UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS - IQSC
GRUPO DE MATERIAIS ELETROQUÍMICOS E MÉTODOS
ELETROANALÍTICOS - GMEME

***“DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES DE ELETRODOS MODIFICADOS
COM A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE PARA A DETECÇÃO DE
PESTICIDAS EM MATRIZES DE ALIMENTOS”***

Josiane Caetano Dragunski

Tese apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos para a obtenção do título de Doutor em
Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

SÃO CARLOS

2007

Dedico este trabalho,

Aos meus pais: Ilda e Geraldo, pelo carinho, dedicação e incentivo.

Ao meu marido e companheiro Douglas, pelo apoio, amor e principalmente pela compreensão de conviver com a distância durante os 3 anos deste trabalho.

Aos meus irmãos: Renato e Paulo Sergio (Pita), por me animarem e se preocuparem comigo.

Às minhas cunhadas: Isabel e Silvia, por serem pessoas maravilhosas.

Ao meu sobrinho Renato Junior, por todos os momentos de alegria e descontração que me proporciona.

A todos os meus familiares, pela motivação e confiança.

A minha sogra Marly e minha “vó” Maria Florência (Nena), pelo apoio e carinho.

“Aquele que caminha sozinho pode até chegar mais rápido...mas aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe.”

(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha existência e por me dar força para enfrentar os problemas nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador e amigo prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pelos conselhos, discussões, paciência e principalmente por ser compreensivo e estar sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Avaca pelos ensinamentos e ajuda quando precisei.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo pelo conhecimento acerca dos métodos eletroanalíticos.

Ao Sr. João Tiengo por toda a ajuda e dedicação, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Marcelo Calegari pela amizade e ajuda técnica, especialmente com os computadores.

Aos meus amigos Hueder e Lúcia, por serem pessoas tão especiais.

Aos meus eternos amigos: Inês, Renata, Válber e Alvaro, que apesar de não estarem mais tão próximos, estão sempre do meu lado.

As minhas amigas: Andressa, Alexandra e Sônia por estares sempre me apoiando.

A todos os amigos e colegas que estão e foram do GMEME: Juliana, Milena, Murilo, Robson, Claudia Breda, Claudia Razzino, Gustavo, Michele, Raquel, Rafael, Marcelina, Giancarlo, Katlin, Fernando, Fabiano, Fernando, Mauro, Eliana, André, Marisa, Osmair e Hugo, pelos momentos alegres.

Aos meus amigos da academia: Patrícia, Livia, Paula, Camila e Alex pelos momentos de descontração que passamos juntos.

A Sílvia e Andréia da secretaria da pós-graduação pelo bom atendimento.

Às funcionárias da biblioteca pela pronta ajuda sempre que necessário.

Ao Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos do IQSC/USP, pela infra-estrutura e oportunidade concedidas.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos (processo 03/07653-8).

"As melhores e mais belas coisas do mundo não podem ser vistas nem tocadas, mas sentidas."

(Helen Kellee)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Conceitos Gerais.....	1
1.1.1 - Carbaril	4
1.1.2 - Metomil.....	5
1.1.3 - Aldicarbe.....	5
1.1.4 - Metodologia para a detecção de pesticidas e seus resíduos.....	6
1.2 - Enzimas	8
1.2.1 - Cinética Enzimática.....	8
1.3 - Biossensores.....	12
1.3.1 - Acetilcolinesterase.....	14
1.3.2 - Imobilização da enzima	17
1.4 - Eletrodo de pasta de carbono	19
1.4.1 - Eletrodos de pasta de carbono modificados.....	20
1.5 – Teoria do método.....	21
1.5.1 - Técnicas Eletroanalíticas	21
1.5.1.1 - Voltametria cíclica	22
1.5.1.2 - Voltametria de onda quadrada (SWV).....	23
1.5.1.3 - Análise Coulometrica	26
1.6 - Síntese Bibliográfica	27
1.6.1 - Detecção de carbamatos utilizando biossensor.....	27
1.6.2 - Determinação de carbamatos utilizando HPLC	33
2 – OBJETIVOS.....	35
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
3.1 - Reagentes.....	36
3.2 - Preparação de soluções	37
3.3 - Instrumentação utilizada.....	38

3.4 - Eletrodos.....	39
3.5 - Célula Eletroquímica	39
3.6 - Metodologia.....	40
3.6.1 - Cálculo da atividade e da estabilidade enzimática	40
3.6.2 - Preparação do eletrodo	41
3.6.3 - Determinação eletroquímica	42
3.6.4 - Determinação Cromatográfica	43
3.6.5 - Métodos de extrações	43
3.6.5.1 - Procedimento de extração simples	43
3.6.5.2 - Procedimento de extração por “MSPD”	44
3.6.6 - Reação em solução	45
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 - Estabilidade do substrato AcSChI em solução	46
4.2 - Estabilidade da enzima AchE em solução.....	47
4.3 - Atividade Enzimática.....	49
4.3.1 - Determinação da concentração de proteína na solução padrão de soroalbumina bovina (SAB).....	49
4.3.2 - Cinética da reação para o cálculo da atividade enzimática.....	50
4.4 - Construção do biossensor	52
4.4.1 - Perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono	52
4.4.2 - Determinação do potencial de trabalho	53
4.4.3 - Variação da quantidade de enzima AchE	57
4.4.4 - Variação da quantidade de ftalocianina de cobalto (CoPC)	58
4.4.5 - Variação da porcentagem de glutaraldeído.....	59
4.4.6 - Variação da concentração de substrato AcSChI	60
4.5 - Inibição enzimática causada pelo pesticida carbaril	61
4.6 - Caracterização eletroquímica do biossensor	63
4.6.1 - Efeito do pH.....	63
4.6.2 - Efeito de temperatura.....	64
4.6.3 - Tempo de vida do eletrodo	65
4.6.4 - Efeito da quantidade de solvente orgânico	66
4.7 - Desenvolvimento de metodologias para determinação de carbamatos.....	67
4.7.1 - Determinação analítica do pesticida carbaril	68
4.7.1.1 - Tempo de incubação.....	68
4.7.1.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor	69
4.7.1.3 - Recuperação para o carbaril no tomate (biossensor)	71
4.7.1.4 - Aplicação do biossensor na determinação do tomate “in natura”.....	74
4.7.1.5 - Recuperação para o carbaril na maçã (biossensor)	75
4.7.1.6 - Recuperação para o carbaril na laranja (biossensor).....	76
4.7.1.7 - Medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o carbaril	77
4.7.1.7.1 - Construção da curva analítica utilizando HPLC	77
4.7.1.7.2 - Recuperação do carbaril em diferentes matrizes (HPLC).....	79

4.7.1.8 - Comparação entre as técnicas	80
4.7.1.8.1 - Diferentes matrizes e métodos de extração	80
4.7.2 - Determinação analítica do pesticida metomil e do Lannate®	82
4.7.2.1 - Tempo de incubação.....	82
4.7.2.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor	83
4.7.2.3 - Recuperação para o Lannate® em diferentes matrizes (biossensor).....	85
4.7.2.3.1 - Amostras de tomate e leite de soja.....	85
4.7.2.3.2 - Amostras de couve-manteiga.....	86
4.7.2.4 - Medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o metomil e Lannate®.....	88
4.7.2.4.1 - Construção da curva analítica utilizando HPLC	88
4.7.2.4.2 - Recuperação para o Lannate® em amostras de tomate e leite de soja (HPLC)	90
4.7.2.4.3 - Recuperação para o Lannate® em amostras de couve-manteiga (HPLC)	91
4.7.2.5 - Comparação entre as técnicas	93
4.7.2.5.1 - Diferentes matrizes	93
4.7.3 - Determinação analítica do pesticida aldicarbe.....	94
4.7.3.1 - Tempo de incubação.....	94
4.7.3.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor	95
4.7.3.3 - Recuperação do aldicarbe em tomate (biossensor)	96
4.8 - Vantagens do biossensor enzimático	96
4.9 - Reação em Solução.....	97
4.9.1 - Comportamento eletroquímico do substrato AchI	98
4.9.2 - Construção da curva analítica	99
4.9.3 - Adição da enzima AchE em solução	99
4.9.4 - Adição de diferentes concentrações dos pesticidas	100
5 - CONCLUSÃO.....	104
6 - REFERÊNCIAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Fórmula estrutural do carbaril</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2: Fórmula estrutural do metomil.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3: Fórmula estrutural do aldicarbe</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4: Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação (concentração de enzima constante).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 5: Esquema de funcionamento de um biossensor. Aqui, S é o substrato da enzima, P o produto de reação enzimática.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 6: Esquema do funcionamento da ACh/AChE no organismo</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7: Forma de aplicação do potencial (1) com, a) varredura direta, b) potencial de inflexão e c) varredura inversa, e resposta de corrente-voltagem na voltametria cíclica (2).....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8 : Formas de onda empregadas e obtidas na voltametria de onda quadrada. (a) forma de onda da rampa em “escada”, (b) forma de onda da onda quadrada, (c) forma de onda da voltametria de onda quadrada, (d) forma de onda da corrente total e (e) corrente diferencial total.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9: (1) Forma de aplicação do potencial na SWV e (2) Voltamograma de onda quadrada teórico, para um sistema totalmente reversível.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 10: Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos.(1) eletrodo de trabalho, (2) referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4 e 5) entrada e saída de N₂ respectivamente.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 11: A - Espectro de absorção do substrato AcSchI ($1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com o tempo de estocagem da solução: (3/4) 1, (3/4) 3, (3/4) 6, (3/4) 11 dias. B - Gráfico de Absorbância por tempo.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 12: A - Espectro de absorção da tiocolina em uma solução com DTNB, após vários dias de estocagem da solução: (3/4) 1, (3/4) 3, (3/4) 5, (3/4) 6 (3/4) 8, (3/4) 11 dias. B - Gráfico de Absorbância por tempo.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 13: Curva analítica do conteúdo protéico empregando a soroalbumina bovina como solução padrão nas concentrações: 0,80 a $159,00 \times 10^{-2} \text{ mg } 3,00 \text{ mL}^{-1}$ mais 1,00 mL de CuSO_4 0,21%.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 14: (A) Espectro de absorção obtido para a enzima acetilcolinesterase ($[\text{AcSchI}] 1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, DTNB $1,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4) para 25,00 mL da solução da enzima (42,00 mg em 1,00 mL de tampão fosfato) (curva vermelha). A inserção (B) apresenta a região linear da curva de absorbância versus tempo, utilizada para tirar o valor de b. Curva preta: absorbância na ausência da enzima.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 15: Perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono em uma solução de hexacianoferrato de potássio trihidratado $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV.</i>	<i>52</i>

Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina ($a = 50 \text{ mV}$, $DE_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50 \text{ Hz}$, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) após a adição da enzima para os tempos: ($\frac{3}{4}$)0, ($\frac{3}{4}$) 20, ($\frac{3}{4}$) 52, ($\frac{3}{4}$) 76 minutos.	53
Figura 17: Voltamograma de onda quadrada para a oxidação da AcSChI ($3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$; $a = 50 \text{ mV}$; $DE_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50 \text{ Hz}$).	54
Figura 18: Variação de potencial para solução contendo apenas substrato AcSChI ($3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$). Potenciais: ($\frac{3}{4}$) 100, ($\frac{3}{4}$) 200, ($\frac{3}{4}$) 300, ($\frac{3}{4}$) 400mV.	55
Figura 19: Variação da corrente limite de difusão da oxidação da tiocolina com o tempo (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$), no potencial de 100mV.	55
Figura 20: Variação dos potenciais para a oxidação da tiocolina em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$	56
Figura 21: Influência da variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo na corrente limite de oxidação da tiocolina (solução de AcSChI = $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$).	57
Figura 22: Efeito de variação da quantidade de ftalocianina de cobalto adicionada à pasta de carbono (solução de AcSChI = $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$) na corrente limite de oxidação da tiocolina. As quantidades variaram de $0,50$ a $2,60 \times 10^{-3} \text{ g}$	59
Figura 23: Efeito da variação do glutaraldeído na oxidação da tiocolina (solução de AcSChI = $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato): ($\frac{3}{4}$) ausência de enzima; ($\frac{3}{4}$) 1% e ($\frac{3}{4}$) 10% de glutaraldeído.	60
Figura 24: Influência da variação da concentração do substrato nas correntes de oxidação da tiocolina para o biossensor enzimático otimizado (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$).	61
Figura 25: Cronoamperogramas para a oxidação da tiocolina mostrando a inibição da ação enzimática para o pesticida carbaril (solução de AcSChI = $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato). Concentrações: ($\frac{3}{4}$) apenas substrato; ($\frac{3}{4}$) depois de imerso em $0,50 \times 10^{-4}$ e ($\frac{3}{4}$) $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Carbaril.	62
Figura 26: Dependência da resposta do biossensor em função do pH para a solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	64
Figura 27: Dependência da resposta do biossensor em função da temperatura para a solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	65
Figura 28: Efeito do tempo de estocagem do eletrodo para a solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	66
Figura 29: Variação da corrente limite de oxidação da tiocolina com a porcentagem de solvente orgânico adicionado a solução (solução de AcSChI = $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$ com $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para: (A) acetonitrila e (B) etanol.	67

Figura 30: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor de acetilcolinesterase para o inseticida carbaril $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os cronoamperogramas foram obtidos de uma solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 com $T = 30^\circ \text{C}$.	68
Figura 31: Curva analítica para o carbaril (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e $T = 30^\circ \text{C}$). Para as concentrações de 5,00 a $100,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.	69
Figura 32: Cronoamperogramas para a determinação do carbaril em tomate: ($\frac{3}{4}$) branco ($\frac{3}{4}$) sem adição de pesticida e ($\frac{3}{4}$) com carbaril $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	72
Figura 33: Fotografia do biossensor imerso no tomate “in natura”, fortificado com $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.	74
Figura 34: (A) Cromatograma obtido para o carbaril (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) em diferentes concentrações: 0,08 ($\frac{3}{4}$), 0,70 ($\frac{3}{4}$), 2,00 ($\frac{3}{4}$), 3,00 ($\frac{3}{4}$), 5,00 ($\frac{3}{4}$), 10,00 ($\frac{3}{4}$), 25,00 ($\frac{3}{4}$), 50,00 ($\frac{3}{4}$), 75,00 ($\frac{3}{4}$), $100,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($\frac{3}{4}$). (B) Curva analítica do Carbaril.	78
Figura 35: Curvas de recuperação obtidas para o carbaril em amostras de tomate (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) nas concentrações: (A) $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B) $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	79
Figura 36: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e $T = 30^\circ \text{C}$), para: A - metomil ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e B - LannateÒ ($2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	83
Figura 37: Curvas analíticas para o metomil (A) e LannateÒ (B) na solução de substrato AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e $T = 30^\circ \text{C}$. Para as concentrações de 0,90 a $75,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.	84
Figura 38 Cronoamperogramas para a determinação do LannateÒ em couve-manteiga: ($\frac{3}{4}$) branco ($\frac{3}{4}$) sem adição de pesticida.	86
Figura 39 - Cromatogramas obtidos para o metomil em diferentes concentrações: 0,05 ($\frac{3}{4}$), 0,25 ($\frac{3}{4}$), 0,50 ($\frac{3}{4}$), 0,80 ($\frac{3}{4}$), 1,00 ($\frac{3}{4}$), 2,50 ($\frac{3}{4}$), 5,00 ($\frac{3}{4}$), 8,00 ($\frac{3}{4}$) $10,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($\frac{3}{4}$). (B) Curva analítica do metomil.	89
Figura 40: Cromatogramas obtida para o LannateÒ na amostra de couve-manteiga nas concentrações: 0 ($\frac{3}{4}$), 2,00 ($\frac{3}{4}$) e amostra dopada com mais $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($\frac{3}{4}$).	91
Figura 41: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor, baseado na acetilcolinesterase para o pesticida aldicarbe $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4). Para os tempos de 4 a 20 minutos.	94
Figura 42: Curva analítica para o aldicarbe (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e $T = 30^\circ \text{C}$) para as concentrações variando de 0,50 a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	95

Figura 43: Voltamograma de onda quadrada para o branco ($\frac{3}{4}$) e após a adição de $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato ($\frac{3}{4}$) para um incremento de 2 mV, amplitude de 50 mV, frequência de 50 Hz, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4, sem adição da enzima. 98

Figura 44: curva analítica para o substrato AchI ($a = 50 \text{ mV}$, $DE_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50 \text{ Hz}$, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) nas concentrações: 5,00; 7,50; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00; 50,00; 60,00; 80,00 e $100,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtidas de voltamogramas de onda quadrada similares àqueles mostrados na Figura 43. 99

Figura 45: Voltamograma de onda quadrada para $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato ($\frac{3}{4}$) e após 5 minutos da adição da enzima ($\frac{3}{4}$) para um incremento de 2 mV, amplitude de 50 mV, frequência de 50 Hz, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4..... 100

Figura 46: Efeito da adição de pesticida na relação das correntes de pico (A) e dos $\ln C/C_0$ (B) com o tempo de reação para: < enzima-substrato e para as concentrações de fenitrothion: = $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 101

Figura 47: Efeito da adição do pesticida na relação das correntes de pico (A) e dos $\ln C/C_0$ (B) com o tempo de reação para: < enzima-substrato e para as concentrações de carbaril: = $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 102

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 2 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril no tomate com os diferentes métodos de extração, utilizando-se o biossensor.</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 3 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril na maçã com diferentes métodos de extração, utilizando-se o biossensor.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 4 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril na laranja em diferentes concentrações utilizando-se o biossensor.</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 5 - Resultados das curvas de recuperação obtidos para carbaril em amostras de tomate, maçã e laranja, utilizando-se a HPLC.</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 6 – Valores de porcentagem de recuperação obtidos para carbaril em amostras de tomate, maçã e laranja para diferentes técnicas, métodos de extração e concentrações.</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 7 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o LannateÒ no tomate e leite de soja com as diferentes concentrações, utilizando-se o biossensor... </i>	<i>85</i>
<i>Tabela 8 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o LannateÒ na couve com as diferentes concentrações, utilizando-se o biossensor.</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 9 - Resultados das curvas de recuperação obtidos para LannateÒ em amostras de tomate e leite de soja utilizando-se a HPLC.</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 10: Resultados das curvas de recuperação obtidos para LannateÒ em amostras de couve-manteiga utilizando-se a HPLC.</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 11: Resultados das curvas de recuperação obtidos para LannateÒ em amostras de couve-manteiga e diferentes concentrações utilizando-se a HPLC.</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 12 – Valores de porcentagem de recuperação obtidos para LannateÒ em diferentes matrizes, concentrações e técnicas.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 13: Valores da constante de velocidade da reação enzimática para diferentes concentrações dos pesticidas fenitrothion e carbaril.....</i>	<i>103</i>

RESUMO

Este trabalho descreve a preparação, a caracterização e o uso de um biossensor de pasta de carbono modificado com a enzima acetilcolinesterase para a quantificação de carbamatos em alimentos, bem como o estudo das constantes de velocidade para a reação enzima/substrato (iodeto de acetiltiocolina) em solução. Inicialmente foram realizados testes de estabilidade, tanto para o substrato quanto para a enzima. Nestes testes, a absorção na região do UV-vis do substrato não apresentou diminuição significativa em 11 dias de análises, já a enzima apresentou uma grande perda de sua atividade com apenas três dias de preparo da solução.

Na preparação do eletrodo de trabalho alguns parâmetros foram otimizados, tais como: quantidade de enzima e de ftalocianina de cobalto (CoPC) no eletrodo, bem como a porcentagem de glutaraldeído utilizada. A melhor resposta ocorreu para adição de $2,40 \times 10^{-3}$ g de enzima, $0,90 \times 10^{-3}$ g de CoPC (referentes à massa de 0,017 g de pasta de carbono) e solução de glutaraldeído 1%. A seguir, realizou-se um experimento baseado na inibição da atividade da enzima, causada pela imersão do eletrodo na solução contendo o pesticida carbaril nas concentrações $5,00 \times 10^{-5}$ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Notou-se que, com o aumento da concentração do carbaril, houve aumento na inibição da atividade enzimática. Desta forma o eletrodo apresentou-se apto para determinação analítica de pesticidas.

Estas medidas foram realizadas em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 e com tempo de incubação para o carbaril, metomil e aldicarbe foram de 8, 12 e 15 minutos, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos utilizando-se o biossensor amperométrico para o carbaril foram de $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,40 mg L⁻¹) e $6,70 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (1,30 mg L⁻¹), para o metomil de $1,88 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (30,45 µg L⁻¹) e $6,26 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,10 mg / L⁻¹) e para o aldicarbe de $1,10 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,20 mg L⁻¹) e $3,60 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,70 mg L⁻¹). Para a formulação comercial

Lannate® (metomil) os LD e LQ foram $2,13 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($34,50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e $7,09 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. As medidas de HPLC apresentaram LD e LQ de $1,58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,18 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e $5,27 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($10,60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para o carbaril e de $9,02 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e $3,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($48,60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para o metomil. Testes de recuperação foram realizados usando ambas as técnicas para o carbaril e Lannate®. As recuperações utilizando-se o biossensor mostraram-se eficientes, variando de 76,83 a 106,67% para o carbaril e de 78,00 a 96,50% para a Lannate®, enquanto que nas medidas de HPLC, as recuperações foram de 78,00 a 108,33% para o carbaril e de 57,00 a 99,50% para o Lannate®. A recuperação para o aldicarbe no tomate foi de 62,40 %.

As análises da enzima em solução mostraram que a metodologia empregada neste estudo é adequada para a determinação das constantes de velocidade para a etapa lenta da reação AchE/AchI. Observou-se que os valores destas constantes são dependentes da concentração dos pesticidas fenitrothion (organofosforado) e carbaril (carbamato), em baixa concentração ambos apresentaram constantes de velocidade similares, mas com o aumento dessa concentração, o fenitrothion apresentou menor constante de velocidade em relação ao carbaril, sugerindo que este apresenta maior inibição da enzima e por consequência maior toxicidade no organismo. Esses resultados mostraram uma possível metodologia analítica para a quantificação destes pesticidas, obtendo-se os valores das constantes de velocidade enzimática e suas dependências com as concentrações dos pesticidas em solução.

ABSTRACT

This work describes the development, characterization and utilization of a carbon paste biosensor based in the acetylcholinesterase enzyme for carbamates determinations in foodstuff, as well as the study of rate constants for enzyme/substrate reaction in solution. Stability tests were initially performed for both the substrate and the enzyme. In these tests, the signal for UV-vis adsorption for the substrate shows no inhibition during 11 days while for the enzyme it has been demonstrated that a considerable loss of activity occurs after three days from the solution preparation.

In the electrode preparation, some experimental parameters were optimized, such as the amount of enzyme and the content of cobalt fthalocyanine (CoPC) in the electrode, as well as the employed percentage of glutaraldehyde. The highest analytical signals were obtained for the addition of 2.40×10^{-3} g enzyme, 0.90×10^{-3} g CoPC (related to the massa of 0,017g of carbon paste) and a 1% glutaraldehyde solution. The next step was to carry out an experiment based in the inhibition of enzyme activity by the pesticide. For this, the biosensor was immersed in 5.00×10^{-5} e 1.00×10^{-4} mol L⁻¹ carbaryl solutions. It was observed that, by increasing the carbaryl concentration, the electrochemical signal of the sensor was inhibited proportionally. This was indicative that the sensor was adequate to be used in carbaryl monitoring and analytical determinations.

The analytical determinations of carbamate pesticides were performed in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer, pH 7,4, with incubation time of 8, 12 and 15 minutes for carbaryl, metomil and aldicarb, respectively. The detection (LD) and quantification (LQ) limits obtained with the biosensor were 2.00×10^{-6} mol L⁻¹ (0.40 mg L⁻¹) and 6.70×10^{-6} mol L⁻¹ (1.30 mg L⁻¹) for carbaryl, 1.88×10^{-7} mol L⁻¹ (30.45 µg L⁻¹) and 6.26×10^{-7} mol L⁻¹ (0.10 mg / L⁻¹) for metomil and 1.10×10^{-6} mol L⁻¹ (0.20 mg L⁻¹) and 3.60×10^{-6} mol L⁻¹ (0.70 mg L⁻¹) for aldicarb. For the commercial formulation of metomil, Lannate®, LD and LQ obtained were 2.13×10^{-7} mol L⁻¹ (34.50 µg L⁻¹) and

$7.09 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (0.12 mg L^{-1}), respectively. The HPLC measurements showed LD and LQ of $1.58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($3.18 \mu\text{g L}^{-1}$) and $5.27 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($10.60 \mu\text{g L}^{-1}$) for carbaryl and $9.02 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($0.15 \mu\text{g L}^{-1}$) and $3.00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($48.60 \mu\text{g L}^{-1}$) for metomil. Recovering tests were also done with both analytical techniques for carbaryl and Lannate®. The obtained recoveries using the biosensor were in the range of 76.83 to 106.67% for carbaryl and 78.00 to 96.50% for Lannate®, while using the HPLC, the recoverings were 78.00 a 108.33% for carbaryl and 57.00 to 99.50% for Lannate®. The recovering of aldicarb in tomatoes, with HPLC, were 62.40 %.

The study of the enzymatic reaction in solution showed that the employed methodology allows to obtain the rate constant values for the rate determining step of the AchE/AchI reaction. It was observed that these rate constant values were strongly dependent in the pesticide concentrations for fenitrothion (organofosforous) and carbaryl (carbamate). At low concentration levels of the pesticide in the electrolyte, all the rate constants showed similar values but, when the pesticide concentration was raised, fenitrothion was found to exert a more powerful inhibition action for the enzyme activity than carbaryl, thus suggesting its higher toxic character. These results showed the development of a possible analytical methodology for quantification of these pesticides, by calculating the rate constant value and its dependence to the pesticide concentration in solution.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Conceitos Gerais

A necessidade crescente do aumento de produtividade agrícola implica na utilização, cada vez mais acentuada, de produtos químicos agressivos ao meio ambiente e ao bem-estar de seres humanos. Dentre estes diferentes produtos destacam-se os pesticidas, utilizados em abundância para prevenir a perda de produtividade associada à ocorrência de pragas.

As primeiras substâncias utilizadas como pesticidas foram substâncias tóxicas de origem natural, tais como piretro, nicotina, além de substâncias inorgânicas como mercúrio e enxofre. O uso de pesticidas mais modernos se deu com a descoberta do poder inseticida do DDT [1,1,1-tricloro-2-bis(p-clorofenila)-etano], ocorrido por volta de 1940¹. Desde então, inúmeros outros pesticidas têm sido intensamente utilizados, compreendendo diferentes classes químicas, tais como: organoclorados, organofosforados, piretróides, carbamatos etc.

Todos estes pesticidas são utilizados com diferentes funções, sendo algumas delas: herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas, inseticidas dentre outras. As funções básicas destes pesticidas na agricultura são: grandes produções com altas produtividades, boa qualidade dos produtos e redução do trabalho e gastos de energia.

Dentre os pesticidas mais amplamente utilizados na agricultura estão aqueles das classes dos carbamatos e organofosforados. Estas substâncias vêm sendo utilizadas como inseticidas, fungicidas e parasiticidas. Devido ao seu tempo de meia vida no ambiente, seus resíduos tóxicos podem persistir no ar, água e solo. Em sua maioria são altamente tóxicos podendo causar sérios danos à saúde.

Uma das culturas que utilizam os carbamatos como pesticidas para o controle de pragas, é o tomate, uma hortaliça que tem em sua composição vitaminas A, B e C, e sais minerais como fósforo, ferro, potássio e magnésio. O tomate é excelente vigorizador do organismo, purificador do sangue, combate doenças do fígado, o desgaste mental, perturbações digestivas e pulmonares². As pragas que mais comprometem a produção de tomate, se não controladas no momento certo, são as brocas e traças dos frutos, pulgão verde, além de insetos transmissores de doenças.

A maçã é outra cultura que utiliza estes pesticidas, é uma fruta das regiões temperadas e tem considerável valor nutritivo. Ela contém vitaminas B1, B2 e sais minerais como fósforo e ferro. É recomendada para pessoas com problemas de intestino, obesidade, reumatismo, gota, diabetes, enfermidades da pele e do sistema nervoso². A produção de maçã é muito afetada pelo ácaro-vermelho³. Tanto o tomate, quanto a maçã são muito consumidos “in natura” (comercializados em feira-livre, mercados etc.), e utilizados na indústria, sendo que grande parte da produção é destinada à exportação.

A laranja, também utiliza grande quantidade dos pesticidas carbamatos, sendo que o Brasil é o maior produtor mundial e o estado de São Paulo é responsável por 70% da produção nacional, com um volume que supera 400 milhões de caixas⁴. Esta fruta é riquíssima em vitamina C (componente mais importante da laranja) e contém também em sua composição quantidades consideráveis de cálcio, fósforo e ferro. A laranja corrige a excessiva acidez do organismo; é estimulante do sistema circulatório, combatendo a inflamação das veias; ativa o trabalho das glândulas segregadoras de suco gástrico, facilitando, desta maneira, a digestão e funções intestinais. Aos enfermos de gota e diabéticos, recomenda-se esta fruta, pois é rica em sais minerais e substâncias neutralizantes, influenciando favoravelmente na eliminação do ácido úrico². As pragas que mais afetam essa cultura são as lagartas-praga de citros⁵

No caso do soja o Brasil é o segundo maior produtor do mundo, vindo atrás apenas dos Estados Unidos. O soja contém em sua composição 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligosacarídeos como rafinose e estaquiose) e isoflavona que está presente tanto nos grãos da soja como em alimentos derivados, como o leite. No caso do "leite", por exemplo, a isoflavona está em menor concentração do que no grão. Vários estudos têm demonstrado que o consumo de produtos derivados da soja está frequentemente associado com a redução do risco de inúmeras doenças, tais como câncer de esôfago, pulmão, próstata, mama e cólon retal, doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes, mal de Alzheimer e sintomas da menopausa⁶. As pragas mais comuns nessa são: Lagarta-da-soja, Lagarta-do-linho, Lagarta-militar, Broca-das-axilas.

A couve-manteiga (*Brassica oleracea*) é uma das hortaliças mais populares na região centro-sul do Brasil. Esta contém em sua composição vitaminas (A, B, C), minerais (cálcio, potássio, sódio, fosforo, ferro) e β -caroteno, além de um alto conteúdo de antocianinas e fibras⁷. Ela se destaca entre as demais hortaliças pelos teores das vitaminas A1 (retinol) e B2 (riboflavina), e dos minerais cálcio e ferro⁸. O consumo desta hortaliça é associado a redução no risco de câncer de mama. Esta cultura é atacada por pragas como: Lagarta-da-couve, Traça-das-crucíferas e Pulgão.

Há uma tendência no mercado nacional e internacional à busca desses produtos com menor quantidade possível de resíduos de defensivos, exigindo do produtor um monitoramento constante, devido ao surgimento de doenças e a incidência de pragas. Em geral os produtores têm dificuldades em determinar o momento mais oportuno de se aplicar o inseticida e acabam por realizar pulverizações freqüentes. Desta forma, tornou-se necessário a determinação de níveis de resíduos, além de um controle nos intervalos de segurança para que esses produtos sejam aceitos nacional e/ou internacionalmente.

Dentre os carbamatos utilizados para prevenir perda de produtividade devido à ocorrência de pragas nas culturas de tomate, maçã, laranja, soja e couve-manteiga, destacam-se os inseticidas carbaril, metomil e aldicarbe.

1.1.1 - Carbaril

O carbaril (1-naftil-metilcarbamato) é um inseticida da classe dos carbamatos, considerado muito tóxico (classe toxicológica II). Este pesticida é utilizado em mais de 13 culturas, destacando-se as de tomate, maçã e laranja. Os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) permitido pela agencia nacional de vigilância sanitária (ANVISA) para essas culturas são de 0,1, 2,0 e 7,0 mg kg⁻¹ respectivamente. Além disto, o carbaril também usado como fungicida^{9,10}.

Devido este inseticida ser de alta toxicidade, vários estudos realizados relatam que a exposição de seres humanos a ele causa a inibição da enzima acetilcolinesterase. Esta inibição leva ao acúmulo de acetilcolina (um neurotransmissor importante) nas sinapses nervosas (região de comunicação inter-neuronal) desencadeando uma série de efeitos colinérgicos¹¹. Estes efeitos involuntários são caracterizados por dificuldades na respiração (broncoconstrição), redução do ritmo cardíaco (bradicardia) e da pressão arterial (hipotensão), entre outros. A Figura 1 apresenta a fórmula estrutural do carbaril.

Figura 1: Fórmula estrutural do carbaril

1.1.2 - Metomil

O metomil (S-metil N(metilcarbamoiloxi) tioacetimidato) é um pesticida utilizado como inseticida e acaricida em diversas culturas, pertencente ao grupo das 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 é recomendado para as culturas de algodão, batata, couve, brócolis, repolho, milho, soja, tomate e trigo ¹², 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. A exposição deste a seres humanos também leva a inibição da enzima acetilcolinesterase, como mostrado anteriormente. A fórmula estrutural do metomil pode ser visto na Figura 2.

Figura 2: Fórmula estrutural do metomil

1.1.3 - Aldicarbe

O aldicarbe (2-metil-1-2(tiometil)propionaldeido o-metilcarbamoiloxi), é um pesticida que pode ser aplicado como inseticida, acaricida e nematicida. Este é pertencente à classe toxicológica I, ou seja, ele possui grau máximo de toxicidade. É utilizado para o tratamento de semente e/ou do solo durante o plantio⁹.

Dentre as suas aplicações, destaca-se a cultura de tomate, cujo limite permitido é de 0,02 mg kg⁻¹. A exposição deste em seres humanos provoca a

inibição da acetilcolinesterase, como descrito para o carbaril¹¹. Estudos sobre a meia-vida de degradação do aldicarbe em solos mostraram uma considerável variação nos resultados, com valores de meia-vida de 10 dias a 36 meses, de acordo com a classe de solo, profundidade, umidade, temperatura e pH¹³. A fórmula estrutural do aldicarbe pode ser vista na Figura 3.

Figura 3: Fórmula estrutural do aldicarbe

A possibilidade de contaminação de águas e alimentos por esses pesticidas exige um monitoramento, cada vez mais freqüente, destes poluentes, assim como de seus derivados. Entretanto, até hoje pouco se tem feito para a diversificação dos métodos de análise e monitoramento, visando à diminuição dos custos e das dificuldades de implementação e, assim, estimular o controle de qualidade do ar, águas e alimentos próprios para o consumo humano e de animais de criação.

1.1.4 - Metodologia para a detecção de pesticidas e seus resíduos

As técnicas analíticas padrão para a detecção de pesticidas e seus resíduos são as cromatográficas (líquida de alta eficiência, gasosa e de camada delgada), também são utilizadas técnicas espectroscópicas como espectroscopia de massa, infra-vermelho, ultra-violeta. Apesar destas técnicas serem muito sensíveis e precisas, para a realização das análises, é necessária uma grande manipulação da amostra, levando a um maior tempo na realização das análises e a um gasto elevado de reagentes para a etapa de preparação das amostras.

A HPLC consiste de colunas preenchidas com um material especialmente preparado e uma fase móvel que é eluída a altas pressões e detectadas em detectores como UV-vis, eletroquímico, etc. Esta técnica tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, com alta resolução, eficiência, versatilidade e sensibilidade. Apesar dessas vantagens, esta técnica apresenta grande complexidade e custo, como na aplicação destas metodologias em matrizes de alimentos ou solos, que normalmente envolve uma rotina complexa de pré-tratamento da amostra. Esta rotina pode ser composta de algumas das seguintes etapas¹⁴: modificações da matriz, extração (extração soxhlet (SOX), extração líquido-líquido, extração em fase sólida, micro-extração em fase sólida, dispersão da matriz em fase sólida, extração com fluído supercrítico, extração acelerada com solvente, extração assistida com micro-ondas), clean-up, etc.

Essas metodologias de preparação das amostras para as técnicas cromatográficas exigem, muitas vezes, a manipulação de uma quantidade não desprezível de solventes tóxicos, o que implica nos riscos à saúde humana decorrentes de seus possíveis efeitos nocivos^{15,16}, além de um maior tempo de preparo da amostra. Assim, uma situação ideal seria evitar a aplicação de todo este procedimento para diminuir o tempo e o custo das análises.

Desta forma é importante o desenvolvimento de novas metodologias para análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais. Nesse aspecto, as técnicas imunoquímicas (imunoensaios) e as que empregam os biossensores estão sendo muito utilizadas. As razões da demanda são a alta seletividade, fácil manuseio e a possibilidade em se detectar partes por bilhão (mg L^{-1}) e até mesmo a partes por trilhão (ng L^{-1})¹⁷.

Vários tipos de biossensores utilizando principalmente enzimas podem ser aplicados na determinação de compostos orgânicos, como, por exemplo, os pesticidas pertencentes às classes dos carbamatos e organofosforados. Neste caso, na maioria das vezes, a enzima utilizada é a acetilcolinesterase que sofre

inibição por esses pesticidas, possibilitando uma metodologia de análise baseado na diminuição do sinal, como será visto à frente.

1.2 - Enzimas

Enzimas são proteínas sintetizadas em uma célula viva, responsáveis por catalisar as reações termodinamicamente favoráveis, possuindo uma compatibilidade entre a velocidade da reação e o processo bioquímico essencial para a manutenção da célula. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, provenientes de sua natureza protéica, propiciando ao ambiente um mecanismo particular de reação com capacidade de reconhecer um grupo limitado de substrato. Por ser uma proteína, a enzima perde suas propriedades catalíticas se submetida alguns agentes como: calor, ácidos ou bases fortes, solventes orgânicos ou outros materiais que possam causar desnaturação da proteína^{18,19}.

1.2.1 - Cinética Enzimática

Os princípios gerais da cinética das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas, porém mostra-se também um aspecto distinto que não se observa usualmente em reações não-enzimática, a saturação com o substrato. O efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada pela enzima pode ser visto na Figura 4. Observa-se que em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial da reação (v_0) é proporcional à concentração do substrato, desta forma a reação é considerada de primeira ordem com relação ao substrato. Entretanto com o aumento da concentração do substrato a velocidade inicial da reação se reduz, não sendo mais proporcional à concentração do substrato, desta forma a reação é de ordem

mista. Posteriormente, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato e aproxima-se de uma velocidade constante. Nesta faixa de concentração a reação é de ordem zero com relação ao substrato, e a enzima é considerada saturada com seu substrato.

Figura 4: Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação (concentração de enzima constante).

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 com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES, este se rompe para formar a enzima livre e o produto P (reação 1). Essas reações são consideradas reversíveis¹⁸:

A equação de Michaelis-Menten expressa a relação entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, podendo ser facilmente deduzida a partir da reação acima, onde milissegundos após a enzima e o substrato serem misturados, uma concentração ES é obtida e permanece constante enquanto a concentração de S estiver em excesso e k_1 for maior que k_3 . Essa condição é chamada estado estacionário da reação, uma vez que a velocidade de decomposição de ES se iguala à sua velocidade de formação. Reconhecendo que a velocidade de formação de ES é igual à de decomposição de ES, pode-se estabelecer que:

$$K_1 [E] [S] + k_4 [E] [P] = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad (\text{eq. 1})$$

Assim,

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_1[S]}{k_2 + k_3} + \frac{k_4[P]}{k_2 + k_3} \quad (\text{eq. 2})$$

pode-se simplificar a equação 2 considerando-se que no início de reação, ou seja quando a reação 1 estiver deslocada no sentido dos reagentes, a concentração do produto [P] (equação 2) é desprezível. Neste caso, esta pode ser escrita como:

$$\frac{ES}{E} = \frac{k_1[S]}{k_2 + k_3} \quad (\text{eq. 3})$$

As constantes k_1 , k_2 e k_3 podem ser combinadas numa única constante k_m

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = k_m \quad (\text{eq. 4})$$

substituindo k_m na equação 3, obtem-se:

$$\frac{E}{ES} = \frac{k_m}{[S]} \quad (\text{eq. 5})$$

para converter $[E]$ e $[ES]$ em valores mais facilmente mensuráveis, considera-se que a concentração total de enzima $[E]_t$, na solução, consiste da enzima $[E]$ que está livre mais aquela que está combinada com o substrato, $[ES]$. Assim tem-se que $[E] = [E]_t - [ES]$, e substituindo $[E]$ na equação 5, obtem-se:

$$\frac{[E]_t - [ES]}{[ES]} = \frac{k_m}{[S]} \quad (\text{eq. 6})$$

Rearranjando a equação 6 obtém-se a 7:

$$\frac{[E]_t}{[ES]} = \frac{k_m}{[S]} + 1 \quad (\text{eq. 7})$$

Considerando que a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) é atingida quando o centro ativo das enzimas estiverem completamente saturados com o substrato, a velocidade inicial (V) será então proporcional à concentração de enzima presente, assim temos:

$$\frac{V_{\text{máx}}}{V} = \frac{[E]_t}{[ES]} \quad \text{e,} \quad (\text{eq. 8})$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{V} = \frac{k_m}{[S]} + 1, \text{ isolando } V, \text{ obt\^em-se a eq. de Michaelis-Menten} \quad (\text{eq. 9})$$

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{eq. 10})$$

onde, V é a velocidade observada a uma dada concentração substrato [S], Km é a constante de Michaelis, expressa em unidades de concentração (mol L⁻¹), Vmáx é a velocidade máxima na concentração de saturação do substrato¹⁹

1.3 - Biossensores

Nos últimos anos o desenvolvimento de biossensores tem atraído grande interesse devido à sua aplicação em um grande número de procedimentos analíticos e como sensores específicos que permitem a monitoração e o controle de processos bioquímicos²⁰.

Um biossensor consiste de um material de origem biológico, tais como: enzimas, organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, entre outros, imobilizado em um suporte, conectado a um sensor base (transdutor) que converte o sinal biológico em sinal elétrico. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa). Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico ou de afinidade.

A Figura 5 ilustra o funcionamento de um biossensor baseado na imobilização da enzima sobre um substrato condutor (como, por exemplo, um eletrodo de grafite pirolítico).

Figura 5: Esquema de funcionamento de um biossensor. Aqui, S é o substrato da enzima, P o produto de reação enzimática.

Entre os biossensores eletroquímicos, os amperométricos e potenciométricos tem sido os mais utilizados²¹. Os amperométricos baseiam-se nas medidas de intensidade de corrente em uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação de oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas na superfície sensível, proporcional à concentração do analito. Nessa técnica, usualmente o potencial de eletrodo de trabalho (biossensor) é mantido constante em relação ao eletrodo de referência (e.g. Ag/AgCl, Hg/Hg₂Cl₂). A corrente resultante medida é correlacionada com a oxi-redução do produto da reação enzimática (por exemplo o H₂O₂).

Nas medidas potenciométricas, a magnitude do potencial medido é decorrente da diferença de potencial entre um eletrodo indicador (biossensor) e um eletrodo de referência. A diferença de potencial entre o eletrodo indicador e

o de referencia é proporcional ao logaritmo da atividade do íon ou da concentração deste analito.

Uma das etapas mais importantes para a construção de biossensores é a escolha da enzima, pois essa escolha tem que ser de tal forma que a enzima reaja com a substância a ser analisada²², ou seja, as enzimas reagem seletivamente com o analito, por exemplo: os biossensores montados com a enzima aldeído dehidrogenase, são utilizados para a determinação de fungicida, como ditiocarbamatos, já a carboxilase é usada para detectar as aminas primárias e os compostos organofosforados, outro exemplo é a acetilcolinesterase que é utilizada tanto para a determinação de organofosforados quanto de carbamatos.

1.3.1 - Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma enzima capaz de degradar 300 mil moléculas de acetilcolina (principal neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático) por minuto. Sua inibição resulta no acúmulo desse neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central, nas junções neuromusculares, nas terminações nervosas parassimpáticas e em algumas das simpáticas, como as glândulas sudoríparas. Isso pode causar a chamada ‘tempestade parassimpática’. Nesse caso, uma alta disponibilidade de acetilcolina é oferecida sem controle a seus receptores. A Figura 6 mostra em esquema da ação da acetilcolinesterase no organismo, nesta figura, a parte superior representa a terminação de um prolongamento neuronal e na inferior uma base larga representa o prolongamento subsequente. O espaço livre é o espaço intersináptico. No cérebro existem cerca de três bilhões de sinapses. No terminal pré-sináptico forma-se a acetilcolina (Ach) a partir de substâncias precursoras como a colina que chegam às células pela alimentação. Os pontos pretos representam as vesículas de Ach, que ficam armazenadas no terminal e liberam o neurotransmissor no espaço intersináptico quando ocorre o estímulo, como por

exemplo para memorizar alguma coisa. Uma vez liberada a Ach liga-se às moléculas receptoras do terminal pós-sináptico que, por ser de dois tipos (muscarínicos-M e nicotínicos -N) aparecem representados por retângulos e triângulos. A união da Ach com seu receptor permite que o estímulo seja transmitido para o neurônio pós-sináptico.

Figura 6: Esquema do funcionamento da ACh/AChE no organismo

Desta forma, é necessário que a acetilcolina seja removida deste receptor antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal liberando mais acetilcolina. Assim, a enzima acetilcolinesterase é responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina, liberado nos receptores sinápticos do sistema nervoso, esta reação pode ser vista no esquema 2.

Nesta reação as cadeias laterais de aminoácidos exercem importantes funções na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico. O primeiro passo, em qualquer reação envolvendo catálise enzimática, é a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Isto é facilitado pelas interações entre o substrato e as cadeias laterais amino-acila na enzima. Em geral, estas interações não são covalentes e incluem atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e atrações de van der Waals. Os fragmentos carregados negativamente podem interagir de maneira favorável com os grupos amino, carregados positivamente. O fragmento histidina está próximo do fragmento serina e pode estabilizar a conformação do sítio ativo através de ligações de hidrogênio.

Como a colina pode ser oxidada em baixos potenciais, esta enzima é uma das mais utilizada para a construção de biossensores utilizados na determinação de pesticidas das classes dos carbamatos e organofosforados⁴⁷⁻⁶⁵. Neste caso, a determinação destes pesticidas é relacionada com a inibição da ação da

acetilcolinesterase (AChE) pela adsorção irreversível da molécula do pesticida no sítio ativo da enzima. Inicialmente, a oxidação eletroquímica do produto da eletrólise enzimática destes compostos 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. Esta reação de inibição pode ser vista no esquema abaixo, onde o sítio ativo da enzima é ocupado por pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos.

Um indivíduo intoxicado agudamente por qualquer inibidor de acetilcolinesterase pode morrer, principalmente pelo ‘afogamento’ em suas próprias secreções, que o impossibilita de respirar. Já as pessoas expostas ocasionalmente podem desenvolver sintomas crônicos de difícil diagnóstico, relacionados a distúrbios no sistema nervoso central²³.

1.3.2 - Imobilização da enzima

Uma das maiores dificuldades, na confecção de biossensores enzimáticos, está relacionado com a estabilidade da molécula biológica. Fora do seu ambiente bioquímico, a proteína, da qual a enzima faz parte, tende, naturalmente, a se desnaturar, perdendo seu poder catalítico. Assim, a atividade enzimática diminui com o tempo, matando o desempenho do biossensor.

Esta dificuldade pode ser diminuída pela imobilização adequada da molécula da proteína, o que diminui a velocidade de desnaturação da proteína. Desta forma, um passo muito importante para construção do biossensor é a imobilização da enzima, pois a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo. Dentre os métodos de imobilização, os mais utilizados na construção de biossensores tem sido²⁴:

Ligação covalente: este tipo de imobilização é realizada 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, biscloreto 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 e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais. A imobilização da enzima com glutaraldeído é freqüentemente empregada, pois se observa boa estabilidade da enzima frente as variações de pH, força iônica, solventes e temperatura.

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, fenilenodiimida, 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 excelente adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, vidro, etc. Como desvantagem o material biológico adsorvido é extremamente dependente dos fatores como pH, solvente, temperatura, etc.

Estes processos têm sido muito utilizados ultimamente para a análise de diferentes pesticidas como: Aldicarbe, Carbaril, Carbofuran, Metomil e Propoxur^{25, 26}, Paraoxon, Diclorvos e Malation²⁷ e os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético e 2,4,5-triclorofenoxiacético²⁸.

1.4 - Eletrodo de pasta de carbono

Os eletrodos preparados à base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície.

Adams²⁹ desenvolveu o primeiro eletrodo de pasta de carbono em 1958. Esse eletrodo foi construído no intuito de se obter um sistema que viesse a substituir a eletrodo gotejante de mercúrio, de superfície igualmente renováveis,

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. Primeiramente ele testou um eletrodo gotejante de pasta de carbono, constituído de uma mistura de 1g de carbono e 7mL de tribromometano. Entretanto, o emprego deste eletrodo não foi possível devido á alta resistência elétrica proveniente do composto líquido orgânico (tribromometano). Posteriormente Adams *et al.*³⁰, estudaram o efeito da composição da pasta de carbono, empregando deferentes tipos de pó de grafite e aglutinantes (hidrocarbonetos líquidos), os aglutinates variaram de 15 a 40% m/m da composição da pasta. Desde então foram realizados vários estudos da eletroquímica básica voltada para a caracterização do próprio eletrodo. Desta forma, os eletrodos de pasta de carbono passaram a serem utilizados nos estudos eletroquímicos e/ou determinação analíticas.

1.4.1 - Eletrodos de pasta de carbono modificados

Os eletrodos de pasta de carbono modificados consistem basicamente de uma mistura de pó de grafite, aglutinante e um modificador específico. Para a preparação da pasta de carbono este deve ter alta pureza, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e apresentar uma distribuição granulométrica uniforme. O aglutinante (serve para dar consistência na pasta) deve ser quimicamente inerte, eletroinativo, imiscível com a água e não conter impureza. Uma das principais vantagens da pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. A maioria dos modificadores utilizados nestes eletrodos, proporcionam um aumento no desempenho analítico do eletrodo.

A utilização de eletrodo de pasta de carbono modificado se deu por volta de 1964, quando Kuwana *et al.*³¹, estudaram o comportamento eletroquímico dos compostos ferroceno, antraquinona e 5-aminobenzofenona em preparação da pasta de carbono, sendo o próprio composto orgânico usado como aglutinante.

O primeiro biossensor de pasta de carbono foi proposto por Matuszewski *et al.*³² em 1988, utilizando a enzima glicose oxidase diretamente misturada na pasta de carbono, composta de pó de grafite e óleo de silicone. Wang *et al.*³³ desenvolveram em biossensor de pasta de carbono empregando tecido vegetal como fonte enzimática. Esses biossensores podem ser caracterizados utilizando-se técnicas eletroquímicas tais como: voltametria cíclica, voltametria de pulso normal e diferencial, cronoamperometria.

1.5 – Teoria do método

1.5.1 - Técnicas Eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas possibilitam a relação entre a concentração do analito e algumas propriedades elétricas como: corrente, potencial, condutividade, resistência e carga elétrica³⁴. Estas técnicas são utilizadas para o estudo da influencia das variações de potenciais sobre as correntes elétricas que fluem por uma célula eletroquímica e também no estudo da influencia dos potenciais elétricos com relação à variação de tempo quando saltos de potenciais são aplicados.

Em geral essas técnicas utilizam três eletrodos para a realização das análises. O eletrodo de trabalho, onde se varia o potencial, podendo ser constituído de platina (Pt), ouro (Au), mercúrio (Hg), grafite, fibra de carbono etc. O eletrodo de referencia, possui um potencial constante e podendo ser de prata-cloreto de prata (Ag/Ag/Cl), eletrodo de calomelano saturado (Hg/Hg₂Cl₂)

ou hidrogênio (H_2), dependendo do meio em que se trabalha. O ultimo é o eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, que é por onde circulam os elétrons envolvidos nos processos de redução e ou oxidação, geralmente é constituído de um metal inerte como a platina.

Essas técnicas surgiram como alternativas para detecção e quantificação de poluentes ambientais, pois além de simples e de baixo custo, elas oferecem a possibilidade de se realizar medidas mais confiáveis após um pré-tratamento mínimo das amostras, além disto, ainda é possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas³⁵.

Considerando-se todas as vantagens apresentadas pelas técnicas eletroanalíticas, quando comparadas com as técnicas cromatográficas e espectroscópicas, elas ainda possuem uma grande sensibilidade à presença de interferentes. Isso tornou seu uso mais freqüente, e ainda incentivou o surgimento de diversos tipos de técnicas, cada qual mais sensível e com diferentes vantagens e tipos de aplicações.

1.5.1.1 - Voltametria cíclica

Uma das mais versáteis e antigas técnicas voltamétricas é a voltametria cíclica (VC), onde uma variação de potencial de forma triangular é imposta ao eletrodo de trabalho, de maneira que a varredura se inicia no potencial (a) seguindo até o potencial de inversão (b) e retornando, geralmente ao potencial inicial (c). Esta forma de variação de potencial é apresentada na Figura 7, onde também é apresentada a curva de corrente-voltagem obtida, que é chamada de voltamograma.

Figura 7: Forma de aplicação do potencial (1) com, a) varredura direta, b) potencial de inflexão e c) varredura inversa, e resposta de corrente–voltagem na voltametria cíclica (2).

Apesar de ser uma técnica que possibilita estudos envolvendo cinética e mecanismos de processos redox, a VC não fornece resultados satisfatórios considerando-se análises de traços de contaminantes. Com isto, outras técnicas voltamétricas começaram a ser utilizadas para tais objetivos, sendo as técnicas de pulso as que apresentam as melhores respostas voltamétricas, já que minimizam os efeitos negativos provenientes da corrente capacitiva, que é uma das responsáveis pela baixa sensibilidades das técnicas lineares³⁶.

1.5.1.2 - Voltametria de onda quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada é a combinação de uma modulação de onda quadrada de grande amplitude com uma rampa de potenciais em forma de “escada”.

A Figura 8 apresenta as formas de apresentação da onda quadrada, onde uma onda quadrada simétrica (amplitude ΔE_p) sobreposta a uma “escada de

potenciais” (incremento ΔE_s), sendo que um período completo da onda quadrada ocorre para cada período (τ) da “escada de potenciais”. A largura do pulso, ou $\tau/2$, é denominada t_p e a frequência, $1/\tau$, é designada por f ^{37,38}. Portanto a SWV é uma série de pulsos de potenciais diretos (sentido da varredura) e reversos (sentido oposto ao da varredura), sincronizados com amostragens de corrente na última porção de cada meio período da onda quadrada, quando a corrente capacitiva pode ser considerada desprezível.

Figura 8 : Formas de onda empregadas e obtidas na voltametria de onda quadrada. (a) forma de onda da rampa em “escada”, (b) forma de onda da onda quadrada, (c) forma de onda da voltametria de onda quadrada, (d) forma de onda da corrente total e (e) corrente diferencial total.

A corrente direta (I_d) é medida no tempo t_{n-1} ($n > 1$), imediatamente antes que o pulso reverso seja aplicado. A corrente reversa (I_r) é medida no tempo t_n . A diferença de corrente ($\Delta I = I_d - I_r$), às vezes denominada diferença direta de

corrente, é registrada como função do potencial médio de cada período da rampa de potenciais. A Figura 9, apresenta a forma de aplicação do potencial na SWV e um voltamograma teórico resultante para um sistema totalmente reversível³⁹.

Figura 9: (1) Forma de aplicação do potencial na SWV e (2) Voltamograma de onda quadrada teórico, para um sistema totalmente reversível.

A SWV apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas. Do ponto de vista prático a facilidade da apresentação do pico simétrico com maior intensidade de corrente e a facilidade em medir as correntes faradaicas num intervalo de tempo em que as correntes capacitivas são negligenciáveis⁴⁰. Outra vantagem muito importante está relacionada com a velocidade de varredura, que é dada em função do incremento de varredura de potencial e a frequência de aplicação dos pulsos de potencial, possibilitando trabalhar com velocidades de até 1 V s^{-1} . Como a corrente de pico é em função da velocidade, a sensibilidade da técnica se torna muito alta, podendo chegar a $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, dependendo do sistema. Adicionalmente, observando-se o sinal das varreduras diretas e reversas, é possível conseguir informações mecanísticas mais precisas que aquelas obtidas com a voltametria cíclica. Além disso, a SWV não possui a mesma limitação da VC, onde os sistemas irreversíveis são pouco atrativos visto

que sua sensibilidade e resolução diminuem, pois são dependentes da corrente de pico⁴¹.

Dentre as técnicas de pulso, a voltametria de onda quadrada (SWV) é uma das mais modernas, podendo ser usada para investigações analíticas ou cinéticas⁷.

1.5.1.3 - Análise Coulometrica

As técnicas eletroquímicas a potencial controlado, baseiam-se em situações dinâmicas (fluxo de corrente). Neste caso, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho é empregado para “forçar” uma mudança nas concentrações das espécies eletroativas na superfície do eletrodo por meio de um processo de oxidação ou redução eletroquímica. A corrente resultante desse processo redox é medida como uma função do tempo ou dos potenciais aplicados. O objetivo é obter informações termodinâmicas, cinéticas e analíticas, dentre outras⁴².

A coulometria a potencial controlado (com eletrodos de trabalho, referencia e auxiliar) é baseada na contagem do número de elétrons envolvidos em uma reação química. A corrente diminui exponencialmente à medida que a concentração do constituinte em análise diminui. Como a corrente não é constante, a carga é medida pela integração da corrente sobre o tempo da reação (equação 11)⁴³.

$$Q = \int_0^t Idt \quad (\text{eq. 11})$$

Dentre as técnicas coulométricas a cronoamperometria é uma das mais importantes para utilização com biossensores (chamado de biossensor

amperométrico), onde o potencial aplicado ao biossensor promove a reação eletroquímica com o produto da reação enzimática, quantificando-o.

1.6 - Síntese Bibliográfica

A aplicação de técnicas eletroanalíticas, na determinação de pesticidas, tem surgido como a tentativa de resolver os problemas de custo, manipulação e tempo. Estas têm sido aplicadas de duas maneiras, na determinação direta, com eletrodos de mercúrio, ou com a utilização de eletrodos modificados.

O trabalho considerado pioneiro utilizando-se biossensores foi publicado em 1962 por Clark e Lyons⁴⁴, eles determinaram amperometricamente a glicose, usando a enzima *glicose oxidase* imobilizada dentro de membranas de cuprofone (celulose recuperada) e acoplada a um eletrodo de O₂.

Guilbault e Montalvo⁴⁵ em 1969 construíram o primeiro biossensor potenciométrico para a uréia imobilizando a urease em uma matriz de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro seletivo a íons amônio. Após estes trabalhos, surgiram muitos outros envolvendo a construção e utilização de biossensores.

1.6.1 - Detecção de carbamatos utilizando biossensor

A utilização de biossensores à base da enzima colinesterase para a determinação de pesticidas, principalmente da classe dos carbamatos, vem crescendo com o passar do tempo. Alguns desses trabalhos podem ser vistos abaixo.

Skládal⁴⁶ desenvolveu um biossensor amperométrico para a determinação de organofosforados e carbamatos, baseado na pasta de carbono modificada com ftalocianina de cobalto coberto com uma membrana da enzima colinesterase

(utilizou-se glutaraldeído como ligante). Este eletrodo permite aproximadamente vinte medidas com cada membrana. Os limites de detecção para os pesticidas Hostaquick® e o Seedox® foram de 0,3 e 8,0 mg L⁻¹ respectivamente.

Outro eletrodo desenvolvido por Skládal⁴⁷ para a detecção de organofosforados e carbamatos é constituído de um composto de carbono modificado com ftalocianina de cobalto e adição de uma camada da enzima colinesterase por ligações cruzadas. O substrato utilizado foi o butiriltiocolina, produzindo a tiocolina que pode ser oxidada no potencial de 250mV. Os limites de detecção foram de 0,3, 1,2 e 11,0 nmol L⁻¹ para o paraxon, diclorvos e carbaril, respectivamente.

Nunes *et al.*¹⁰ desenvolveram um biossensor amperométrico para a determinação de inseticidas carbamatos (aldicarbe, carbaril, carbofuram metomil e propoxur) em amostras de vegetais, baseado na imobilização da butiril ou acetilcolinesterase (solução contendo enzima, soro albumina bovina e glutaraldeído) sobre a superfície de um eletrodo de grafite. Os limites de detecção variaram de 1x10⁻⁴ a 3,5 mg Kg⁻¹. As amostras de batata e cenoura foram fortificadas em três níveis de concentração para o carbofuran (10, 50, 125 µg Kg⁻¹) e as recuperações foram de 28, 34 e 99% para a batata e 140, 90 e 101 % para a cenoura, respectivamente.

Outro trabalho realizado por Nunes *et al.*⁴⁸ utilizou o biossensor amperométrico para a determinação do pesticida carbamato em amostras de águas, frutas e vegetais. O eletrodo (biossensor) foi modificado por uma camada de pasta de carbono misturada com ftalocianina de cobalto e acetilcelulose. A enzima acetilcolinesterase foi imobilizada nesta camada. Os limites de detecção encontrados para o carbaril variaram de 0,5-2500 µg L⁻¹. As recuperações foram: 109, 116, 125, 107 % para as amostras de pêssgo, laranja, cenoura e feijão verde respectivamente.

Campanella *et al.*⁴⁹, utilizaram um eletrodo de enzima na fase orgânica (OPEE), desenvolvido para o uso em pesticidas da classe dos organofosforados

e carbamatos. As enzimas acetil e butiril-colinesterase foram imobilizadas em gel e foi utilizado um eletrodo de difusão de gás para oxigênio. Os resultados mostraram que os limites de detecção para os pesticidas aldicarbe ou propoxur são próximos de 4,5 µg/L.

Xavier *et al.*⁵⁰ desenvolveram um biossensor de fibra óptica para a determinação dos pesticidas propoxur e carbaril, baseado na inibição da acetil-colinesterase. O indicador de pH vermelho de clorofenol é usado como transdutor óptico da inibição da enzima acetil-colinesterase pelo analito. O elemento é covalentemente imobilizado dentro de esferas de vidro de porosidade controlada (CPG) e empacotada em um bioreator termostatizado conectado a uma cela de fluxo que contém CPG-imobilizado. Os pesticidas foram analisados em vegetais e os limites de detecção obtidos foram de 0,4 ng/L para o propoxur e 25,0 ng/L para o Carbaril.

Wilkins *et al.*⁵¹, desenvolveram um biossensor amperométrico (acetil-colinesterase) baseado na reação tiocolina-hexacianoferrato para a determinação de organofosforados em solvente orgânico puro. A enzima acetil-colinesterase foi co-imobilizada com o mediador azul da Prússia, na superfície do eletrodo de grafite. A habilidade do biossensor (acetil-colinesterase) para a determinação de pesticidas foi demonstrada pela determinação de diclorvos, fention e diazinon em etanol. A determinação foi realizada em concentrações sub-micromolar com tempo de análise de 10 minutos. Os limites de detecção obtidos para o diclorvos, fention e diazinon são $0,5 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L¹ respectivamente.

Schulze *et al.*⁵² desenvolveram biossensores “screen-printed” adequado para a determinação de pesticidas em amostras de alimento infantil. Os biossensores apresentaram uma recuperação de 104%, com o efeito da matriz minimizado usando um pré-tratamento especial no eletrodo. Os testes apresentaram excelente recuperação com excelentes níveis de reprodutibilidade para a análise de traços. A validação foi realizada por comparação com

resultados obtidos com os métodos cromatográficos convencionais (GC-MS, LC-MS).

Ivanov *et al*⁵³. utilizaram um biossensor baseado na imobilização da enzima colinesterase sobre eletrodos de carbono vítreo e grafite epóxi, modificados com polianilina para a determinação de pesticida. A superfície modificada com polianilina é provida de alta estabilidade e sensibilidade operacional. Os limites de detecção foram: 0,002; 0,04; 0,03 e 0,08 mg L⁻¹, respectivamente para coumafós, tricorfon, aldicarbe e metilcarbe. Este método pode ser utilizado para a determinação de poluentes em águas.

Kok *et al*⁵⁴. desenvolveram um biossensor a base das enzimas acetilcolinesterase e colinaoxidase co-imobilizadas na membrana poli(2-hidroxietil metacrilato) para a determinação da aldicarbe. As enzimas imobilizadas têm um longo tempo de estabilidade (somente 15% da atividade decresce com 2 meses de armazenamento). Observaram-se duas correlações lineares (10-500 e 10-250 ppb) para o aldicarbe e as concentrações encontradas foram 23 e 12 ppb respectivamente.

Shim *et al*⁵⁵ obtiveram o extrato de acetilcolinesterase de abelhas (*Apis Mellifera*) que foi utilizado para determinar os limites de detecção de carbamatos e organofosforados que variaram de 0,02 à 0,80 µg L⁻¹ e 0,70 à 0,95 µg L⁻¹, respectivamente. Também foram realizadas análises de recuperação em frutas e vegetais e os valores encontrados variaram de 78,6 a 91,1 % e 77,3 a 91,2 % para os carbamatos e organofosforados respectivamente.

Boni *et al*⁵⁶. imobilizaram a enzima acetilcolinesterase em membrana de Nylon®, para a medida de atividade da acetilcolinesterase, após a inibição pelo pesticida organofosforado paraoxon. As medidas foram realizadas após a incubação, apresentando boa reprodutibilidade, com limite de detecção de 0,1 µg L⁻¹. Essas análises podem ser aplicadas para frutas e vegetais.

Weetall *et al*⁵⁷. determinaram um método para detecção de inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos, utilizando a enzima

acetilcolinesterase imobilizada na membrana material Porex® Lateral-Flo™ . O limite de detecção encontrado para o paraoxon foi de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Bucur *et al.*⁵⁸ utilizaram dois novos métodos de imobilização para acetilcolinesterase ambos sobre em eletrodo “screen-printed” (SPE) como transdutor. Esses métodos foram descritos e comparados: o primeira é baseado na afinidade da enzima por metal quelato (MCA) e o segundo por “concanavalin A” (con A) um resíduo de açúcar ligado à lectina. Ambos obtiveram resposta linear para o substrato, entre 10 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o sensor concanavalin A e entre 1 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ com o sensor MCA. O sensor otimizado foi usado para estudar o efeito da inibição de pesticidas organofosforados na atividade da acetilcolinesterase imobilizada. Limite de detecção de clorpirorfos foi de $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o paraoxon, alcançados para o sensor com A e MCA respectivamente.

Bucur *et al.*⁵⁹ construíram um biossensor amperométrico para a detecção de inseticidas carbamatos (aabaril e pirimicard) baseado na inibição da acetilcolinesterase imobilizada em uma matrix de sol-gel por “scren-printer e TCNQ (7,7,8,8-tetracianoquinodimetano) como mediador. O biossensor foi aplicado para análises de água potável.

Zou *et al.*⁶⁰, imobilizaram a acetilcolinesterase por oclusão física em polivinilpirrolidona. A imobilização da enzima foi testada quanto à estabilidade da enzima, solubilidade, influência do pH do tampão e características da reatividade com os inibidores, compostos organofosforados e carbamatos. Os resultados mostraram que a atividade permanece original, suficientemente estável e conveniente para a operação. Pode ser usado juntamente com um analisador de pesticida portátil.

Alguns trabalhos envolvendo a análise em fluxo para a determinação de carbamatos utilizando a enzima acetilcolinesterase também foram encontrados como pode ser visto abaixo:

Pogacnik *et al.*⁶¹.determinaram organofosforados (paraoxon, clorpirifós, diazinon) e carbamatos (carbaril, carbofuran) em águas dopadas e sucos de frutas utilizando biossensor fototermico. O biossensor consistiu de um cartucho contendo enzima imobilizada (acetilcolinesterase) para análises de injeção em fluxo (FIA) com detector fototérmico. Com isso aproximadamente 0,2 ng/mL de propoxur pode ser determinado em menos de 15 min. Para os outros organofosforados (clorpirifós, diazinon) e carbamatos (carbaril, carbofuran) os limites de detecção variaram entre 1 ng a 4 µg/L.

Dănet *et al.*⁶² utilizaram o sistema de FIA na análise de águas baseados na inibição da acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados com determinação espectofotométrica da tiocolina com reagentes de Elman's. A enzima foi imobilizada em esferas de vidro aminado dentro do reator e reativado com 2-PAM após a inibição. O gráfico de calibração apresentou linearidade entre 2 e 70 µmol L⁻¹ de paraoxon com tempo de incubação de 20 min. O limite de detecção foi de 1,3 µg L⁻¹. O método foi usado com amostras de águas reais.

Suwansa-ard *et al.*⁶³ utilizaram dois sistemas de injeção em fluxo usando um biossensor descartável para a determinação de pesticidas carbamatos em amostras de águas. A acetilcolinesterase foi imobilizada numa sílica por ligações covalentes. Os pesticidas testados foram o carbofuran e carbaril. Os limites de detecção obtidos para os sistemas potenciométricos e condutimétricos foram correspondentes a 0,02 e 0,3 ppm de carbofuran e carbaril respectivamente. As percentagens de inibição para ambos reatores foram reprodutíveis e as recuperações do carbaril foram de 80-106% para o sistema potenciométrico e 75-105% para o sistema condutométrico.

Jin *et al.*⁶⁴ também utilizam sistemas de injeção em fluxo para a determinação de pesticidas organofosforados e carbamatos. A fluorescência foi estudada e usada como indicador de pH para detectar a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A percentagem de inibição da atividade da enzima é correlacionada à concentração do pesticida. Os limites de detecção foram de 3,

5; 50; 12 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o carbufoforam, carbaril, poraoxun e diclorvos em água pura, respectivamente, com tempo de incubação de 10 minutos. A detecção foi aplicada para o carbofuran em amostras de sucos, as recuperações variaram de 93,2 e 107%.

1.6.2 - Determinação de carbamatos utilizando HPLC

Os inseticidas carbamatos também são muito estudados por cromatografia líquida de alta eficiência e alguns desses trabalhos podem ser vistos abaixo.

Bogialli *et al*⁶⁵. utilizaram a técnica de dispersão da matriz em fase sólida para a extração seguida da cromatografia líquida com espectro de massa para a determinação de pesticidas da classe dos carbamatos em amostras de espinafre, maçã, tomate, etc. Os compostos foram extraídos das matrizes com água aquecida a 50 °C. Os limites de detecção obtidos variaram entre 2 e 10 ppb. As recuperações para o aldicarbe nas amostras de maçã e tomate foram de 79 e 78% e para o carbaril 83 e 82 % respectivamente.

Outro trabalho apresentado utilizando a cromatografia líquida, foi o desenvolvido por Granby *et al*.⁶⁶ que determinaram um método para a análise de carbamatos (dentre esses encontra-se o aldicarbe e carbaril) e outros pesticidas polares por cromatografia líquida - espectrometria de massa (LC-MS-MS) com ionização por eletro spray. Esse método é baseado na extração por ultrasonicação usando tampão acetato de amônio/ácido acético em meio metanólico. Os métodos têm sido validados em amostras de maçã, cenoura, batata etc., e os valores de recuperação variaram de 70 a 120%. Para o carbaril na maçã a recuperação foi de 86%.

Zhang *et al*.⁶⁷, utilizaram CG-MS com monitoramento íon seletivo para a determinação de cinco pesticidas (promecarb, propam, carbaril, metilcarb e clorpropam) em água, aplicando a micro extração em fase líquida. O método

proposto apresentou linearidade de 1 - 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ com reprodutibilidade de 4,86 – 7,81% . Os limites de detecção variaram de 0,2 – 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ com GC-MS de íon. Este método foi aplicado para a determinação de carbamatos em água.

Desta pequena revisão bibliográfica, pode-se observar a quantidade de trabalhos sobre o desenvolvimento e aplicação de biossensores na determinação de pesticidas em diferentes matrizes. Pode-se verificar que este é um importante e atual tema de pesquisas em todo o mundo. Entretanto, é surpreendente o pequeno número de trabalhos envolvendo os biossensores construídos com o eletrodo de pasta de carbono modificado. Verifica-se assim, uma necessidade de trabalhar nesta área. Visando aproveitar as vantagens inerentes a estes eletrodos, como por exemplo, a possibilidade de se modificar do volume do eletrodo e não apenas a superfície.

2 – OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a preparação e caracterização do biossensor enzimático baseado na enzima acetilcolinesterase imobilizada em um eletrodo de pasta de carbono, para determinação de pesticidas da classe dos carbamatos em diferentes matrizes de alimentos: Para isto, o biossensor será otimizado e caracterizado por técnicas eletroquímicas e de UV-vis e a seguir, aplicado na determinação de carbaril e metomil em amostras de tomate, maçã, couve, laranja e leite de soja.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos, juntamente com sua pureza e origem estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Material	Fórmula Química	Procedência	Pureza %
Aceticolinesterase (AChE)	—	Sigma	—
Iodeto de acetiltiocolina (AcSChI)	C ₇ H ₁₆ NOSI	Sigma	—
Iodeto de acetilcolina (AChI)	C ₇ H ₁₆ NO ₂ I	Sigma	—
Fosfato dissódico 2-hidratado	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	Merck	99,00
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Merck	85,00
Nitrato de Prata	AgNO ₃	Merck	99,80
Metanol	CH ₃ OH	Merck	HPLC
Ácido Clorídrico	HCl	Merck	37,00
Cloreto de Potássio	KCl	Mallinckrodt	99,60
Fenitrothion	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	Bayer	96.70
Carbaril	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	Bayer	99,30
Aldicarbe	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	Riedel-de Haën	99,80
Metomil	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	Chem Service	99,00
Lannate®	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	Du Pont	21,50
Acetonitrila	C ₂ H ₃ N	J.T. Backer	99,90
Acetato de etila	C ₄ H ₈ O ₂	Synth	99,50
DTNB*	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	Sigma	—

* DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))

3.2 - Preparação de soluções

O conteúdo protéico foi determinado utilizando-se uma solução estoque de sulfato de cobre 1% diluída em meio aquoso. A partir dessa preparou-se uma solução 0,21% de sulfato de cobre em hidróxido de sódio 30%. Para a solução da soroalbumina bovina (SAB), 0,0079 g foi diluído em 10,00 mL de água. A solução da enzima foi preparada adicionando-se 4,20 mg da enzima a 1,00 mL de água.

A cinética da reação enzimática para o cálculo da atividade e as medidas de estabilidade tanto para o substrato (AcSChI) quanto para enzima (AchE) foram realizadas utilizando-se soluções estoque de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, substrato iodeto de acetiltiocolina (AcSChI) $1,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e solução enzimática contendo 1,18 U (4,20 mg em 1,00 mL tampão fosfato), todas preparadas em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,4$.

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se a solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (AcSChI) em diferentes concentrações, sendo que inicialmente as medidas partiram de uma solução estoque de $1,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (para realização das medidas as amostras foram diluídas a partir desta solução diretamente no tampão fosfato) e posteriormente as medidas foram realizadas em uma concentração de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada diretamente em 10,00 mL de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,4$. As adições dos pesticidas carbaril, metomil e aldicarbe, partiram de soluções estoque de concentração $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetonitrila. Todas as outras soluções foram preparadas a partir dessa com água purificada, em sistema Milli-Q, procedência Millipore Corporation.

Para as análises da reação enzimática em solução, preparou-se uma solução estoque do substrato AchI de $5,40 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução estoque contendo 1,23 U da enzima acetilcolinesterase em 1,00 mL de solução em

tampão fosfato. As adições dos pesticidas fenitrothion e Carbaril na célula eletroquímica partiram de soluções estoque na concentração de $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Foram utilizadas pipetas automáticas de 100 e 1000 μL (Gilson) e 5 e 10 mL (Boeco), todas com ponteiros volumétricas descartáveis de polietileno.

Todo material de vidro utilizado passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas medidas. Primeiramente, lavou-se todo o material, e logo após, o mesmo permaneceu imerso por 30 minutos em uma solução de ácido nítrico 10 %, enxaguado exaustivamente e deixado ferver por 1 hora em água destilada.

3.3 - Instrumentação utilizada

As soluções tiveram seus valores de pH ajustados por um Titroprocessor 682 da Metrohm e um eletrodo combinado de vidro da Digimed – Instrumentação Analítica. O Titôprocessor era calibrado diariamente com tampões comerciais de pH 4 e 7 também da Metrohm. As pesagens foram feitas em uma balança analítica Mettler AB204.

O conteúdo protéico, a cinética da reação para o cálculo da atividade da enzima e as medidas de estabilidade da enzima e do substrato foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HITACHI U-2001 acoplado a um microcomputador IBM-PC contendo o software Spectracalc (Galactia Ind. Co.). As cubetas de quartzo utilizadas nos experimentos possuíam caminho óptico igual a 1,00 cm.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato / galvanostato, EG&G PARC modelo 283 acoplado a um microcomputador com o programa M-270 também da EG&G PARC. Para o controle da temperatura utilizou-se um termostato da Tecnal modelo TE-184.

Para a comparação das metodologias, utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modelo LC-10AT da Shimadzu acoplado a um detector espectrofotométrico UV-vis SPD-10AVP.

3.4 - Eletrodos

O preparo do eletrodo enzimático foi realizado utilizando uma massa de 0,18 g de pó de grafite (Acheson-38 da Fisher), misturada a $0,90 \times 10^{-3}$ g de ftalocianina de cobalto (CoPC) e Nujol® como ligante. Desta mistura tomou-se uma massa de $8,80 \times 10^{-2}$ g, e adicionou-se 5,00 µL de glutaraldeído 1% para facilitar a formação das ligações cruzadas entre a enzima e o suporte. Em uma massa de $1,70 \times 10^{-2}$ g dessa mistura colocou-se $2,40 \times 10^{-3}$ g da enzima AchE misturando-se até a homogeneidade, essa pasta foi introduzida no embolo de uma seringa hipodérmica de 0,50 mL (adaptada com um contato elétrico através do embolo) e compactada manualmente.

Para as análises da reação enzimática em solução utilizou-se uma superfície de carbono vítreo de $0,42 \text{ cm}^2$ de área geométrica como eletrodo de trabalho.

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 ou contra eletrodo utilizou-se uma placa de platina de $2,00 \text{ cm}^2$ de área geométrica (Vectra Heraus 99,5% de pureza).

3.5 - Célula Eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando-se uma célula de vidro com camisa, para o controle da temperatura, contendo 10,00 mL

de solução, como mostra a Figura 10. A tampa desta célula foi feita de Teflon® e contém orifícios para acomodar os três eletrodos necessários para a realização das análises.

Figura 10: Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) eletrodo de trabalho, (2) referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4 e 5) entrada e saída de N₂ respectivamente.

3.6 - Metodologia

3.6.1 – Cálculo da atividade e da estabilidade enzimática

As medidas da quantidade protéica foram realizadas pelo método do microbiureto⁶⁸ utilizando-se a proteína soro albumina bovina (SAB). Os espectros de UV-vis para a construção da curva analítica da SAB foram obtidos adicionando-se a uma cubeta de quartzo o complexante (sulfato de cobre), água e sucessivas adições, com diferentes concentrações, da SAB. Para o cálculo do conteúdo protéico adicionou-se a cubeta (contendo apenas o complexante e a água) 25,00 µL da enzima sendo o volume final de 3,00 mL. O branco continha 1,00 mL de complexante e 2,00 mL de água.

A cinética da enzima para o cálculo de atividade e as medidas de estabilidade para a enzima e o substrato foram realizadas utilizando-se espectros de UV-vis, onde colocou-se em uma cubeta, 3,00 mL de tampão fosfato, 20,00 µL de substrato AcSChI, 100,00 µL de DTNB e por ultimo 25,00 µL da solução da enzima. Para o branco adicionou-se a cubeta tampão fosfato, substrato e DTNB. Estas análises são baseadas em duas reações⁶⁹:

Na primeira reação observa-se a formação da tiocolina, que não é detectável no espectro de UV-vis, sendo necessário a utilização do DTNB que ao reagir com a tiocolina (reação 2) forma um produto de coloração amarela (TNB²⁻), possibilitando a detecção.

3.6.2 - Preparação do eletrodo

O primeiro passo na construção do biossensor amperométrico, é a determinação do potencial de trabalho. Neste caso utilizou-se a voltametria de onda quadrada (parâmetros utilizados: amplitude de pulso de 50 mV, incremento de 2 mV e frequência de 50 Hz) para observar o pico de oxidação da AcSChI, bem como na procura do pico de oxidação da tiocolina, e essas medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica contendo 10,00 mL de tampão fosfato e concentração inicial de AcSChI de $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Após encontrar o pico de oxidação da tiocolina, utilizou-se a cronoamperometria para analisar os potenciais próximos e no pico desta, no intuito de se determinar em que potencial ocorreria apenas à oxidação do

produto sem a interferência da oxidação do substrato. Para essas análises utilizou-se potenciais de 0 a 400 mV e observou-se o decaimento de corrente com o tempo. Esta técnica também foi utilizada na análise dos diferentes parâmetros avaliados na construção do biossensor.

Um destes parâmetros é a quantidade de enzima no eletrodo que foi variada de 0,30 a $3,20 \times 10^{-3}$ g referentes à massa de $1,70 \times 10^{-2}$ g da pasta de carbono. Após a imobilização da enzima, o mesmo foi imerso em uma solução contendo $3,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do substrato e mediu-se o sinal.

A quantidade de ftalocianina de cobalto é outro parâmetro a ser analisado, pois esta tem sido combinada com o eletrodo de trabalho modificado, servindo como eletrocatalisador da oxidação da tiocolina, além de aumentar a sensibilidade da técnica. Esta quantidade foi variada em 0,90 e $2,60 \times 10^{-3}$ g, também referente à massa de $1,70 \times 10^{-2}$ g da pasta de carbono. Por último variou-se a porcentagem de glutaraldeído em 1 e 10%, desta solução colocou-se 5,00 µL na pasta de carbono e misturou até a homogeneidade, nestes dois últimos casos o eletrodo foi imerso em uma solução de substrato $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Analizou-se também diferentes concentrações do substrato AcSChI, na faixa entre $6,60 \times 10^{-4}$ a $2,70 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com o intuito de encontrar a melhor resposta em termos de aumento de corrente. Essas medidas foram realizadas partindo da solução estoque do substrato, em um potencial de 100,00 mV, com tempo de análise de 240 segundos cada.

3.6.3 - Determinação eletroquímica

As medidas amperométricas foram realizadas em uma célula eletroquímica com camisa, para o controle da temperatura (30°C), contendo 10,00 mL da solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (AcSChI) $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ e pH = 7,4, essa

solução foi purgada por aproximadamente 2 minutos com nitrogênio super seco. Após a eliminação do oxigênio presente, foram otimizados os parâmetros para a determinação da metodologia. As medidas foram realizadas no potencial de 100 mV.

Para a construção da curva analítica o eletrodo de trabalho ficou imerso em soluções de diferentes concentrações do pesticida. As medidas foram realizadas, antes e após a inibição do eletrodo pelo pesticida, pode-se observar o decaimento da corrente com o aumento da concentração do pesticida.

3.6.4 - Determinação Cromatográfica

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para obtenção da curva analítica do carbaril. Também foram realizadas curvas de recuperação visando à comparação com os resultados obtidos anteriormente pelo biossensor amperométrico. A curva analítica foi obtida pelo método de adição de padrão e as medidas foram realizadas em triplicata.

As medidas de cromatografia líquida de alta eficiência para o carbaril, foram realizadas utilizando, como fase móvel, acetonitrila e água, na proporção de 70:30 v/v e, para o metomil, as proporções foram de 50:50 v/v, ambas com fluxo de 1 mL por minuto e a eluição foi realizada em condição isocrática. Os comprimentos de onda monitorados foram de 220 e 230 nm, respectivamente. A coluna utilizada foi a LiChrosorb[®] RP-18 (5 µm) da Merck.

3.6.5 - Métodos de extrações

3.6.5.1 - Procedimento de extração simples

As recuperações do carbaril utilizando-se o biossensor, tanto para o tomate quanto para a maçã, e do aldicarbe para o tomate, foram realizadas após

uma extração simples. Essa foi realizada triturando-se 40,00 g da amostra e fortificando a mesma com carbaril nas concentrações de $6,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o tomate e $6,00 \times 10^{-6}$ e $1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para a maçã. A essa mistura foi adicionado 2,00 mL de acetonitrila, e homogeneizado por cerca de 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm. Após a obtenção do sobrenadante, a análise foi realizada imergindo o eletrodo nessa solução.

A recuperação da laranja foi realizada apenas dopando 40,00 g desta amostra com o pesticida carbaril, nas concentrações $6,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para as medidas de recuperação do metomil as amostras de tomate e couve-manteiga, foram apenas trituradas e fortificadas com o pesticida nas concentrações $2,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, já o leite de soja foi fortificado diretamente nestas mesmas concentrações. Todas as amostras foram homogeneizadas por aproximadamente 20 minutos, com posterior imersão do biossensor diretamente nestas amostras.

3.6.5.2 - Procedimento de extração por “MSPD”

Para a extração por MSPD além do tratamento realizado a cima, foi necessário pesar 0,50 g dessas amostras juntamente com 0,50 g de C18 e homogeneizar com bastão de vidro em um cadinho. Transferiu-se a amostra para a coluna, de SPE (extração em fase sólida) e adicionou-se 10,00 mL de acetato de etila à mesma, deixando o solvente eluir sob leve pressão. O eluato foi recolhido em um balão volumétrico e, em seguida 1,00 mL dessa solução foi concentrado à secura sob leve corrente de nitrogênio. O resíduo foi diluído em 300,00 µL de acetonitrila e 20,00 µL do foi injetado no cromatógrafo.

Esse processo de extração por MSPD também foi utilizado para fazer medidas com o biossensor, neste caso, o resíduo foi eluído em 10/90% (v/v) de uma mistura de acetonitrila / água.

3.6.6 - Reação em solução

Os parâmetros para a voltametria de onda quadrada foram fixados em amplitude de pulso de 50 mV, incremento de 2 mV e frequência de 50 Hz.

Na construção da curva analítica para o substrato AchI, utilizou-se uma célula eletroquímica contendo 20,00 mL de tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ e pH = 7,4 e diferentes concentrações do substrato.

Para a determinação da velocidade da reação enzimática (AchE/AchI) adicionou-se, à célula eletroquímica, 15,00 mL de tampão fosfato, uma concentração de $2,90 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AchI, e por último 115,00 µL da solução da enzima AchE. Posteriormente, acompanhou-se o decaimento da corrente de pico do substrato em função do tempo de reação. Após a primeira medida sem a presença de pesticidas, adicionou-se, individualmente, os pesticidas fenitrothion e carbaril, ambos nas concentrações $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e observou-se a inibição causada por cada um deles.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os cálculos de atividade da enzima, bem como a construção e aplicação do biossensor enzimático para o desenvolvimento de metodologias para a determinação de pesticidas da classe dos carbamatos. Essas metodologias foram aplicadas na análise de diferentes matrizes de alimentos e comparadas com os resultados obtidas por HPLC. Também serão apresentadas metodologias para a determinação do pesticida aldicarbe e para medidas da velocidade da reação enzimática em solução.

4.1 - Estabilidade do substrato AcSChI em solução

Inicialmente, as biomoléculas utilizadas foram testadas quanto à sua estabilidade em solução, para garantir que os resultados posteriores não possam ser atribuídos apenas à hidrólise do substrato ou decomposição da enzima. Assim, as medidas de estabilidade do substrato em solução foram realizadas por absorção na região do UV-vis e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

Figura 11: A - Espectro de absorção do substrato AcSchI ($1,10 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) com o tempo de estocagem da solução: (—) 1, (—) 3, (—) 6, (—) 11 dias. B - Gráfico de Absorbância por tempo.

Neste espectro pode-se observar que a banda do substrato aparece no comprimento de onda de aproximadamente 225 nm. Nota-se também que em onze dias de análise houve queda de apenas 5,80 % da absorbância do substrato, portanto, o mesmo pode ser armazenado por esse tempo sem que ocorra perda significativa na resposta do biossensor, por decomposição química do substrato.

4.2 - Estabilidade da enzima AchE em solução

A estabilidade da enzima em solução, também foi avaliada, para saber quanto tempo essa solução poderia ser estocada sem que houvesse perda significativa da atividade enzimática. Na Figura 12 observa-se o espectro de absorção da tiocolina (produto de reação entre a enzima e o substrato), que após a reação com o DTNB resultou num produto (reação 3 do procedimento

experimental) que apresenta uma coloração amarela⁶⁹, com absorção em um comprimento de onda de aproximadamente 410 nm.

Figura 12: A - Espectro de absorção da tiocolina em uma solução com DTNB, após vários dias de estocagem da solução: (—) 1, (—) 3, (—) 5, (—) 6 (—) 8, (—) 11 dias. B - Gráfico de Absorbância por tempo.

Pode-se observar que houve uma queda significativa na absorbância da tiocolina em apenas três dias de preparo da solução, ou seja, a enzima em solução perde atividade rapidamente, não devendo ser armazenada.

Estudos mais detalhados mostraram que a solução tampão contendo a enzima AchE deve ser utilizada até 24 horas após o preparo, se mantida no congelador (aproximadamente -10°C).

4.3 - Atividade Enzimática

4.3.1 – Determinação da concentração de proteína na solução padrão de soroalbumina bovina (SAB)

A curva analítica da SAB (Figura 13), para a determinação do conteúdo protéico da enzima acetilcolinesterase (liofilizada), foi construída pelo método do microbiureto⁶⁸, que se baseia na formação de um complexo entre proteína e cobre em meio fortemente alcalino. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm.

Figura 13: Curva analítica do conteúdo protéico empregando a soroalbumina bovina como solução padrão nas concentrações: 0,80 a 159,00x10⁻² mg 3,00 mL⁻¹ mais 1,00 mL de CuSO₄ 0,21%.

Pode-se observar na curva analítica da SAB uma boa linearidade na resposta no intervalo de 0,70 a 79,50x10⁻² mg 3,00 mL⁻¹, sendo a equação da reta $y = 0,025 + 1,74X$. Após a obtenção dessa curva, adicionou-se a uma cubeta (contendo água e o complexante sulfato de cobre) 25,00 µL de uma solução contendo 42,00 mg da enzima em 1,00 mL de tampão fosfato. O valor da

absorbância obtido foi inserido na equação da reta da curva analítica da SAB. Desta forma, calculou-se a quantidade de proteína na enzima que foi igual a $1,20 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$.

4.3.2 - Cinética da reação para o cálculo da atividade enzimática

Após a determinação do conteúdo protéico, realizou-se um estudo da cinética da reação no intuito de se observar a velocidade em que o substrato acetiltiocolina seria convertido em tiocolina pela ação da enzima acetilcolinesterase. Essa cinética foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática como mostrado abaixo. A Figura 14 (A) mostra o espectro de absorbância pelo tempo de reação (para uma temperatura de 25°C) em um comprimento de onda de aproximadamente 410 nm.

Figura 14: (A) Espectro de absorção obtido para a enzima acetilcolinesterase ($[\text{AcSchI}]$ $1,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, DTNB $1,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$) para $25,00 \mu\text{L}$ da solução da enzima ($42,00 \text{ mg}$ em $1,00 \text{ mL}$ de tampão fosfato) (curva vermelha). A inserção (B) apresenta a região linear da curva de absorbância *versus* tempo, utilizada para tirar o valor de b . Curva preta: absorbância na ausência da enzima.

Pode-se observar um lento aumento dos valores de absorbância, demonstrado pelos experimentos de UV-vis, sendo necessário um longo tempo de análise. Este resultado deve estar associado à baixa atividade da enzima. Desta forma, construiu-se uma curva de absorbância *versus* tempo (Figura 14B)) para então avaliar o valor da tangente ($b = 0,00898$) e aplicá-lo no cálculo da atividade da enzima. Uma justificativa plausível para a utilização do valor da tangente nos cálculos (ao invés do valor de absorbância em um determinado tempo) seria evitar que os baixos valores de absorbância introduzissem erros consideráveis no cálculo da atividade. Assim, as absorbâncias utilizadas na Figura 14(B) encontram-se no intervalo de confiança para as medidas de UV, ou seja, no intervalo em que o equipamento tem as melhores respostas, estando dentro da Lei de Lambert Beer.

A atividade catalítica da enzima foi calculada utilizando-se a Equação 12 juntamente com os resultados obtidos nas Figura 13 e Figura 14⁷⁰

$$Z = \frac{AV1000}{tedvC_p} \quad (\text{eq. 12})$$

onde: Z é a atividade catalítica específica (mg mL^{-1}); A a absorbância; V o volume do ensaio (mL); t o tempo de análise; ϵ a absorvidade molar da enzima acetilcolinesterase ($1,33 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$); d o caminho ótico (cm); v o volume da amostra no ensaio (mL) e C_p o conteúdo protéico (mg L^{-1}).

O valor encontrado para a atividade catalítica foi de 25,70%. Este baixo valor está, provavelmente, associada à demora no processo de importação da mesma, onde a exposição ao calor é inevitável. Apesar da baixa atividade encontrada, será mostrado adiante que o biossensor desenvolvido apresenta boa resposta amperométrica. Isto pode ser devido à forma de imobilização da enzima (quantidade da enzima adicionada ao eletrodo), bem como à utilização da

ftalocianina de cobalto como mediador melhorando a velocidade da reação de transferência eletrônica para a tiocolina e, assim, aumentando a resposta eletroquímica do biossensor.

4.4 - Construção do biossensor

4.4 1 - Perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono

Inicialmente, foram realizadas medidas voltamétricas do eletrodo de pasta de carbono em uma solução de hexacianoferrato de potássio trihidratado ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Esta resposta pode ser vista na Figura 15

Figura 15: Perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono em uma solução de hexacianoferrato de potássio trihidratado $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV.

Observa-se que o eletrodo de pasta de carbono apresentou resposta voltamétrica, com $\Delta E_p = 90$ mV, próximo do valor teórico de 60 mV por elétrons, esperada para processos eletródicos reversíveis como o de Fe(II)/Fe(III). Assim este eletrodo pode ser utilizado como suporte para imobilização da enzima.

4.4.2 - Determinação do potencial de trabalho

O potencial de trabalho a ser utilizado pelo biossensor no monitoramento do produto de reação enzimática, foi determinado utilizando-se a voltametria de onda quadrada, juntamente com o eletrodo de pasta de carbono para encontrar o pico de oxidação da tiocolina (Figura 16), que ocorre somente após a adição da solução enzimática na célula eletroquímica já contendo o AcSChI. O potencial de pico da tiocolina é observado em aproximadamente 80 mV.

Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina ($a = 50$ mV, $\Delta E_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50$ Hz, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) após a adição da enzima para os tempos: (—)0, (—) 20, (—) 52, (—) 76 minutos.

A partir destes resultados e dos obtidos na Figura 17, onde pode-se notar que o início do potencial de pico de oxidação da acetiltiocolina (~ 400 mV) é muito próximo ao término da tiocolina (~ 300 mV) impondo assim a necessidade de um estudo detalhado por cronoamperometria dos potenciais possíveis para a avaliação da ação da enzima, sem sofrer a interferência da eletro-oxidação do substrato

Figura 17: Voltamograma de onda quadrada para a oxidação da AcSChI ($3,00 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$) em solução tampão fosfato 0,10 mol L $^{-1}$ pH = 7,4; $a = 50$ mV; $\Delta E_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50$ Hz).

Com este intuito, saltos potencioestáticos foram executados em um eletrólito contendo apenas o substrato (AcSChI), sem o acréscimo da enzima. O gráfico de corrente versus potencial mostrados na Figura 18 indicam que no potencial de 100 mV não houve interferência do substrato, já em 200 e 300 mV ocorreu uma pequena influência, no entanto em 400mV a presença do substrato é bem evidenciada, resultado este condizente com a voltametria de onda quadrada (Figura 17) que mostra o pico do substrato se iniciando neste potencial.

Figura 18: Variação de potencial para solução contendo apenas substrato AcSchI ($3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4). Potenciais: (—) 100, (—) 200, (—) 300, (—) 400mV.

A Figura 19 mostra o resultado da adição de 0,14 U de acetilcolinesterase no eletrólito (contendo AcSchI) para os tempos de reação entre 0 a 300 minutos, com eletrodo de pasta de carbono polarizado no potencial de 100 mV.

Figura 19: Variação da corrente limite de difusão da oxidação da tiocolina com o tempo (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4), no potencial de 100mV.

Pode-se observar que a corrente aumenta com o tempo de reação indicando a oxidação da tiocolina. Essas análises também foram realizadas para os potenciais de 0, 50, 150, 200 e 300 mV em que todos apresentaram resultados similares, com um ligeiro aumento de correntes difusionais para valores de potenciais maiores que 100 mV.

Após praticamente toda reação enzima/substrato ter ocorrido (~ 300 minutos), ou seja, tempo necessário para o substrato reagir com a enzima e ser transformado em tiocolina, foram realizadas medidas para observar o potencial de oxidação da tiocolina sem a interferência do substrato (Figura 20).

Figura 20: Variação dos potenciais para a oxidação da tiocolina em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$.

Nesta Figura 20 pode-se observar que nos potenciais de 0 e 50 mV, as correntes apresentam valores bem inferiores aos observados de 100 a 300mV. Neste intervalo de 100 a 300 mV, notou-se que as correntes estão muito próximas, condizentes com os resultados apresentados anteriormente. Devido à diferença insignificante entre as correntes destes potenciais, optou-se por trabalhar com o potencial de 100 mV, pois, além de estar próximo ao potencial

de pico da tiocolina, apresenta-se mais afastado do pico do substrato (em relação aos outros potenciais), evitando eventuais influências deste.

4.4.3 - Variação da quantidade de enzima AchE

A preparação do biossensor foi realizada com a enzima adicionada diretamente à pasta de carbono. A Figura 21 mostra a influência da variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo na corrente limite de oxidação da tiocolina. Essas quantidades são relacionadas à massa de $1,70 \times 10^{-2}$ g de uma mistura de grafite, CoPC e Nujol®, como descrito anteriormente. Após a adição da enzima homogeneizou-se cuidadosa e extensamente a pasta com o auxílio de uma espátula para garantir a uniformidade na superfície do eletrodo. Essas análises foram realizadas em uma solução de AcSChI $3,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Figura 21: Influência da variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo na corrente limite de oxidação da tiocolina (solução de AcSChI = $3,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH = 7,4).

Pode-se observar que após a adição de $2,40 \times 10^{-3}$ g (0,67 U) de enzima, não houve aumento na intensidade da corrente, optando-se, então, por trabalhar com essa quantidade. A homogeneidade da mistura pasta de carbono/enzima foi analisada por meio de experimentos repetidos, após diversos procedimentos de polimento da superfície do eletrodo de pasta de carbono modificado (utilizando-se, para isto, uma folha de papel sulfite). A reprodutibilidade dos resultados obtidos foi avaliada por meio do desvio padrão relativo, obtido para 10 experimentos, e encontra-se na faixa de 5%.

4.4.4 - Variação da quantidade de ftalocianina de cobalto (CoPC)

A CoPC, pode ser utilizada como mediador, para aumentar a sensibilidade do biossensor, devido ao seu efeito eletrocatalítico na oxidação da tiocolina, aumentando a velocidade da reação de transferência de elétrons. A utilização de eletrodos de pasta de carbono contendo CoPC para a imobilização da enzima em solução está descrita na literatura^{23,24}. Desta forma houve o interesse em se testar o desempenho do eletrodo contendo a CoPC na detecção da tiocolina formada. Os resultados obtidos a partir dos experimentos de cronoamperometria com diferentes quantidades de CoPC adicionado à pasta de carbono contendo uma quantidade fixa da enzima, podem ser vistos na Figura 22. Estes eletrodos foram imersos em uma solução de tampão fosfato contendo a acetiltiocolina na concentração de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Figura 22: Efeito de variação da quantidade de ftalocianina de cobalto adicionada à pasta de carbono (solução de $\text{AcSCHl} = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$) na corrente limite de oxidação da tiocolina. As quantidades variaram de $0,50$ a $2,60 \times 10^{-3} \text{ g}$.

Observou-se a melhor resposta na presença de $0,90 \times 10^{-3} \text{ g}$ de CoPC misturada à pasta de grafite. Nota-se também pelo branco (eletrodo na ausência de enzima) que a CoPC não apresenta resposta eletroquímica, desta forma, seu uso no eletrodo torna-se viável. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a adição de $0,90 \times 10^{-3} \text{ g}$ de CoPC.

4.4.5 - Variação da porcentagem de glutaraldeído

Outro parâmetro importante para se avaliar é a porcentagem de glutaraldeído, que é um agente bifuncional responsável pela formação de ligações cruzadas entre as macromoléculas da proteína, aumentando sua estabilidade e fixando-a melhor à superfície do eletrodo. A Figura 23 mostra o efeito da variação da concentração de glutaraldeído na corrente difusional da oxidação da tiocolina.

Figura 23: Efeito da variação do glutaraldeído na oxidação da tiocolina (solução de $\text{AcSChI} = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato): (—) ausência de enzima; (—) 1% e (—) 10% de glutaraldeído.

Pode-se observar que a variação da porcentagem de glutaraldeído além de não melhorar a resposta do eletrodo (não houve aumento da corrente), ainda causa uma instabilidade na medida, desta forma optou-se por trabalhar com a solução contendo 1% de glutaraldeído.

4.4.6 - Variação da concentração de substrato AcSChI

A concentração do substrato é outro fator fundamental para se avaliar, pois este juntamente com a enzima resulta na corrente medida nas análises. Esta variação pode ser vista na Figura 24.

Figura 24: Influência da variação da concentração do substrato nas correntes de oxidação da tiocolina para o biossensor enzimático otimizado (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH = 7,4).

Nestas medidas observa-se que, a partir de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, a corrente não sofre variação considerável, indicando que a velocidade da reação enzimática passou a ser controlada pela sua cinética e não mais pelo transporte de substrato para a superfície do eletrodo. Desta forma, optou-se por trabalhar com esta concentração.

4.5 - Inibição enzimática causada pelo pesticida carbaril

Após a otimização tanto da composição do biossensor como dos parâmetros experimentais, ou seja, potencial de operação de 100 mV, quantidade da enzima acetilcolinesterase $2,40 \times 10^{-3}$ g, ftalocianina de cobalto $0,90 \times 10^{-4}$ g e solução de glutaraldeído 1%, para uma mistura de $1,70 \times 10^{-2}$ g de grafite com Nujol®, foram realizados experimentos relacionados com a inibição da enzima. Neste caso, como já detalhado na Introdução, o pesticida compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima (serina), diminuindo a velocidade da

reação. Essas inibições foram observadas após o eletrodo ser imerso durante 5 minutos em soluções contendo concentrações conhecidas do pesticida.

A Figura 25 mostra a diminuição da corrente de oxidação da tiocolina causada pela inibição da atividade da enzima pela adição de $0,50$ e $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do pesticida carbaril ao tampão fosfato da célula eletroquímica, com um tempo de imersão (incubação) de 5 minutos.

Figura 25: Cronoamperogramas para a oxidação da tiocolina mostrando a inibição da ação enzimática para o pesticida carbaril (solução de $\text{AcSChI} = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato). Concentrações: (—) apenas substrato; (—) depois de imerso em $0,50 \times 10^{-4}$ e (—) $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Carbaril.

Pode-se observar que a porcentagem de inibição observada na corrente limite de oxidação da tiocolina é proporcional à concentração do pesticida em solução, permitindo a construção de uma curva analítica e, assim, a análise do pesticida em amostras contaminadas com carbaril.

4.6 – Caracterização eletroquímica do biossensor

As medidas eletroquímicas foram realizadas no potencial de oxidação da tiocolina em 100 mV. A tiocolina é o produto da reação entre a enzima acetilcolinesterase (imobilizada no eletrodo de pasta de carbono) e o substrato iodeto de acetiltiocolina (contido na célula eletroquímica) de acordo com o esquema abaixo⁴⁸.

As medidas de repetibilidade para o biossensor enzimático, foram realizadas em uma série de 5 medidas (n = 5) numa mesma solução do substrato acetiltiocolina na concentração de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (na ausência de pesticida), onde o coeficiente de variação foi de 2,3 % . Para os testes de reprodutibilidade do método foram efetuadas 5 medidas (n = 5) em soluções diferentes, com concentração de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do substrato acetiltiocolina, onde o coeficiente de variação foi de 5,10 % . Para cada situação obteve-se os valores de corrente (I_p), calculou-se a média e o desvio padrão, o qual está indicado pelos coeficientes de variação em porcentagem.

4.6.1 - Efeito do pH

Inicialmente determinou-se o pH de trabalho (Figura 26), onde se observou que, com o aumento do pH, houve um aumento na intensidade da corrente. Entretanto, um pH básico pode induzir a hidrólise espontânea do

substrato⁴⁷, o que aumentaria de modo errôneo a corrente obtida. Desta forma optou-se por trabalhar em pH = 7,4.

Figura 26: Dependência da resposta do biossensor em função do pH para a solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com $T = 30^\circ \text{C}$.

4.6.2 - Efeito de temperatura

Os experimentos de temperatura para o biossensor, foram realizados no intuito de se avaliar a perda da atividade enzimática com o aumento de temperatura da solução contendo o substrato. As temperaturas variaram de 20 a 70°C como pode ser visto na Figura 27.

Figura 27: Dependência da resposta do biossensor em função da temperatura para a solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Pode-se observar que com o aumento da temperatura, houve aumento da corrente obtida, indicando que não houve perda na atividade. De acordo com os dados da literatura⁷¹, este comportamento está relacionado com o aumento da estabilidade da enzima após a imobilização no eletrodo. Desta forma, optou-se por trabalhar com a temperatura de 30°C , pois esta é próxima da temperatura normal de operação da biomolécula no organismo, diminuindo possíveis problemas de desnaturação da enzima.

4.6.3 - Tempo de vida do eletrodo

A Figura 28 mostra as medidas de tempo de vida do eletrodo (tempo que o mesmo pode ser estocado sem perda da atividade), essas foram realizadas utilizando um único eletrodo, o qual foi estocado em congelador (aproximadamente -10°C).

Figura 28: Efeito do tempo de estocagem do eletrodo para a solução de AcSchI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com $T = 30^\circ \text{C}$.

Pode-se observar que até 48 dias não houve perda na resposta, e que acima deste tempo, a perda foi quase insignificante, mostrando que a enzima possui boa estabilidade após sua imobilização, desta forma o eletrodo pode ser previamente preparado e estocado por pelo menos 48 dias sem que haja perda na resposta eletroquímica.

4.6.4 - Efeito da quantidade de solvente orgânico

A determinação da influência da quantidade de solvente orgânico adicionada no preparo da solução de pesticidas a ser analisada foi realizada, pois algumas medidas preliminares utilizando o biossensor indicaram que a resposta do mesmo havia sofrido variações. Desta forma, foram realizadas medidas para dois solventes (acetonitrila e etanol) com tempo de incubação de 8 minutos. Esta resposta pode ser vista na Figura 29.

Figura 29: Variação da corrente limite de oxidação da tiocolina com a porcentagem de solvente orgânico adicionado a solução (solução de AcSChI = $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH = 7,4 com T = 30 °C) para: (A) acetonitrila e (B) etanol.

Pode-se observar que em até 15% de acetonitrila não houve variação significativa da corrente, mas acima desta porcentagem ocorreu uma queda brusca da mesma. Já no caso do etanol, nota-se que com adição de solvente na solução ocorreu um aumento na intensidade de corrente, sendo inviável a utilização deste. Desta forma, optou-se por trabalhar com a acetonitrila nas porcentagens de 0 a 15%.

4.7 - Desenvolvimento de metodologias para determinação de carbamatos

Para desenvolvimento das metodologias utilizando-se o biossensor, as curvas são expressas em porcentagem de inibição (%I) as quais foram calculadas de acordo com a Equação 13.

$$\%I = \frac{\Delta I_0 - \Delta I_1}{\Delta I_0} \times 100 \quad (\text{eq. 13})$$

onde ΔI_0 e ΔI_1 são as respostas do biossensor antes e após o processo de incubação, respectivamente.

4.7.1 - Determinação analítica do pesticida carbaril

4.7.1.1 – Tempo de incubação

Um passo muito importante no desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de pesticidas utilizando-se o biossensor amperométrico com base na inibição da atividade catalítica da enzima é o tempo de incubação, ou seja, o tempo em que o eletrodo deve ficar imerso na solução do pesticida antes das medidas eletroquímicas serem realizadas. A Figura 30 mostra a porcentagem de inibição em relação ao tempo de incubação, investigada de 2 a 20 minutos para amostras contendo $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

Figura 30: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor de acetilcolinesterase para o inseticida carbaril $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os cronoamperogramas foram obtidos de uma solução de AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 com T = 30 °C.

Observou-se que em até 8 minutos de incubação houve um aumento na porcentagem de inibição e após esse tempo ocorreu uma estabilização na mesma, isso ocorre, pois após um determinado tempo, praticamente todos os

sítios ativos da enzima já estarão ocupados, não havendo a necessidade de um tempo maior de incubação. Desta forma, optou-se por trabalhar com o tempo de incubação de 8 minutos.

4.7.1.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor

Após a resolução dos melhores parâmetros obtidos para o eletrodo e o tempo de incubação do mesmo no pesticida, construiu-se a curva analítica (Figura 31) para a determinação do carbaril, onde inicialmente o eletrodo foi imerso por 8 minutos na solução contendo diferentes concentrações do pesticida, o mesmo foi posteriormente transferido para a célula eletroquímica contendo $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do substrato AcSChI em meio de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e realizou-se a execução dos cronoamperogramas para se determinar a inibição provocada nas correntes limites de difusão, relacionadas com a oxidação da tiocolina.

Figura 31: Curva analítica para o carbaril (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e T = 30 °C). Para as concentrações de $5,00$ a $100,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Nesta curva, observou-se que a porcentagem de inibição aumenta linearmente com o aumento da concentração de carbaril de 5,00 a 75,00x10⁻⁶mol L⁻¹ com coeficiente de linearidade de 0,998.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se o desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas de brancos, obtidos das correntes médias no mesmo potencial do pico de formação da tiocolina, juntamente com a Equação 14 mostrada abaixo^{72,73}.

$$LD = \frac{3xS_B}{b} \quad (\text{eq. 14})$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética e b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

O limite de detecção obtido foi de 2,00 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (0,40 mg L⁻¹). Esse valor é inferior àquele permitido pela legislação para o pesticida carbaril em amostras de maçã e laranja e um pouco maior que o permitido para o tomate. Apesar disso, foram realizados experimentos de recuperação para as três amostras no intuito de se avaliar a viabilidade de aplicação da técnica nessas matrizes.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando-se a Equação (15)^{72,73}.

$$LQ = \frac{10xS_B}{b} \quad (\text{eq. 15})$$

O valor de LQ obtido para o carbaril foi de 6,70x10⁻⁶ mol L⁻¹ (1,30 mg L⁻¹).

A potencialidade da metodologia foi então testada realizando-se medidas de recuperação em tomates, maçãs e laranjas obtidos no comércio local. As

amostras de tomate e maçã foram submetidas a dois tipos de extração (tratamento de extração simples e MSPD), já a laranja foi dopada diretamente. As análises foram realizadas com o eletrodo imerso por 8 minutos na solução obtida e os cronoamperogramas foram executados seguindo o procedimento descrito anteriormente para a construção da curva analítica.

4.7.1.3 - Recuperação para o carbaril no tomate (biossensor)

As medidas de recuperação para amostras de tomate foram realizadas em duas concentrações: $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, que é próximo ao menor ponto da curva analítica, e em $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com o objetivo de analisar a eficiência da técnica em baixas e em altas concentrações.

A Figura 32 mostra um cronoamperograma típico da inibição da enzima acetilcolinesterase pelo pesticida. Nesta figura a amostra de tomate liquefeito foi dopada com o pesticida carbaril numa concentração de $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inicialmente, as medidas foram realizadas apenas entre o substrato e o eletrodo, onde a resposta do eletrodo é máxima. Colocou-se então o eletrodo imerso (com tempo de incubação determinado) na amostra sem a presença de pesticida, com o intuito de avaliar o efeito da matriz. Por último o eletrodo foi incubado na amostra com a presença de pesticida. As análises foram feitas em triplicata.

Figura 32: Cronoamperogramas para a determinação do carbaril em tomate: (—) branco (—) sem adição de pesticida e (—) com carbaril $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Na Figura 32, observou-se que não houve diferença entre o branco (sem incubação) e após o eletrodo ser imerso na amostra de tomate na ausência do pesticida. Desta forma, pode-se dizer que apesar do tomate apresentar em sua composição flavonóides, betacaroteno, proteínas, dentre outros constituintes, o biossensor enzimático mostrou-se insensível aos possíveis efeitos dessas matrizes.

Além disso, verificou-se também a diferença da corrente obtida na ausência do pesticida (branco) e após a inibição causada pelo mesmo à enzima acetilcolinesterase, indicando que o eletrodo responde a esse tipo de amostra.

Para os estudos de recuperação para o carbaril, foram realizados dois tipos de extração para a aplicação do biossensor, a extração simples, onde a amostra foi apenas triturada, homogeneizada e centrifugada e a extração por MSPD, que possui maior quantidade de etapas, sendo própria para as análises cromatográficas. Utilizou-se também o biossensor amperométrico para a análise da amostra obtida por MSPD, para melhor comparação desta técnica com o

HPLC, além da comparação entre as duas técnicas de extração, com o intuito de analisar se os valores de recuperação seriam semelhantes.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de recuperação do carbaril no tomate tanto para a extração simples, quanto para a MSPD, utilizando-se o biossensor.

Tabela 2 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril no tomate com os diferentes métodos de extração, utilizando-se o biossensor.

Carbaril no tomate Métodos de extração	Concentração inicial / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Extração simples	$6,00 \times 10^{-6}$	$5,95 \times 10^{-6}$	99,92
Extração simples	$5,00 \times 10^{-5}$	$4,62 \times 10^{-5}$	92,40
Extração MSPD	$6,00 \times 10^{-6}$	$5,50 \times 10^{-6}$	91,67
Extração MSPD	$5,00 \times 10^{-5}$	$3,96 \times 10^{-5}$	79,20

Notou-se que tanto para baixas quanto altas concentrações as recuperações foram semelhantes, ou seja, mesmo trabalhado próximo ao limite da curva analítica (menor concentração detectada) foram obtidos ótimos valores de recuperação. Na comparação entre os dois tipos de extração, observou-se que em ambos os casos as recuperações foram boas, mas em MSPD houve uma pequena queda no rendimento, o qual pode ter ocorrido devido à intensa manipulação da amostra, indicando que esta extração é menos convencional para este tipo de análise. Desta forma, esses dados indicam que o biossensor enzimático está apto à determinação de carbaril em tomate.

4.7.1.4 - Aplicação do biossensor na determinação do tomate “in natura”

A Figura 33, mostra uma foto do biossensor sendo utilizado “in situ” para a determinação de carbaril no tomate. Neste caso, o tomate foi partido em dois e a polpa de uma das metades foi fortificada com 50,00 μL de uma solução estoque de carbaril $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Isto é equivalente a aproximadamente 10^{-4} g de carbaril em 10,00 g de tomate. Após homogeneizar por 20 minutos o biossensor foi então imerso nesta amostra por tempo de incubação de 8 minutos. Após este tempo o mesmo foi lavado e transferido para a célula eletroquímica contendo $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AcSChI preparado em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7.4. As correntes obtidas dos cronoamperogramas foram utilizadas para o cálculo porcentagem de recuperação.

Figura 33: Fotografia do biossensor imerso no tomate “in natura”, fortificado com $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

A recuperação obtida foi de 83,40%, mostrando a eficiência da técnica desenvolvida mesmo sem o tratamento da amostra.

4.7.1.5 - Recuperação para o carbaril na maçã (biossensor)

As análises de recuperação para as amostras de maçã foram realizadas seguindo a mesma metodologia empregada na análise de tomate. Neste caso, as concentrações analisadas foram $6,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, para a extração simples (extração de interesse), sendo que para a extração por MSPD utilizou-se apenas a $6,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, já que as medidas anteriores mostraram que as respostas foram semelhantes.

Os cronoamperogramas obtidos para o biossensor foram semelhantes aos da Figura 32 e as recuperações, juntamente com os diferentes tipos de extração podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril na maçã com diferentes métodos de extração, utilizando-se o biossensor.

Carbaril na maçã Métodos de extração	Concentração inicial / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Extração simples	$6,00 \times 10^{-6}$	$5,80 \times 10^{-6}$	96,67
Extração simples	$1,20 \times 10^{-5}$	$1,28 \times 10^{-5}$	106,67
Extração MSPD	$6,00 \times 10^{-6}$	$4,61 \times 10^{-6}$	76,83

Observou-se novamente que os valores são semelhantes para o mesmo tipo de extração, não havendo problemas na análise de baixas concentrações. Notou-se também que a extração em MSPD apresentou-se com rendimento inferior ao obtido pelo método de extração simples, provando novamente que é um método desaconselhado para a determinação analítica do pesticida carbaril utilizando-se o biossensor, pois além de um menor rendimento ainda tem um tempo maior de preparo da amostra, contrariamente ao o intuito dessa

metodologia, que é a diminuição do tempo de análise. Desta forma, pode-se dizer que a metodologia desenvolvida é uma boa alternativa para a determinação de carbaril em amostras de maçã.

4.7.1.6 - Recuperação para o carbaril na laranja (biossensor)

Para a recuperação do carbaril na laranja foi realizada apenas dopagem direta da amostra com o pesticida nas concentrações $6,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que neste caso não foi analisada a extração por MSPD, já que os experimentos acima provaram que para medidas utilizando-se o biossensor não é necessário esse tipo de extração.

Os cronoamperogramas obtidos para o biossensor foram semelhantes aos da Figura 32 e as recuperações podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o carbaril na laranja em diferentes concentrações utilizando-se o biossensor.

Carbaril Matriz	Concentração inicial / mol L^{-1}	Concentração recuperada / mol L^{-1}	% de recuperação
laranja	$6,00 \times 10^{-6}$	$5,60 \times 10^{-6}$	93,33
laranja	$5,00 \times 10^{-5}$	$4,85 \times 10^{-5}$	97,00

Pode-se observar que apesar de não ser realizada nem a extração simples, os valores de recuperação foram satisfatórios, além do efeito da matriz não interfere nas medidas, mesmo em amostras sem pré-tratamento.

4.7.1.7 - Medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o carbaril

A técnica de HPLC foi utilizada com o objetivo de comparar os resultados obtidos com o método desenvolvido (biossensor amperométrico), já que este é o método padrão de análise utilizado até o momento para a determinação dos pesticidas da classe dos carbamatos.

A determinação cromatográfica do carbaril foi realizada após a otimização do sistema, onde a fase móvel utilizada foi acetonitrila/água na proporção 70/30 v/v, com fluxo de 1 mL por minuto em condição isocrática com o detector de UV-vis monitorando um comprimento de onda de 220 nm.

4.7.1.7.1 - Construção da curva analítica utilizando HPLC

A curva analítica foi obtida pelo método de adição de padrão e os cromatogramas são apresentados na Figura 34 (A). O tempo de retenção observado para o carbaril foi de 5,1 minutos. A inserção na Figura 34 (B), mostra a dependência da área do pico em função da concentração, podendo-se observar que o intervalo linear é de $0,08$ a $100,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com uma inclinação de $8,60 \times 10^{10}$ e coeficiente de correlação igual a 0,999.

Figura 34: (A) Cromatograma obtido para o carbaril (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 7,4) em diferentes concentrações: 0,08 (—), 0,70 (—), 2,00 (—), 3,00 (—), 5,00 (—), 10,00 (—), 25,00 (—), 50,00 (—), 75,00 (—), 100,00x10⁻⁶ mol L⁻¹ (—). (B) Curva analítica do Carbaril

O limite de detecção do carbaril foi calculado por uma equação similar à equação (14)⁷⁴, onde o desvio padrão utilizado corresponde às medidas do intercepta do eixo y na curva analítica para uma média aritmética de seis curvas. O valor encontrado para o limite de detecção foi de 1,58x10⁻⁸ mol L⁻¹ (3,18 µg L⁻¹).

O limite de quantificação foi calculado pela equação (15) e o valor encontrado foi de 5,27x10⁻⁸ mol L⁻¹ (10,60 µg L⁻¹).

Os limites de detecção e quantificação determinados utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência são baixos, confirmando a potencialidade da técnica para a determinação de carbaril.

Pode-se observar que as técnicas cromatográficas possuem limites de detecção e quantificação bem menores que os obtidos pelo biossensor amperométrico, provavelmente devido à etapa de pré-concentração do pesticida na coluna cromatográfica.

4.7.1.7.2 - Recuperação do carbaril em diferentes matrizes (HPLC)

As curvas de recuperação para o carbaril utilizando-se o HPLC foram realizadas em triplicata pelo método de adição padrão, para três tipos de amostras (tomate, maçã e laranja) e em duas concentrações diferentes de $6,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o tomate e laranja e de $6,00 \times 10^{-6}$ e $1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para a maçã. Os valores de concentrações foram obtidos pela extrapolação das curvas analíticas como pode ser visto na Figura 35 A e B para o tomate.

Figura 35: Curvas de recuperação obtidas para o carbaril em amostras de tomate (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 7,4) nas concentrações: (A) $6,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (B) $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

As curvas de recuperação para as amostras de maçã e laranja, são semelhantes as do tomate. Os valores de recuperação para o carbaril nestas amostras utilizando-se o HPLC estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das curvas de recuperação obtidos para carbaril em amostras de tomate, maçã e laranja, utilizando-se a HPLC.

Carbaril Matrizes	Concentração inicial / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / molL ⁻¹	% de recuperação
Tomate	6,00x10 ⁻⁶	4,70x10 ⁻⁶	78,33
Tomate	5,00x10 ⁻⁵	4,24x10 ⁻⁵	84,80
Maçã	6,00x10 ⁻⁶	6,35x10 ⁻⁶	105,83
Maçã	1,20x10 ⁻⁶	1,30x10 ⁻⁶	108,33
Laranja	6,00x10 ⁻⁶	4,80x10 ⁻⁶	80,00
Laranja	5,00x10 ⁻⁵	3,88x10 ⁻⁵	77,60

Pode-se observar na Tabela 5, que os resultados de recuperação obtidos para a carbaril, nas amostras de tomate e laranja são menores que os encontrados para a maçã, no entanto, ambos, apresentaram valores similares e satisfatórios entre si, mostrando que a diferença de recuperação pode ser referente ao tipo de matriz, além de apresentarem valores semelhante aos obtidos pela metodologia eletroquímica desenvolvida, confirmando a possibilidade de aplicação do método proposto para a análise de carbaril em diferentes tipos de matrizes.

4.7.1.8 - Comparação entre as técnicas

4.7.1.8.1 – Diferentes matrizes e métodos de extração

A Tabela 6 mostra todos os resultados obtidos para o carbaril em amostras de tomate, maçã e laranja para diferentes técnicas, métodos de extração e concentrações utilizadas.

Tabela 6 – Valores de porcentagem de recuperação obtidos para carbaril em amostras de tomate, maçã e laranja para diferentes técnicas, métodos de extração e concentrações.

Carbaril Técnicas (matrizes)	Extração	Concentração inicial / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Biossensor (tomate)	Ext. S.	6,00x10 ⁻⁶	5,95x10 ⁻⁶	99,92
Biossensor (tomate)	Ext. S.	5,00x10 ⁻⁵	4,62x10 ⁻⁵	92,40
Biossensor (tomate)	MSPD	6,00x10 ⁻⁶	5,50x10 ⁻⁶	91,67
Biossensor (tomate)	MSPD	5,00x10 ⁻⁵	3,96x10 ⁻⁵	79,20
HPLC (tomate)	MSPD	6,00x10 ⁻⁶	4,70x10 ⁻⁶	78,33
HPLC (tomate)	MSPD	5,00x10 ⁻⁵	4,24x10 ⁻⁵	84,80
Biossensor (maçã)	Ext.S.	6,00x10 ⁻⁶	5,80x10 ⁻⁶	96,67
Biossensor (maçã)	Ext. S.	1,20x10 ⁻⁵	1,28x10 ⁻⁵	106,67
Biossensor (maçã)	MSPD	6,00x10 ⁻⁶	4,61x10 ⁻⁶	76,83
HPLC (maçã)	MSPD	6,00x10 ⁻⁶	6,35x10 ⁻⁶	105,83
HPLC (maçã)	MSPD	1,20x10 ⁻⁶	1,30x10 ⁻⁶	108,33
Biossensor (laranja)	_____	6,00x10 ⁻⁶	5,60x10 ⁻⁶	93,33
Biossensor (laranja)	_____	5,00x10 ⁻⁵	4,85x10 ⁻⁵	97,00
HPLC (laranja)	_____	6,00x10 ⁻⁶	4,80x10 ⁻⁶	80,00
HPLC (laranja)	_____	5,00x10 ⁻⁵	3,88x10 ⁻⁵	77,60

* Ext.S. : Extração simples

Na Tabela 6, pode-se observar que a metodologia empregando o biossensor amperométrico e utilizando-se a MSPD forneceu resultados em relação à porcentagem de recuperação, tão satisfatórios quanto aos alcançados pelo método padrão de análise (HPLC e MSPD) para as amostras de tomate, maçã e laranja. No entanto, a manipulação intensiva da amostra requer um tempo maior das análises, o que torna esta extração inconveniente para a utilização com o biossensor, já que esta tem como intuito a diminuição do tempo

de análise. Ao analisar os resultados de recuperação obtidos com a metodologia empregando o biossensor amperométrico, com um método de extração simples, verifica-se que os mesmos são superiores aos alcançados pelo método padrão para as amostras de tomate e laranja, sendo que no caso da maçã algumas medidas apresentaram até valores superiores a 100,00%, dentre elas as duas realizadas por HPLC. Assim, uma comparação dos valores obtidos mostra que a metodologia eletroanalítica, com base no biossensor, mesmo utilizando métodos mais simples e diretos para a extração, é perfeitamente capaz de quantificar o carbaril nas amostras estudadas. Obviamente a sensibilidade das técnicas cromatográficas é muito superior, sugerindo novos desenvolvimentos para os biossensores.

4.7.2 - Determinação analítica do pesticida metomil e do Lannate®

4.7.2.1 – Tempo de incubação

Como mostrado anteriormente, o primeiro passo para o desenvolvimento de uma metodologia, é a determinação do tempo de incubação. A Figura 36 mostra a porcentagem de inibição em relação ao tempo de incubação, investigada de 2 a 20 minutos para amostras contendo $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de metomil (Figura 36A) e $2,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de Lannate® (Figura 36B), que é a formulação comercial mais conhecida do metomil.

Figura 36: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor ($\text{AcSChI } 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$ e $T = 30^\circ \text{C}$), para: A - metomil ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e B - Lannate® ($2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Observou-se que para ambas as curvas, houve um aumento na porcentagem de inibição até 12 minutos e após esse tempo ocorreu à estabilização da mesma (motivos análogos àqueles citados anteriormente para o carbaril). Desta forma optou-se por trabalhar com esse tempo de incubação tanto para o metomil quanto para o Lannate®.

4.7.2.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor

Após determinado o tempo de incubação realizou-se a construção das curvas analíticas para o metomil (Figura 37A) e Lannate® (Figura 37B) no intervalo de concentração de $0,90$ a $75,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 37: Curvas analíticas para o metomil (A) e Lannate® (B) na solução de substrato AcSCHl $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4 e T = 30 °C. Para as concentrações de $0,90$ a $75,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Nestas curvas, observou-se que porcentagens de inibição aumentam linearmente com o aumento na concentração de $0,90$ a $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ tanto para o metomil, quanto para o Lannate®, pode-se notar também que os perfis das curvas são semelhantes, mostrando que a formulação comercial não interfere na sensibilidade da técnica, viabilizando a utilização do biossensor.

Os LD e LQ foram calculados utilizando-se o desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas de brancos, obtidos das correntes médias no mesmo potencial do pico de formação da tiocolina, juntamente com as Equações [14] e [15] mostrada acima. Os valores de LD obtidos para o metomil e Lannate® foram de $1,88 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($30,45 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e $2,13 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($34,50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e os de LQ foram de $6,26 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,10 \text{ mg / L}^{-1}$) e $7,09 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. Estes valores estão dentro do limite máximo permitido para o consumo de tomate, couve e soja de acordo com o atribuído pela Anvisa que é de 1,00, 3,00 e $0,10 \text{ mg / Kg}$, respectivamente⁹.

4.7.2.3 - Recuperação para o Lannate® em diferentes matrizes (biossensor)

As medidas de recuperação foram realizadas apenas para a formulação comercial, pois esta é a forma utilizada deste pesticida na agricultura. A potencialidade dessa curva foi testada em amostras de tomate, couve e leite de soja obtidos no comércio local em duas diferentes concentrações do pesticida $2,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. As amostras foram submetidas a um tratamento simples, onde no caso do tomate e da couve elas foram apenas trituradas e dopadas, já o leite de soja foi dopado diretamente. As análises foram realizadas com o eletrodo imerso por 12 minutos na solução obtida antes e após a dopagem com o pesticida. Depois deste tempo de incubação na solução, o mesmo foi colocado na célula eletroquímica contendo o substrato e obteve-se os valores de corrente.

4.7.2.3.1 - Amostras de tomate e leite de soja

A Tabela 7 mostra os valores de recuperação obtidos para as amostras de tomate e leite de soja nas diferentes concentrações.

Tabela 7 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o Lannate® no tomate e leite de soja com as diferentes concentrações, utilizando-se o biossensor.

Carbaril Matrizes	Concentração adicionada / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Tomate	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,93 \times 10^{-6}$	96,50
Tomate	$5,00 \times 10^{-6}$	$4,25 \times 10^{-6}$	85,00
Leite de soja	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,80 \times 10^{-6}$	90,00
Leite de soja	$5,00 \times 10^{-5}$	$3,90 \times 10^{-6}$	78,00

Notou-se que tanto para baixas quanto altas concentrações as recuperações foram semelhantes, indicando que o biossensor enzimático está apto à determinação de metomil em amostras de tomate e leite de soja.

4.7.2.3.2 – Amostras de couve-manteiga

A Figura 38, mostra que houve uma inibição na corrente após o eletrodo ser imerso na amostra contendo apenas a couve, quando comparado com o cronoamperograma do branco, onde o eletrodo foi imerso diretamente na solução do substrato, dando indícios que a mesma encontra-se contaminada.

Figura 38 Cronoamperogramas para a determinação do Lannate® em couve-manteiga: (—) branco (—) sem adição de pesticida.

Calculou-se então a concentração de pesticida nesta amostra antes da dopagem e o valor encontrando foi de $2,70 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, apesar deste valor encontrar-se abaixo do permitido para o consumo humano é uma quantidade relativamente alta para ser ingerida diariamente. Realizou-se então a fortificação desta amostra de couve (contaminada) como descrito anteriormente e fez-se os

cálculos de recuperação, sendo que para a concentração de $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi recuperado $4,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, obteve-se 230% de recuperação, já para a concentração de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ não foi possível calcular a porcentagem de recuperação, pois o valor obtido encontra-se fora da curva analítica, desta forma, estes resultados estão condizentes com os obtidos para a amostra pura (apenas com contaminação natural), provando a funcionalidade do eletrodo.

Uma forma de comprovar a contaminação desta amostra foi analisar outra amostra de couve, de outra marca. Neste caso, não se observou inibição da corrente após o biossensor permanecer na amostra por 12 minutos, dando indícios que esta amostra não encontra-se contaminada. Os valores de recuperação para a couve não contaminada, podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de porcentagem de recuperação obtidos para o Lannate® na couve com as diferentes concentrações, utilizando-se o biossensor.

Lannate® Matriz	Concentração adicionada / mol L^{-1}	Concentração recuperada / mol L^{-1}	% de recuperação
Couve	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,90 \times 10^{-6}$	95,00
Couve	$5,00 \times 10^{-6}$	$4,51 \times 10^{-6}$	90,20

Novamente os resultados são similares e satisfatórios, sendo que estes juntamente com os obtidos para a couve contaminada, comprovando que o biossensor é eficiente para a determinação de carbamatos em diferentes tipos de matrizes.

4.7.2.4 - Medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o metomil e Lannate®.

A determinação cromatográfica do Metomil foi realizada após a otimização do sistema, onde a fase móvel utilizada foi acetonitrila/água na proporção 50/50 v/v, com fluxo de 1 mL por minuto em condição isocrática com o detector de UV-vis monitorando um comprimento de onda de 230 nm.

4.7.2.4.1 - Construção da curva analítica utilizando HPLC

A curva analítica foi obtida pelo método de adição de padrão como mencionado anteriormente, os cromatogramas encontram-se na Figura 39 (A) O tempo de retenção observado para o metomil foi de 3,7 minutos. A inserção na Figura 39 (B), mostra a dependência da área do pico em função da concentração, podendo-se observar que o intervalo linear é de 0,05 a $10,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com uma inclinação de $9,2010^9$ e coeficiente de correlação igual a 0,999.

Figura 39 - Cromatogramas obtidos para o metomil em diferentes concentrações: 0,05 (—), 0,25 (—), 0,50 (—), 0,80 (—), 1,00 (—), 2,50 (—), 5,00 (—), 8,00 (—) $10,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (—). (B) Curva analítica do metomil.

Os LD e LQ do metomil foram calculados pelas equações (14) e (15), onde o desvio padrão utilizado corresponde às medidas do intercepta do eixo y na curva analítica para uma média aritmética de seis curvas. Os valores encontrados para os LD e LQ foram de $9,02 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) e $3,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($48,60 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Este é considerado baixo, confirmando a potencialidade da técnica para a determinação de metomil. Pode-se observar novamente que as técnicas cromatográficas possuem limite de detecção menor que o obtido pelo biossensor amperométrico. Entretanto o biossensor mostrou-se uma técnica viável para a aplicação em amostras reais, pois além de apresentar LD dentro do permitido por lei, ainda apresenta menor tempo de análise.

4.7.2.4.2 - Recuperação para o Lannate® em amostras de tomate e leite de soja (HPLC)

As curvas de recuperação para o metomil utilizando-se o HPLC foram realizadas em triplicata pelo método de adição padrão. Os valores de recuperação para o metomil em amostra de tomate e leite de soja nas concentrações $2,00$ e $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das curvas de recuperação obtidos para Lannate® em amostras de tomate e leite de soja utilizando-se a HPLC.

Lannate® Matrizes	Concentrações adicionadas / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Tomate	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,99 \times 10^{-6}$	99,50
Tomate	$5,00 \times 10^{-6}$	$4,18 \times 10^{-6}$	83,60
Leite de soja	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,80 \times 10^{-6}$	90,00
Leite de soja	$5,00 \times 10^{-6}$	$4,30 \times 10^{-6}$	86,00

Pode-se observar na Tabela 9 que os resultados de recuperação obtidos para a metomil, utilizando-se o HPLC, apresentaram valores similares e próximos a 100%, como aqueles obtidos pela metodologia eletroquímica desenvolvida. Entretanto na cromatografia, houve a necessidade da utilização do método de extração (MSPD), prolongando o tempo de medida, podendo inclusive acarretar erros nos valores de recuperação obtidos, já que são necessárias várias etapas para a preparação da amostra. Desta forma, a metodologia eletroanalítica desenvolvida é mais rápida, além de minimizar os erros nas medida de recuperação, pois não foi necessária grande manipulação da amostra, confirmando assim a possibilidade de aplicação do método proposto para a análise de metomil em amostras de leite de soja e tomate.

4.7.2.4.3 – Recuperação para o Lannate® em amostras de couve-manteiga (HPLC)

Foram realizadas medidas de HPLC para a amostra de couve contaminada. A

Figura 40 mostra um cromatograma expandido do pesticida metomil para a amostra de couve contaminada.

Figura 40: Cromatogramas obtida para o Lannate® na amostra de couve-manteiga nas concentrações: 0 (3/4), 2,00 (3/4) e amostra dopada com mais 2,00x10⁻⁶ mol L⁻¹ (3/4).

Nesta figura, pode-se observar que na amostra contendo apenas a couve sem a dopagem com o pesticida, houve o surgimento de um pico no mesmo tempo de retenção que o obtido para a curva analítica do metomil. Ao dopar esta amostra com 2,00x10⁻⁶ mol L⁻¹ do pesticida, pode-se observar que ocorreu um aumento na intensidade do pico, realizou-se então nova dopagem, com mais 2,00x10⁻⁶ mol L⁻¹ houve novo aumento. Desta forma, pode-se afirmar que o pico encontrado inicialmente é referente ao pesticida metomil, confirmando a existência de contaminação da amostra.

Os valores de recuperação para o Lannate® em amostra de Couve-manteiga nas concentrações $2,00$ e $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ estão apresentados na Tabela 10

Tabela 10: Resultados das curvas de recuperação obtidos para Lannate® em amostras de couve-manteiga utilizando-se a HPLC.

Lannate® matriz	Concentração adicionada / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Couve	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$	85,00
Couve	$5,00 \times 10^{-6}$	$3,90 \times 10^{-6}$	78,00

As análises apresentam bons resultados de recuperação o que provaria a potencialidade da técnica, se não fosse pela contaminação já existente na amostra de couve, desta forma, foram realizadas análises com uma amostra diferente de couve. Estas recuperações podem ser vistas na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados das curvas de recuperação obtidos para Lannate® em amostras de couve-manteiga e diferentes concentrações utilizando-se a HPLC.

Lannate® Matriz	Concentração adicionada / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Couve	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,14 \times 10^{-6}$	57,00
Couve	$5,00 \times 10^{-6}$	$2,91 \times 10^{-6}$	58,20

Os baixos valores obtidos indicam que aproximadamente um quarto da recuperação anterior é referente à contaminação da amostra pelo pesticida, assim estes resultados, mostraram que a HPLC nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, não é uma técnica confiável para a análise de pesticida em couve.

4.7.2.5 - Comparação entre as técnicas

4.7.2.5.1 – Diferentes matrizes

A Tabela 12 mostra todos os resultados obtidos para o **Lannate®** em diferentes matrizes, técnicas e concentrações utilizadas.

Tabela 12 – Valores de porcentagem de recuperação obtidos para Lannate® em diferentes matrizes, concentrações e técnicas.

Lannate® Matrizes e técnicas	Concentrações adicionadas / mol L ⁻¹	Concentração recuperada / mol L ⁻¹	% de recuperação
Tomate (biossensor)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,93 x 10 ⁻⁶	96,50
Tomate (biossensor)	5,00 x 10 ⁻⁶	4,25 x 10 ⁻⁶	85,00
Leite de soja (biossensor)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,80 x 10 ⁻⁶	90,00
Leite de soja (biossensor)	5,00 x 10 ⁻⁵	3,90 x 10 ⁻⁶	78,00
Couve 1 (biossensor)	2,00 x 10 ⁻⁶	4,60 x 10 ⁻⁶	230,00
Couve 1 (biossensor)	5,00 x 10 ⁻⁶	—	—
Couve (biossensor)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,90 x 10 ⁻⁶	95,00
Couve (biossensor)	5,00 x 10 ⁻⁶	4,51 x 10 ⁻⁶	90,20
Tomate (HPLC)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,99 x 10 ⁻⁶	99,50
Tomate (HPLC)	5,00 x 10 ⁻⁶	4,18 x 10 ⁻⁶	83,60
Leite de soja (HPLC)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,80 x 10 ⁻⁶	90,00
Leite de soja (HPLC)	5,00 x 10 ⁻⁶	4,30 x 10 ⁻⁶	86,00
Couve 1 (HPLC)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,70 x 10 ⁻⁶	85,00
Couve 1 (HPLC)	5,00 x 10 ⁻⁶	3,90 x 10 ⁻⁶	78,00
Couve (HPLC)	2,00 x 10 ⁻⁶	1,14 x 10 ⁻⁶	57,00
Couve (HPLC)	5,00 x 10 ⁻⁶	2,91 x 10 ⁻⁶	58,20

* couve 1: couve contaminada

Nesta tabela, pode-se observar que a metodologia empregando o biossensor amperométrico para a análise do pesticida Lannate®, apresentou resultados tão satisfatórios quanto os alcançados pelo método padrão de análise. Além dos motivos já apresentados anteriormente devido a grande manipulação da amostra, a cromatografia ainda não obteve resultados satisfatórios para a determinação de couve, apresentando baixos valores de recuperação.

4.7.3 - Determinação analítica do pesticida aldicarbe

4.7.3.1 – Tempo de incubação

Como nas metodologias desenvolvidas acima, inicialmente testou-se o tempo de incubação do pesticida aldicarbe no eletrodo na concentração de $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, como pode ser visto na Figura 41.

Figura 41: Efeito do tempo de incubação no sinal do sensor, baseado na acetilcolinesterase para o pesticida aldicarbe $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (AcSChI $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4). Para os tempos de 4 a 20 minutos.

Observou-se que até 15 minutos houve um aumento na porcentagem de inibição e após esse tempo ocorreu a estabilização da mesma (motivos citados anteriormente para o carbaril). Desta forma optou-se por trabalhar com esse tempo de incubação.

4.7.3.2 - Construção da curva analítica utilizando biossensor

Depois de determinado o tempo de incubação, a curva analítica foi construída no intervalo de concentração de $0,50$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 42).

Figura 42: Curva analítica para o aldicarbe ($\text{AcSChI } 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,4$ e $T = 30^\circ\text{C}$) para as concentrações variando de $0,50$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Pode-se observar uma linearidade no intervalo de $0,30$ a $0,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e após esse valor houve saturação na superfície do eletrodo, ocorrendo uma estabilização na porcentagem de inibição. O limite de detecção para o aldicarbe foi calculado tirando 10 correntes do branco e utilizando-se a equação (14). O valor obtido foi de $1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,20 \text{ mg L}^{-1}$), devendo-se

ênfatizar que este valor foi calculado na faixa linear de concentração. O limite de quantificação foi calculado pela equação (15) e o valor obtido foi de $3,60 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,70 \text{ mg L}^{-1}$).

Pode-se observar que para a determinação de tomate os limites de detecção encontrados foram altos, pois o valor permitido é de $0,02 \text{ mg / Kg}$, mas para cultura como de citros e batata, a metodologia encontra-se dentro do permitido.

4.7.3.3 - Recuperação do aldicarbe em tomate (biossensor)

Apesar dos estudos iniciais do aldicarbe apresentarem valores acima dos desejados para a determinação de tomate, alguns experimentos foram realizados para testar a potencialidade desta técnica na determinação desse tipo de amostra.

O estudo de recuperação para o pesticida aldicarbe foi realizado na amostra de tomate apenas na concentração de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Optou-se por trabalhar em concentrações no intervalo de $0,50$ a $1,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, pois acima deste valor inicia-se a saturação na superfície do eletrodo, ou seja, a porcentagem de inibição começa a se estabilizar. Esses estudos foram realizados utilizando-se o método de extração simples (o mesmo utilizado para o carbaril) e a recuperação obtida foi de $62,40\%$. Este valor é considerado relativamente baixo. Desta forma, o biossensor não se encontra apto para a determinação de aldicarbe em amostras de tomate, mas é promissor para determinação deste pesticida em outros tipos de amostras.

4.8 - Vantagens do biossensor enzimático

O biossensor baseado na enzima acetilcolinesterase mostrou-se bastante adequado para a determinação de pesticidas da classe dos carbamatos.

Naturalmente, para a detecção de carbaril e aldicarbe desse pesticida em tomate, encontra-se um pouco acima da faixa necessária para o consumo humano (normas governamentais), entretanto dentro do limite para outras matrizes de alimentos. Desta forma, a utilização do biossensor foi favorecida, pois a medida eletroquímica, sensível aos diferentes componentes da matriz, é feita em uma solução pura, sem qualquer interferente. Como a inibição se dá irreversivelmente no biossensor, este pode ser empregado como um papel de pH, sendo imerso na matriz, inibido, lavado e depois levado para uma célula eletroquímica em condições de alta pureza e a inibição estimada.

Uma das maiores limitações deste tipo de medida está relacionada com a reutilização do biossensor. Como a adsorção do pesticida no segmento serina da enzima é irreversível, procedimentos complexos de reativação da enzima podem ser necessários. Entretanto, com a enzima misturada na pasta de carbono, basta um polimento com papel sulfite para a exposição de uma superfície nova, com enzimas ativas, prontas para a repetição da medida.

Assim, este trabalho sugere uma alternativa bastante interessante para a avaliação de contaminação com pesticidas da classe dos carbamatos (inibidores da acetilcolinesterase) em frutas (morangos, maracujá, tomate, etc.) ou legumes (couve, cenoura, etc.).

4.9 - Reação em Solução

Com o intuito de aprender mais sobre a cinética da reação enzimática, foram realizadas medidas da reação entre o substrato AchI e a enzima AchE, ambos em solução. Neste trabalho o substrato AchI é eletroativo sobre o eletrodo de carbono vítreo, desta forma a reação enzimática pode ser seguida pela diminuição da corrente de oxidação do substrato AchI com a adição da

enzima AchE. Analisou-se também a inibição da enzima causadas por pesticidas das classes dos carbamatos e organofosforados.

4.9.1 – Comportamento eletroquímico do substrato AchI

Um exemplo típico de um voltamograma de onda quadrada para $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato AchI sobre o eletrodo de carbono vítreo pode ser visto na Figura 43, juntamente com a resposta do branco (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$). Observa-se um pico de oxidação bem definido em aproximadamente $0,75 \text{ V vs Ag/AgCl}$, que é proporcional à concentração do substrato.

Figura 43: Voltamograma de onda quadrada para o branco (—) e após a adição de $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato (—) para um incremento de 2 mV, amplitude de 50 mV, frequência de 50 Hz, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$, sem adição da enzima.

4.9.2 - Construção da curva analítica

Uma curva analítica foi construída para o AchI no intervalo de concentração de $5,00$ a $100,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 44) e apresentou uma sensibilidade de $0,53 \text{ A} / \text{mol L}^{-1}$ e linearidade de $0,995$. Essa curva foi empregada a fim de se determinar às concentrações do substrato após a adição da enzima, em diferentes tempos de reação.

Figura 44: curva analítica para o substrato AchI ($a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s =$ incremento de 2 mV e $f = 50 \text{ Hz}$, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) nas concentrações: $5,00$; $7,50$; $10,00$; $20,00$; $30,00$; $40,00$; $50,00$; $60,00$; $80,00$ e $100,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtidas de voltamogramas de onda quadrada similares àqueles mostrados na Figura 43.

4.9.3 – Adição da enzima AchE em solução

Com a adição da enzima ao substrato, a corrente de pico observada diminui com o tempo de reação e o potencial de pico se desloca para valores ligeiramente mais positivos, demonstrando a interação enzima-substrato

(Figura 45). Desta forma, a reação enzimática pode ser seguida pela diminuição da corrente de oxidação do substrato AchI com a adição da enzima AchE.

Figura 45: Voltamograma de onda quadrada para $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato (—) e após 5 minutos da adição da enzima (—) para um incremento de 2 mV, amplitude de 50 mV, frequência de 50 Hz, tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4.

4.9.4 – Adição de diferentes concentrações dos pesticidas

Os resultados obtidos após a adição de diferentes concentrações do pesticida fenitrothion à célula eletroquímica contendo o substrato e enzima, podem ser vistos na Figura 46.

Figura 46: Efeito da adição de pesticida na relação das correntes de pico (A) e dos $\ln C/C_0$ (B) com o tempo de reação para: < enzima-substrato e para as concentrações de fenitrothion: = $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e **P** $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Com a presença do pesticida na solução, a velocidade da reação foi inibida, observando-se uma diminuição na taxa de variação da corrente de oxidação do substrato com o tempo de reação. Esta diminuição é proporcional à quantidade de pesticida adicionado ao eletrólito (já contendo o substrato).

As relações lineares entre $\ln (C/C_0)$ vs. t , mostradas na Figura 46 **B**, sugerem uma cinética de reação de pseudo-primeira ordem. Pode-se observar que com a adição de pesticida houve inibição da atividade da enzima e esta inibição foi proporcional à quantidade de pesticida adicionada. Isto se deve a interação entre o fenitrothion e o sítio ativo da enzima e quanto maior a quantidade de pesticida, mais sítios ativos ocupados, impedindo assim a reação entre o sítio ativo e o substrato, fazendo com que a velocidade da reação diminua.

A Figura 47 mostra os resultados análogos obtidos após a adição de carbaril. Pode-se observar que ao aumentar a quantidade adicionada de pesticida, ocorre um aumento correspondente na inibição da atividade da enzima, porém com um efeito menos intenso, em relação  aquele observado com a adição de fenitrothion. Este efeito é relacionado com a maior toxicidade dos organofosforados no organismo, pois estes possuem uma interação irreversível

com o sítio ativo da enzima, resultando em uma atividade prolongada, já para o carbamato a inativação é reversível com o tempo, tendo uma duração de ação mais curta. Assim, como a reação ocorre em solução uma parte dos sítios ativos da enzima na presença do carbaril pode estar sendo liberado, fazendo com que a velocidade de reação seja maior.

Figura 47: Efeito da adição do pesticida na relação das correntes de pico (A) e dos $\ln C/C_0$ (B) com o tempo de reação para: < enzima-substrato e para as concentrações de carbaril: $= 5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $P 1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Usando as inclinações das Figura 46B e 47B e a equação 16, pode-se calcular o valor das constantes de velocidade para a etapa determinante da reação enzimática^{75,76}:

$$\ln C(t) / C(0) = kt \quad (\text{eq. 16})$$

onde: $C(t)$ é a concentração do substrato no tempo t e $C(0)$ a concentração inicial, k constante de velocidade da reação enzimática e t tempo da reação.

Na Tabela 13, estão apresentados os valores das concentrações dos pesticidas fenitrothion e carbaril e as constantes de velocidade obtidas para a reação enzimática na ausência e presença dos pesticidas.

Tabela 13: Valores da constante de velocidade da reação enzimática para diferentes concentrações dos pesticidas fenitrothion e carbaril.

	Concentração mol L⁻¹	k s⁻¹
substrato	2,00x10 ⁻⁴	4,00x10 ⁻⁴
Fenitrothion	0,50x10 ⁻⁴	3,40x10 ⁻⁴
	1,00x10 ⁻⁴	1,60x10 ⁻⁴
Carbaril	0,50x10 ⁻⁴	3,10x10 ⁻⁴
	1,00x10 ⁻⁴	2,30x10 ⁻⁴

Pode-se observar que quanto maior a concentração dos pesticidas em solução, menor a constante de velocidade. Os valores da constante de velocidade para os dois pesticidas com a concentração mais baixa (0,50x10⁻⁴ mol L⁻¹) apresentaram valores muito próximos, sendo que com o aumento da concentração o fenitrothion apresentou uma constante de velocidade menor que a do carbaril indicando a maior inibição da catálise enzimática.

Estes resultados possibilitam propor um método analítico com base na reação enzimática em solução, para a determinação destes pesticidas em amostras naturais.

5 - CONCLUSÃO

A utilização do biossensor baseado na enzima acetilcolinesterase mostrou-se eficiente para a determinação de carbamatos em diferentes tipos de matrizes, apresentando uma resposta rápida, além da eliminação do efeito da matriz. Desta forma, a metodologia desenvolvida é viável para esse tipo de análise.

A imobilização da enzima no corpo da pasta de carbono apresentou outras vantagens inerentes a este tipo de utilização, que reforçam o sucesso do procedimento desenvolvido. Uma das maiores limitações no emprego de biossensores esta relacionada com a renovação da superfície, após a adsorção, muitas vezes irreversível, do pesticida. Para solucionar este problema, procedimentos complexos de reativação, empregando reagentes químicos têm sido postulados. Neste caso, a renovação é extremamente facilitada, pois, com a enzima homogeneamente distribuída no corpo da fase, basta um polimento, num papel sulfite, por exemplo, para expor uma nova superfície totalmente ativada.

Outra vantagem inerente ao tipo de inibição provocada pela adsorção irreversível do pesticida é a possibilidade de se detectar a contaminação “in situ”, mesmo fora do laboratório. Com a imersão do biossensor na matriz contaminada, o pesticida se adsorve irreversivelmente, possibilitando o transporte deste detector para o laboratório e posterior avaliação da porcentagem de inibição e, conseqüentemente, da concentração do pesticida na matriz estudada.

Estes aspectos são pouco relatados na literatura e constituem uma vantagem característica do sistema desenvolvido neste estudo, bem como uma contribuição importante na área da eletroanálise.

Um outro aspecto inovador neste estudo se relaciona com a determinação da inibição causada pelo pesticida na atividade enzimática em solução. Na reação em solução a metodologia empregada neste estudo possibilitou a

determinação das constantes de velocidade para a etapa lenta da reação da enzima AchE com o substrato AchI. Observou-se que os valores destas constantes são dependentes da concentração dos pesticidas fenitrothion (organofosforado) e carbaril (carbamato), em baixa concentração ambos apresentaram constantes de velocidade similares, mas com o aumento dessa concentração, o fenitrothion apresentou menor constante de velocidade em relação ao carbaril, sugerindo que este apresenta maior inibição da enzima e por consequência maior toxicidade no organismo. Estes resultados constituem a base para a explicação do funcionamento do biossensor na detecção de pesticidas destas duas classes. Resultados deste tipo de estudo também são bastante raros na literatura e esta área merece uma maior atenção para o perfeito entendimento do funcionamento da metodologia eletroanalítica baseada na enzima em estudo.

6 - REFERÊNCIAS

- 01 - JONATAN, T. **Introduction of environmental studies**. 3. ed. New York: Saunders College, 1989. 304p.
- 02 – TOMATE. Disponível em: < <http://www.vitaminasecia.hpg.ig.com.br>> acesso em: 12 dez. 2005.
- 03 - ZONTA O. Maçã: Cooperativismo que dá frutos. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> acesso em: 12 dez. 2005.
- 04 - LARANJA BRASIL. Disponível em: <<http://www.laranjabrasil.com.br/>> acesso em: 03 dez. 2006.
- 05 - GALVAN, T. L.; PICANÇO, M. C.; BACCI, L.; PEREIRA, E. J. G.; CRESPO A. L. B. “Seletividade de oito inseticidas a predadores de lagartas em citros” **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 117-122, fev. 2002
- 06 - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/html/sosaude.htm>> acesso em: 03 dez. 2006.
- 07 – WIKIPEDIA: a enciclopédia livre: Couve. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Couve>> acesso em: 03 dez. 2006
- 08 - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO: Couve. Disponível em: http://minas.ceasa.mg.gov.br/prohort/qualidade_det.asp?cod_prod=COUX acesso em: 03 dez. 2006.
- 09 - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>> acesso em: 20 jun. 2005
- 10 - NUNES G.S., SKLÁDAL P., YAMANAKA H. BARCELÓ D. Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensor and chromatographic techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, p. 59-68, 1998.
- 11 - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA): Disponível em: <<http://www.epa.gov/>> acesso em: 01/08/2005

12 - DU PONT: Lannate[®]. Disponível em: <<http://www.dupontagricola.com.br>> acesso em: 26 de out. 2006.

13 - CASTRO, N.R.A.; RIGITANO, R. L. O.; LIMA, J. M.; BASTOS C. J. Lixiviação de Aldicarbe em macrolisímetros de dois Latossolos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 40, n. 8, p. 803-810, 2005.

14.- 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.

15 - HO, J. S. E TANG, P. H. Optimization of supercritical fluid extraction of environmental-pollutants from a liquid solid extraction cartridge. **Journal of Chromatographic Science**, v. 30, n. 9, p. 344-350, 1992.

16 - WAN, H. B.; WONG, M. K.; LIM, P. Y. E.; MOK, C. Y., Small-scale multi-residue method for the determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 662, p. 147-152, 1994.

17 - GRUESSNER, B.; SHAMBAUGH, N.C.; WATZIN, M.C. Comparison of an Enzyme Immunoassay and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Detection of Atrazine in Surface Waters, **Environment Science Technology**, v. 29, p.251-254, 1995.

18 - LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: componentes moleculares das células**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1976. p. 126-145.

19 - CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução a Bioquímica**, São Paulo: Edgard Blücher, 1980. p. 131-161.

20 - VALDMAN, B.; FOLLY, R.O.M.; ROCHA-LEAO, M.H.M.; LEITE, S. G. F. Biossensores: nova tecnologia em desenvolvimento. **INTEC-Instrumentação e controle de processo**, v. 7, p. 29-32, 1993.

21 - TRÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensor & Bioelectronics**, v.16, p.121-131 2001.

- 22 - OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores, **Química Nova**, v.11, p.432-435, 1988.
- 23 - FRIAS, M.J.B. Como agem os organofosforados no organismo humano e no de outros vertebrados, **Ciência Hoje**, v.31, n.183, p.8-9, 2002.
- 24 - FATIBELLO-FILHO, O.; CAAPELATO, M.D. "Biossensores". **Química Nova**, v.15, p.28-39, 1992.
- 25 - NUNES, G. S.; BARCELÓ, D.; GRABARIC, B. S.; DÍAZ-CRUZ, J. M. E.; RIBEIRO, M. L. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Analytica Chimica Acta**, v.399, p.37-49, 1999.
- 26 - YANG, S. S.; GOLDSMITH, A. I.; SMETENA, I. Recent advances in the residue analysis of N-methylcarbamate pesticides. **Journal of Chromatography A**, v.754, p.3-16, 1996.
- 27 - HART, A. L.; COLLIER, W. A.; E JANSSEN, D. The response of screen-printed enzyme electrodes containing cholinesterases to organo-phosphates in solution and from commercial formulations. **Biosensor & Bioelectronics**, v.12, n.7, p.645-654, 1997.
- 28 - MEDYANTSEVA, E. P.; VERTLIB, M. G.; KUTYREVA, M. P.; KHALDEEVA, E. I.; BUDNIKOV, G. K.; E EREMIN, S. A. The specific immunochemical detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5trichlorophenoxyacetic acid pesticides by amperometric cholinesterase biosensors. **Anaytica Chimica Acta**, v.347, p.71-78, 1997.
- 29 - ADAMS, R. N. Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, v.30, p.1576-1577, 1958.
- 30 - RICE, M.E.; GALUS, Z.; ADAMS, R.N. Graphite paste electrodes-Effects of paste composite and surface states on electron-transfer rates applicaton to anodic voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.143, p.89-102, 1983.
- 31 - KUWANA, T.; FRENCH, W.H. Electrooxidation or reduction of organic compounds in to aqueous solutions using carbon paste electrode. **Analytical Chemistry**, v.36, p.241-242, 1964.

- 32 - MARUSZEWSKI, W.; TROJANOWICZ, M. Graphite paste-based enzymatic glucose electrode for flow-injection analyst. **Analyst**, v. 113, p.735, 1988.
- 33 - WANG, J.; LIN, M.S. Mixed Plant Tissue-Carbon Paste Bioelectrode. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1545-1548, 1988.
- 34 - SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998. 917p.
- 35 - RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarographic determination of some pesticides. application to a study of their adsorption on lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2016-2021, 1992.
- 36 - MABBOT, G. A. Introduction to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697-701, 1982.
- 37 - RAMALEY, L.; KRAUSE JUNIOR, M. S. Theory of Square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1362-1365, 1969.
- 38 - RAMALEY, L.; KRAUSE JR.; M. S. Analytical application of square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1365-1369, 1969.
- 39 - SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- 40 - DAHMEN, E. A. M. F. **Electroanalysis: Theory and applications in aqueous and non-aqueous media in automated chemical control**. New York, Elsevier, 1986. 383 p.
- 41 - ZACHOWSKI, E. J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. The analytical application of square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 183, p. 47-57, 1986.
- 42 - BAIRD, C. **Environmental Chemistry**. 2. ed. New York: W.H. Freeman, 1999. p. 293-377.
- 43 - HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Trad. de Carlos Alberto da Silva Riehl. 5. ed. Rio de Janeiro, Ed. LTC, 1999, p. 392-395.

- 44 - CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy Science**, v. 102, p. 29, 1962.
- 45 - GUILBAULT, G.G.; MONTAVO, J. G. JR. A uréase-specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164-2165, 1969.
- 46 SKLÁDAL, P. Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. **Analytica Chimica. Acta**, v. 252, p. 11-15, 1991.
- 47 - SKALÁDAL, P. Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensor based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase. **Analytica Chimica Acta**, v. 269, p. 281-287, 1992.
- 48 - NUNES, G.S.; BARCELÓ, D.; GRABARIC, B. S.; DÍAS-CRUZ, J.M.; RIBEIRO, M.L. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 399, p. 37-49, 1999.
- 49 - CAMPANELLA, L.; DE LUCA, S.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. A new phase enzyme electrode for the analysis of organophosphorus pesticides and carbamates. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, p. 59-71, 1999.
- 50 - XAVIER, M. P.; VALLEJO, B.; MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C.; BALDINI, F.; FAAL, A. Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 14, p. 895-905, 2000.
- 51 - WILKINS, E.; CARTER, M.; VOSS, J.; IVNITSKI, D. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents. **electrochemistry communications**, v. 2, p. 786-790, 2000.
- 52 - 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.

53 - IVANOV, A. N.; LUKACHOVA, L. V.; EVTUGYN, G. A.; KARYAKINA, E. E.; KISELEVA S. G.; BUDNIKOV, H. C.; ORLOV, A. V.; KARPACHEVA, G. P.; KARYAKIN, A. A. Polyaniline-modified cholinesterase sensor for pesticide determination. **Bioelectrochemistry**, v. 55, p. 75-77, 2002.

54 - KOK F. N.; BOZOGLU F., HASIRCI V., Construction of an acetylcholinesterase_choline oxidase biosensor for Aldicarb determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 531-539, 2002.

55 - SHIM, J.H.; LEE, C.J.; KIM, M.R.; KIM, I.S.; JIN, L.T.; PARK, S. Detection of Carbamate Insecticides in Fruit nad Vegetable Sample with an Acetylcholinesterase Inhibition-Besed Bioassay. **Journal of pesticide sience**, v. 28, p. 318-321, 2003.

56 - BONI, A.; CREMISINI, C.; MAGARO, E.; TOSI, M.; VASTARELLA, W.; PILLOTON, R. Optimized Biosensors Based on Purified Enzymes and Engineered Yeasts: etection of Inhibitors of Cholinesterases on Grapes. **Analytical Letters**, v. 37, n. 8, p. 1683-1699, 2004.

57 - WEETALL, H. H.; MISHRA, N. N.; MAHFOUZ, A.; ROGERS, K. R. An Approach for Screening Cholinesterase Inhibitors in Drinking Water Using an Immobilized Enzyme Assay. **Analytical Letters**, v. 37, n. 7, p. 1297-1305, 2004.

58 - BUCUR, B.; ANDREESCU, S.; MARTY, J. Affinity Methods to Immobilize Acetylcholinesterases for Manufacturing Biosensors. **Analytical Letters**, v. 37, n. 8, p. 1571-1588, 2004.

59 - BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A.; MARTY, J. L. Biosensors based on highly ensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 115-121, 2006.

60 - ZOU, M. Q.; YANG, R.; WANG, D. N.; LI, J. F.; JIN, Q. H. A novel immobilized cholinesterase for on-site screening of organophosphate and carbamate compounds. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 162-166, 2006.

- 61 - POGAČNIK, L.; FRANKO, M. Determination of organophosphate and carbamate in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 14, p. 569-578, 1999.
- 62 - 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, n. 1, p. 59-73, 2003.
- 63 - 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.
- 64 - JIN, S.; XU, Z.; CHEN, J.; LIANG, X.; WU, Y. Qian X. Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 117-123, 2004.
- 65 - BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; TAMBURRO, D. A Simple and Rapid Assay for Analyzing Residues of Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 665-671, 2004
- 66 - GRANBY, K.; ANDERSEN, J. H.; CHRISTENSEN, H.B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520 p. 165–176, 2004.
- 67 - ZHANG, J.; LEE, H. K. Application of liquid-phase microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography–mass spectrometry to the determination of carbamate pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1117, p. 31-37, 2006.
- 68 - ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M.; A micro-Biuret Method for Estimating Proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 9, p. 401-410, 1964.
- 69 - 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. 88-95, 1961.

70 - BERGMAYER, H.U.; BERNT, E.; GRASSL, M; MICHAL, G. **Evaluation of Experimental Results**. In: Bergmeyer H.U. (Ed). Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: VHC Publishers, Inc., 1974, p.308-317.

71 - FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. **process Biochemistry**, v. 39, p. 957-962, 2004.

72 - LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 112-724, 1983.

73 - KRULL, I.; SWARTZ, M. Determining Limits of Detection and Quantitation. **LC-GC**, v. 16, n. 10, p. 922-924, 1998.

74 - RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 0, p. 1-10, 2004

75 - PELEGRINO, R. L.; DI IGLIA, R. A.; SANCHES, C.G.; AVACA, L.A.; BERTAZZOLI, R. Comparative study of commercial ixode eletrodes performance in electrochemical degradation of organics in aqueus solutions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.1, p.60-65, 2002.

76 - SEPP, A.; JÄRV, J. Solvente isotop effect on the reaction of acetylcholinesterase with alkanesulfonyl halogenides. **Bioorganic Chemistry**, v.21, p.61-70, 1993.