cd²⁺ carbon paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemical**, v. 14, p. 1359-1366, 2010.
- [9] MORANTE-ZARCERO, S.; SÁNCHEZ, A.; FAJARDO, M.; DEL HIERRO, I.; SIERRA, I. Voltammetric analysis of Pb(II) in natural waters using a carbon paste electrode modified with 5-mercapto-1-methyltetrazol grafted on hexagonal mesoporous silica. **Microchimica Acta**, v. 169, p. 57-64, 2010.

- [10] LIU, Y.; HUANG, J.; WANG, D.; HOU, H.; YOU, T. Electrochemical determination of oxalic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofiber modified electrode. **Analytical Methods**, v. 2, p. 855-859, 2010.
- [11] MARCOLINO JUNIOR, LUIZ H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico**. 2007. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- [12] MARTINEZ, M.T.; LIMA, A.S.; BOCCHI, N.; TEIXEIRA, M.F.S. Voltammetric performance and application of a sensor for sodium ions constructed with layered birnessite-type manganese oxide. **Talanta**, v. 80, p. 519-525, 2009.
- [13] DRAGUNSKI, JOSIANE, C. **Desenvolvimento e aplicações de eletrodos modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas em alimentos**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [14] SOUZA FILHO, A.G.; FAGAN, S.B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, p. 1695-1703, 2007.
- [15] KROTO, H.W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162-163, 1985.
- [16] IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- [17] MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 826-838, 2005.
- [18] HAMADA, N.; SAWADA, S.; OSHIYAMA, A. New one-dimensional conductors graphitic microtubules. **Physical Review Letters**, v. 68, p. 1579-1581, 1992.
- [19] AJAYAN, P. M. Nanotubes from carbon. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 1787-1800, 1999.
- [20] THESS, A.; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H. J.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C. H.; LEE, Y. H.; KIM, S. G.; RINZLER, A. G.; COLBERT, D. T.; SCUSERIA, G. E.; TOMANEK, D.; FISCHER, J. E.; SMALLEY, R. E. Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. **Science**, v. 273, p. 483-487, 1996.

- [21] ODOM, T. W.; HUANG, J. L.; KIM, P.; LIEBER, C. M. Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. **Nature**, v. 391, p. 62-64, 1998.
- [22] RAO, A. M.; RICHTER, E.; BANDOW, S.; CHASE, B.; EKLUND, P. C.; WILLIAMS, K. W.; FANG, S.; SUBBASWAMY, K. R.; MENON, M.; THESS, A.; SMALLEY, R. E.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. Diameter-selective raman scattering from vibrational modes in carbon nanotubes. **Science**, v. 275, p. 187-190, 1997.
- [23] SAITO, R.; FUJITA, M.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. Electronic structure of chiral graphene tubules. **Applied Physics Letters**, v. 60, p. 2204-2206, 1992.
- [24] PARADISE, M.; GOSWANI, T. Carbon nanotubes – production and industrial applications. **Materials & Design**, v. 28, p. 1477-1489, 2007.
- [25] FU, K. F.; HUANG, W. J.; LIN, Y.; ZHANG, D. H.; HANKS, T. W.; RAO A. M.; SUN, Y. P. Nanotube functionalization. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v. 2, p. 457-461, 2002.
- [26] KONG, J.; FRANKLIN, N. R.; ZHOU, C.; CHAPLINE, M. G.; PENG, S.; CHO K.; DAI, H. Nanotubes molecular wires as chemical sensors. **Science**, v. 287, p. 622-625, 2000.
- [27] SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, O. N.; TALAPATRA, S.; VAJTAI, R.; AJAYAN, P. M. Carbon nanotube filters. **Nature Materials**, v. 3, p. 610-614, 2004.
- [28] LEHN, J.M. **Supramolecular chemistry: concepts and perspectives**. Weinheim: VCH, 1995. p. 86.
- [29] DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. **Carbon nanotubes: synthesis, structure, properties and applications**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. p. 128. (Topics in Applied Physics, 80).
- [30] KESKAR, G.; RAO, R.; LUO, J.; HUDSON, J.; CHEN, J.; RAO, A. M. Growth, nitrogen doping and characterization of isolated single-wall carbon nanotubes using liquid precursors. **Chemical Physical Letters**, v. 412, p. 269-273, 2005.
- [31] MCGUIRE, K.; GOTHARD, N.; GAI, P. L.; DRESSELHAUS, M. S.; SUMANASEKERA, G.; RAO, A. M. Synthesis and raman characterization of boron-doped single-walled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 43, p. 219-227, 2005.

[32] TERRONES, M.; GROBERT, N.; TERRONES, H. Synthetic routes to nanoscale B_xC_yN_z architectures. **Carbon**, v. 40, p. 1665-1684, 2002.

[33] BANERJEE, S.; HEMRAJ-BENNY, T.; WONG, S.S. Covalent surface chemistry of single-walled carbon nanotubes. **Advanced Materials**, v. 17, p. 17-29, 2005.

[34] MASHETER, A. T.; ABIMAN, P.; WILDGOOSE, G. G.; WONG, E.; XIAO, L.; REES, N. V.; TAYLOR, R.; ATTARD, G. A.; GARY, A.; BARON, R.; CROSSLEY, A.; JONES, J. H. & COMPTON, R. G. Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pK_a values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 2616-2626, 2007.

[35] TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 480-489, 2006.

[36] ZHAO, Q.; GAN, Z.; ZHUANG, Q. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Electroanalysis**, v. 14, p. 1609-1613, 2002.

[37] RUBIANES, M.D.; RIVAS, G.A. Carbon nanotubes paste electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 689-694, 2003.

[38] VALENTINI, F.; AMINE, A.; ORLANDUCCI, S.; TERRANOVA, M. L.; PALLESCHI, G. Carbon nanotube purification: preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5413-5421, 2003.

[39] HE, J.B.; LIN, X.Q.; PAN, J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. **Electroanalysis**, v. 17, p. 1681-1686, 2005.

[40] CHICHARRO, M.; SÁNCHEZ, A.; BERMEJO, E.; ZAPARDIEL, A.; RUBIANES, M.D.; RIVAS, G.A. Carbon nanotubes paste electrodes as new detectors for capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 543, p. 84-91, 2005.

[41] LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: enzimas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. p. 190-211.

[42] CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução a bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. p. 131-161.

- [43] DAY, T.; GREENFIELD, A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal 105 neurons *in vitro*: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 111, p. 649-656, 2002.
- [44] QUINN, D.M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Review**, v. 87, p. 955-975, 1987.
- [45] DVIRA, H.; SILMAN, I.; HARELA, M.; ROSENBERG, T.L.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, p. 10-22, 2010.
- [46] GREENBLATT, H.M.; DVIR, H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal Molecular Neuroscience**, v. 20, p. 369-384, 2003.
- [47] PRADO, M.A.M.; REIS, R.A.M.; PRADO, F.V.; MELLO, M.C.; GOMEZ, M.V.; MELLO, F.G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291-299, 2002.
- [48] MASSOULIE, J. AND BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Review of Neuroscience**, v. 5, p. 57-106, 1982.
- [49] BON, S.; HUET, M.; LEMONNIER, M.; RIEGER, F.; MASSOULIE, J. Molecular forms of electrophorus acetylcholinesterase; molecular weight and composition. **European Journal of Biochemistry**, v. 68, p. 523-530, 1976.
- [50] ROBERTS, W.L.; KIM, B.H.; AND ROSENBERG, T.L. Differences in the glycolipid membrane anchors of bovine and human erythrocyte acetylcholinesterases. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 84, p. 7817-7821, 1987.
- [51] MOREL, N.; LEROY, J.; AYON, A.; MASSOULIÉ, J.; BON, S. Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 37379-37389, 2001.
- [52] RACHINSKY, T.L.; CAMP, S.; LI, Y.; EKSTROEM, J.; NEWTON, M. AND TAYLOR, P. Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species. **Neuron**, v. 5, p. 317-327, 1990.

- [53] SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L. AND SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.
- [54] NACHMANSOHN, D.; WILSON, I.B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine, **Advances in Enzymology**, v. 12, p. 259-339, 1951.
- [55] SHAFFERMAN, A.; BARAK, D.; KAPLAN, D.; ORDENTLICH, A.; KRONMAN, C.; VELAN, B. Functional requirements for optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-Biological Interactions**, v. 123, p. 157-158, 2005.
- [56] SCHULZE, H.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; VORLOVÁ, S.; SCHMID, R.D.; BACHMANN, T.T. Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 17, p. 1095-1105, 2002.
- [57] SHIM, J.H.; LEE, C.J.; KIM, M.R.; KIM, I.S.; JIN, L.T.; PARK, S. Detection of carbamate insecticides in fruit and vegetable sample with an acetylcholinesterase inhibition-based bioassay. **Journal of Pesticide Science**, v. 28, p. 318-321, 2003.
- [58] BUCUR, B.; ANDREESCU, S.; MARTY, J. Affinity methods to immobilize acetylcholinesterases for manufacturing biosensors. **Analytical Letters**, v. 37, p. 1571-1588, 2004.
- [59] BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A.; MARTY, J. L. Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 115-121, 2006.
- [60] DANET, A.F.; BUCUR, B.; CHEREGI, M.; BADEA, M.; SERBANI, S. Spectrophotometric determination of organophosphoric insecticides in a FIA system based on AChE inhibition. **Analytical Letters**, v. 36, p. 59-73, 2003.
- [61] SUWANSA-ARD, S.; KANATHARANA, P.; ASAWATRERATANAKUL, P.; LIMSAKUL, C.; WONGKITTISUKSA, B.; THAVARUNGKUL, P. Semi disposable reactor biosensors for detecting carbamate pesticides in water. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 445-454, 2004.
- [62] ARDUINI, F.; RICCI, F.; TUTA, C.S.; MOSCONE, D.; AMINE, A.; PALLESCHI, G. Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 580, p. 155-162, 2006.

- [63] CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S. Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 40-46, 2008.
- [64] UPADHYAY, S.; RAO, G.R.; SHARMA, M.K.; BHATTACHARYA, B. K.; RAO, V.K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 832-838, 2009.
- [65] ANDREESCU, S.; MARTY, J.L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 1-15, 2006.
- [66] PATEL, P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety. **Trends Analytical Chemistry**, v. 21, p. 96-115, 2002.
- [67] THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.
- [68] SARMAA, A.K.; VATSYAYANB, P.; GOSWAMIB, P.; MINTEER, S.D. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2313-2322, 2009.
- [69] CLARK, L.C.; LIONS, C. Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962.
- [70] GUILBAULT, G.G.; MONTALVO, J.G. A urea-specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, p. 2164-2165, 1969.
- [71] MAVRIKOU, S.; FLAMPOURI, K.; MOSCHOPOULOU, G.; MANGANA, O.; MICHAELIDES, A.; KINTZIOS, S. Assessment of organophosphate and carbamate pesticide residues in cigarette tobacco with a novel cell biosensor. **Sensors**, v. 8, p. 2818-2832, 2008.
- [72] QU, Y.; SUN, Q.; XIAO, F.; SHI, G.; JIN, L. Layer-by-Layer self-assembled acetylcholinesterase/PAMAM-Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 139-144, 2010.

[73] DU, D.; WANG, M.; CAI, J.; TAO, Y.; TU, H.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing. **Analyst**, v. 133, p. 1790-1795, 2008.

[74] SUN, X.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2611-2614, 2010.

[75] MILKANI, E.; LAMBERT, C.R.; MCGIMPSEY, W. G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 212-219, 2011.

[76] HE, P.; DAVIES, J.; GREENWAY, G.; HASWELL, S.J. Measurement of acetylcholinesterase inhibition using bienzymes immobilized monolith micro-reactor with integrated electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 9-14, 2010.

[77] MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 1791-1799, 2008.

[78] SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L. T.; Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, p. 123-128, 2002.

[79] VLATAKIS, G.; ANDERSSON, L.I; MULLER, R.; MOSBACH, K. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, v. 361, p. 645, 1993.

[80] ANDREESCU, S.; SADIK, O.A. Trends & challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 861-878, 2004.

[81] FATIBELLO-FILHO, O.; CAAPELATO, M.D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, p. 28-39, 1992.

[82] MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

- [83] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotoxicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FMonografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 23 fev. 2011.
- [84] ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. p. 188.
- [85] LIMA, PAULO J.P. **Possíveis doenças físicas e mentais relacionadas ao manuseio de agrotóxicos em atividades rurais, na região de Atibaia, SP/Brasil**. 2008. 158 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [86] RESÍDUOS de agrotóxicos em alimentos: implicações para saúde pública e meio ambiente. Goiás: Universidade de Brasília, UnB. Disponível em:
<<http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PRODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/52.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2011.
- [87] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Carbaril**. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/93b39980405ac42ab5f7f7330f10004b/C03++Ccarbaril.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 fev. 2011.
- [88] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Metomil**. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1a8cf3804098a7eaa30bef7232b7a538/m17.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 fev. 2011.
- [89] MOTOHASHI, N.; NAGASHIMA, H.; PÁRKANYI, C.; SUBRAHMANYAN, B.; ZHANG, G.W. Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 333-346, 1996.
- [90] MCGARVEY, B.D. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. **Journal of Chromatography**, v. 642, p. 89-105, 1993.
- [91] YANG, S.S.; GOLDSMITH, A.I.; AMETENA, I. Recent advances in the residue analysis of N-methylcarbamate pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 3-16, 1996.
- [92] HENNION, M.C.; BARCELO, D. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, p. 3-34, 1998.

[93] GARRIGUES, S.; VIDAL, M.T.; GALLIGNANI, M.; DE LA GUARDIA, M. On-line preconcentration and flow analysis-Fourier transform infrared determination of carbaryl. **Analyst**, v. 119, p. 659-664, 1994.

[94] VENTRIGLIA, M.; RESTANI, P.; MORRICA, P.; DAVID, P.; DE ANGELIS, L.; GALLI, C.L. Liquid chromatographic determination of imazosulfuron in drinking water and in soil using ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 857, p. 327-330, 1999.

[95] HO, JAMES S.; TANG, PETER H. Optimization of supercritical fluid extraction of environmental pollutants from a liquid-solid extraction cartridge. **Journal of Chromatographic Science**, v. 30, p. 344-350, 1992.

[96] WAN, H.B.; WONG, M.K. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 43-47, 1996.

[97] VAZ, C.M.P; CRESTANA, S.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; MASSAROPI, M.R.C.; AVACA, L.A. Electroanalytical determination of the herbicide atrazine in natural waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 62, p. 65-76, 1996.

[98] VAZ, C.M.P; CRESTANA, S.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; MASSAROPI, M.R.C.; AVACA, L.A. Adsorption isotherms for atrazine on soils measured by differential pulse polarography. **Electroanalysis**, v. 9, p. 956-958, 1997.

[99] ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-90, 1961.

[100] MORAES, FERNANDO C. **Nanotubos de carbono no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. 2010. 43 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

[101] BRITTO, P.; SANTHANAM, K.; RUBIO, A.; ALONSO, J.A.; AJAYAN, P.M. Improved charge transfer at carbon nanotube electrodes. **Advanced Materials**, v. 11, p. 154-157, 1999.

[102] LEFEVRE, G.; BESSIERE, J.; WALCARIUS, A. Cuprite-modified electrode for the detection of iodide species. **Sensors and Actuators B**, v. 59, p. 113-117, 1999.

[103] MYUNG-KEUN, K.; DEOG-SU, P.; MI-SOOK, W.; YOON-BO, S. Anodic differential pulse voltammetric analysis of iodide with a cinchonine-modified carbon paste electrode. **Electroanalysis**, v. 8, p. 680-684, 1996.

[104] PANDEY, P.C.; UPADHYAY, S.; PATHAK, H.C.; PANDEY, C.M.D.; TIWARI, I. Acetylthiocholine and thiocholine electrochemical biosensors based on an organically modified sol-gel glass enzyme reactor and graphite paste electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 62, p. 109-116, 2000.

[105] MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

[106] OKUDA, K.; URABE, I.; YAMADA, Y.; OKADA, H. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, p. 100-105, 1991.

[107] QUIOCHO, F.A.; RICHARDS, F.M. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 52, p. 833-839, 1964.

[108] AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, v. 6, p. 43-52, 1969.