UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química de São Carlos

**Determinação de carbendazim em amostras de suco de laranja
por técnicas eletroquímicas. Uma avaliação estatística de
desempenho**

Érica Megumi Kataoka

São Carlos

2015

Érica Megumi Kataoka

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Determinação de carbendazim em amostras de suco de laranja por
técnicas eletroquímicas. Uma avaliação estatística
de desempenho

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos

2015

Agradecimentos

Aos meus pais, Yasushi e Ivete, pelo apoio, dedicação e compreensão. Aos meus irmãos, Éric e Éllen, que completam a minha família, base de tudo.

Aos demais familiares, que torceram por mim.

Ao Matheus, pela paciência, carinho, apoio e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, incentivo, apoio e principalmente pela amizade, sendo meu orientador desde a iniciação científica.

Aos colegas do GMEME (Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos): Naiza, Camila, Vanessa, Lívia, Jaqueline, Diego, Thiago, Codorna, Marcelo, Paulo, Anderson, pela amizade e companheirismo, especialmente a Lívia, pela ajuda inicial neste trabalho.

Ao sr. João, pela ajuda nos mais diversos assuntos.

Ao Dr. Dyovani Coelho pela ajuda com as discussões de parte do trabalho.

Aos amigos que encontrei em São Carlos: Pollyana, Ricardo, Graziela, Gleyci, especialmente a Pollyana, pela amizade e companheirismo.

As amigas Tatiani e Ariane, colegas de profissão muito queridas.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. N° 2013/01905-7) e bolsa estágio de pesquisa no exterior (BEPE) (Proc. N° 2014/15382-9).

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Resumo

Tendo em vista a necessidade de monitoramento dos níveis de pesticidas presentes em alimentos, utilizando técnicas mais rápidas e de menor custo em relação à técnica padrão empregada atualmente, neste trabalho, desenvolveu-se uma metodologia eletroquímica para a determinação do pesticida carbendazim. Empregou-se um tratamento estatístico discutido por Miller e Miller, diferente daquele utilizado pela IUPAC, para calcular parâmetros como reprodutibilidade e repetibilidade, limites de detecção e quantificação. Um eletrodo de carbono vítreo foi modificado pela deposição de um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados e decorados com nanopartículas de ouro. As nanopartículas metálicas foram ancoradas sobre os nanotubos utilizando citrato de sódio como agente redutor, a partir de um procedimento de síntese simples. Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, observou-se uma distribuição homogênea e um tamanho médio aproximado de 20 nm das nanopartículas de ouro. O desempenho deste eletrodo modificado para a oxidação dos pesticidas carbaril, etil-paration, malation e carbendazim foi investigado por voltametria de onda quadrada em tampão fosfato pH 7, porém apenas o fungicida carbendazim mostrou eletroatividade. Desta forma, os estudos posteriores se focaram neste pesticida. Os voltamogramas cíclicos relativos ao eletrodo modificado na presença do carbendazim sugeriram que o mecanismo eletroquímico da reação de oxidação do pesticida ocorre por uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química (mecanismo EC) e um esquema da reação de oxidação foi proposto. Com o perfil voltamétrico estabelecido, a voltametria de onda quadrada em tampão fosfato pH 7,0 foi utilizada para a determinação da curva analítica para o pesticida. O pico de oxidação do carbendazim foi medido em +0,76 V. Uma dependência linear da corrente de pico de oxidação com a concentração de carbendazim foi obtida, com a equação: $I_p = 0,1 + 4,30 [\text{carbendazim}]$, com $r^2 = 0,9911$ ($n = 5$). A metodologia desenvolvida apresenta um limite de detecção de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $5,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, numa faixa de linearidade no intervalo de 0,2 a $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Esta metodologia foi empregada na determinação de carbendazim em amostras de suco de laranja contaminadas artificialmente. A utilização de um teste t, de Student, mostrou que os valores recuperados pela voltametria não apresentaram qualquer diferença significativa em relação àqueles adicionados às amostras, fornecendo portanto, resultados precisos e exatos.

Abstract

Considering the need of monitoring pesticide levels in food, using faster and lower cost techniques compared to the standard technique currently employed, in this work, we developed an electrochemical method for the determination of pesticide carbendazim. We employed a statistical treatment discussed by Miller and Miller, different from that used by IUPAC, to calculate parameters such as reproducibility and repeatability, limits of detection and quantification. A glassy carbon electrode was modified by depositing a layer of multi-walled carbon nanotubes, functionalized and decorated with gold nanoparticles. The nanoparticles were anchored on the nanotubes using sodium citrate as reducing agent, employing a simple procedure of synthesis. A homogeneous distribution and an approximate average size of 20 nm of the gold nanoparticles were observed, by transmission electron microscopy. The performance of the modified electrode for oxidation of the pesticides: carbaryl, ethyl-parathion, malathion and carbendazim was investigated by square wave voltammetry in phosphate buffer, pH 7, but only the insecticide and fungicide carbendazim showed electroactivity. Thus, future studies focused on this pesticide. Cyclic voltammograms for the modified electrode in the presence of carbendazim suggested that the mechanism of electrochemical oxidation reaction of the pesticide is a reversible electronic transference followed by a chemical reaction (EC mechanism) and an oxidation reaction scheme was proposed. With the voltammetric profile established, the square wave voltammetry in pH 7.0 phosphate buffer was used to determine the calibration curve for the pesticide. The oxidation peak of carbendazim was measured at +0.76 V. A linear dependence of the oxidation peak current with the concentration of carbendazim was obtained, with equation: $I_p = 0.1 \pm 4.30 [\text{carbendazim}]$ with $r^2 = 0.9911$ ($n = 5$). The method has a detection limit of $1.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, and a quantification limit of $5.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, in the linear range from 0.2 to $3.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. This methodology was used in the determination of carbendazim in orange juice samples artificially contaminated. A t-test of Student showed that the amounts recovered by voltammetry showed no significant difference in relation to those added to the samples. Thus, this methodology has been validated for use in analysis of orange juice contaminated with carbendazim, providing accurate and precise results.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados obtidos para as culturas especificadas nos Estados da União. Programa PARA da ANVISA, 2012, 2ª Etapa	14
Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas dos pesticidas em estudo	18
Tabela 3 - Resumo dos valores de limites de detecção obtidos a partir das metodologias eletroquímicas discutidas na revisão da literatura	27
Tabela 4 - Parâmetros voltamétricos do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ para os diferentes eletrodos de trabalho (CV – carbono vítreo, CV/MWCNT, CV/MWCNT – AuNPs)	47
Tabela 5 - Valores dos parâmetros otimizados para a voltametria de onda quadrada.....	56
Tabela 6 - Valores das correntes de pico obtidos a partir da Figura 20 e parâmetros estatísticos calculados.....	61
Tabela 7 -Valores das correntes de pico obtidos a partir da Figura 19 e sua conversão para concentrações de carbendazim utilizando a equação (9).....	62
Tabela 8 - Valores das concentrações de carbendazim obtida e adicionada, juntamente com os valores calculados e o valor tabelado de t . Grau de confiança de 95% para $n=5$ e $s = 0,23$	63

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da célula eletroquímica	32
Figura 2 - Espectros de FTIR na região do infravermelho para MWCNT antes (—) e após (—) tratamento em meio ácido	40
Figura 3 - Imagens de microscopia óptica do eletrodo de carbono vítreo (A, B); eletrodo de carbono vítreo modificado com 1 gota da suspensão (C, D); eletrodo de carbono vítreo modificado com 2 gotas de suspensão (E, F)	42
Figura 4 - Imagens de MET dos nanotubos de carbono funcionalizados (A) e nanotubos de carbono modificados com nanopartículas de ouro, obtidas a partir da síntese 1 (B) e síntese 2 (C).....	43
Figura 5 - Espectro na região do UV-vis do sobrenadante da síntese 1	44
Figura 6 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs -AuNPs, antes (—) e após (—) pré-tratamento eletroquímico em H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ de 0 a 1,4 V.Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Potencial inicial 0,0 V.....	46
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de carbono vítreo sem modificação (—), modificado com MWCNT (—) e MWCNT - AuNPs (—) na presença de 3×10^{-3} mol L ⁻¹ do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹	46
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT (a) e com MWCNT - AuNPs (b) em tampão fosfato pH 7, na ausência (—) e presença (—) de 4×10^{-4} mol L ⁻¹ de carbendazim. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ . Ei = 0,0 V	48
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs em tampão fosfato pH 7, na presença de 4×10^{-4} mol L ⁻¹ de carbendazim. Intervalo de potencial: 0 a 1,2 V. Variação de velocidade de varredura de 10 a 100 mV s ⁻¹ , Ei = 0 V	49
Figura 10 - Gráfico de I_{pa} vs v (■) e I_{pa} vs $v^{1/2}$ (○).....	50
Figura 11 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-AuNPs em tampão fosfato pH 7, na presença de 6×10^{-6} mol L ⁻¹ de carbendazim. Varredura direta (—) e reversa (—).Parâmetros utilizados: frequência 40 Hz; amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V. A seta indica o potencial inicial e a direção de varredura.....	51
Figura 12 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT -AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração 6×10^{-6} mol L ⁻¹ e soluções de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , com pH de 1 a 9. Parâmetros utilizados: frequência 40Hz; amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V.....	52
Figura 13 - Valores de $I_{pa}/\Delta E_{p1/2}$ versus pH.....	53

Figura 14 - Variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V	54
Figura 15 - Variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: frequência 30 Hz; salto de potencial 0,001 V	55
Figura 16 - Variação do salto de potencial. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: frequência 30 Hz; amplitude 60 mV	55
Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo MWCNT - AuNPs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, contendo diferentes quantidades de carbendazim: (1) branco, (2) 2×10^{-7} , (3) 3×10^{-7} , (4) $4,0 \times 10^{-7}$, (5) 5×10^{-7} , (6) $6,0 \times 10^{-7}$, (7) $7,0 \times 10^{-7}$, (8) 8×10^{-7} , (9) $1,5 \times 10^{-6}$, (10) 2×10^{-6} , (11) $2,5 \times 10^{-6}$, (12) $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com os seguintes parâmetros da onda quadrada: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV	57
Figura 18 – Curva analítica para concentrações crescentes do pesticida carbendazim, em tampão fosfato pH 7,0	58
Figura 19 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo MWCNT - AuNPs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + suco de laranja (razão em volume 1:9 suco:tampão) contendo diferentes quantidades de carbendazim: (1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-7}$, (3) $5,0 \times 10^{-7}$, (4) $1,0 \times 10^{-6}$, (5) $1,5 \times 10^{-6}$, (6) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV	60
Figura 20 – Cinco repetições dos voltamogramas de onda quadrada, na presença de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbendazim. Parâmetros utilizados: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV	61

Lista de Abreviaturas

US – EPA – United States – Environmental Protection Agency

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

LMR – Limites Máximos de Resíduos

OMS – Organização Mundial da Saúde

LC-MS – Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe

QDs – Quantum Dots

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

PTFE – politetrafluoretileno

DMF – N, N-dimetil-formamida

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, Multi Walled Carbon Nanotubes)

MWCNT-AuNPs – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com nanopartículas de ouro

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês, Square Wave Voltammetry)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
Revisão dos resultados mais significativos da literatura	17
2 OBJETIVOS	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Reagentes e Soluções.....	30
3.2 Instrumentação Geral.....	31
3.3 Materiais e instrumentos para medidas eletroquímicas	32
3.4 Procedimento Experimental	32
3.4.1 Purificação / funcionalização dos nanotubos de carbono	32
3.4.2 Modificação dos nanotubos de carbono com nanopartículas de ouro	33
3.4.3 Limpeza e pré-tratamento dos eletrodos de carbono vítreo.....	33
3.4.4 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro.....	34
3.4.5 Caracterização morfológica e eletroquímica do sensor	34
3.4.6 Comportamento eletroquímico do carbendazim sobre a superfície do sensor	34
3.5 Procedimento Analítico	34
3.5.1 Preparo das Amostras na Análise Eletroquímica	34
3.5.2 Análise Voltamétrica	35
3.6 Análise Estatística	35
3.6.1 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	35
3.6.2 Comparação de valores de média. Teste t de Student	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono	39
4.2 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro.....	41
4.3 Caracterização dos nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro	42

4.4 Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro.....	45
4.5 Comportamento eletroquímico dos pesticidas sobre os eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro	47
4.6 Comportamento eletroquímico do pesticida carbendazim sobre os eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro	47
4.6.1 Voltametria Cíclica.....	48
4.6.2 Voltametria de onda quadrada.....	50
▪ Variação do pH do tampão fosfato	52
▪ Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	53
4.7 Determinação eletroquímica de carbendazim.....	56
4.7.1 Determinação de carbendazim em tampão fosfato.....	56
4.7.2 Determinação de carbendazim em suco de laranja.....	59
5 CONCLUSÕES.....	64
ANEXO I	65
6 REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O constante aumento do número de pessoas na Terra é uma fonte de preocupação quanto à sua qualidade de vida. Já em 1798, Malthus publicava que “O poder do aumento da população é tão superior ao poder da terra em produzir a subsistência para o homem que a morte prematura deve, sob qualquer forma, visitar a raça humana. Se não houver mudanças, uma fome gigantesca e inevitável começará, com a explosão do nível populacional em relação à produção de comida no mundo”.¹ Felizmente as previsões pessimistas de Malthus ainda não se concretizaram, porém a explosão populacional prevista vem, sim, sendo observada. O número de pessoas existentes na Terra era de 682 milhões em 1700, 978 milhões em 1800, em 1900 de 1,650 bilhões, em 2000 de 6 bilhões e em 2050, 8,9 bilhões de pessoas deverão habitar a Terra.² Esta curva exponencial tem mostrado sinais de estabilização, principalmente com a diminuição do aumento de população nos países desenvolvidos.² Claramente, para se evitar a “fome gigantesca” prevista por Malthus, é necessário um aumento proporcional na produção de alimentos.

A produção mundial de alimentos tem aumentado substancialmente no último século.³ Entretanto, apesar da diminuição da proporção do número de pessoas subnutridas, a demanda por alimentos deve aumentar continuamente. O aumento na produção mundial de alimentos pode ser atribuído, principalmente, ao aumento proporcional do uso de pesticidas e à maior taxa de irrigação, com a respectiva elevação do consumo de água.

Atualmente, a utilização de pesticidas para aumentar a eficiência da produção agrícola é indispensável. Por exemplo, apenas 43% dos cereais produzidos no mundo estão disponíveis para o consumo humano, sendo uma grande parte perdida para pestes durante os processos de estocagem e distribuição.³

Segundo a United States – Environmental Protection Agency (US-EPA), pesticidas são substâncias (ou misturas) usadas para destruir, suprimir ou alterar o ciclo de vida de qualquer peste.⁴ Um pesticida pode ser natural ou sintético. Um pesticida pode ser um organismo, como a bactéria *Bacillusthuringiensis*, usada para controlar insetos, ou até mesmo uma planta modificada geneticamente, por exemplo.⁴ Assim, esta definição cobre um amplo espectro de substâncias. Pesticidas podem ser classificados de acordo com sua atuação – como herbicidas, inseticidas, acaricidas, nematocidas – assim como por sua classe química – por exemplo organofosforados, organoclorados e carbamatos. Normalmente, são substâncias sintéticas, altamente tóxicas e que, se utilizadas em quantidades descontroladas, podem se

transformar em ameaça à saúde pública, pela contaminação do meio ambiente, de aquíferos, do solo ou do ar. Esta ameaça torna-se ainda mais grave quando se observa, como publicou Pimentel em 1995,⁵ que de todo pesticida liberado no meio ambiente, apenas 0,1% atinge o alvo (as pragas), sendo que os outros 99,9% estão em “qualquer outro lugar”. Eventualmente, uma parte dos pesticidas liberados no meio ambiente pode atingir o ser humano, acumulando-se no seu organismo e causando uma série de disfunções e doenças. A toxicidade destes poluentes e seus efeitos nefastos no meio ambiente têm sido intensamente estudados desde a publicação, em 1962, do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson,⁶ o qual fez um alerta sobre as consequências da utilização, nos Estados Unidos, do pesticida DDT – dicloro-difenil-tricloroetano – um organoclorado atualmente banido em todo o mundo.

Apesar dos pesticidas terem trazido um benefício incontestável aos seres humanos, aumentando o rendimento agrícola e controlando pragas, o seu uso extensivo e sem controle tem sido uma ameaça constante à saúde da população. Os efeitos tóxicos de pesticidas têm sido discutidos com frequência na literatura científica. O contato prolongado com estas substâncias, ou seja, a intoxicação crônica, que ocorre devido à absorção dos pesticidas pelo organismo no decorrer dos anos, pode alterar as funções de diferentes órgãos do corpo humano, incluindo nervos, sistemas endócrino, reprodutivo, renal, cardiovascular e respiratório. Estas alterações podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes.^{7,8,9,10}

A exposição do corpo humano à ação dos pesticidas pode ocorrer através do ar ou da água. Entretanto, indubitavelmente, a maior fonte de absorção destas substâncias tóxicas está relacionada com a alimentação. O excesso de pesticidas em alimentos, inclusive aqueles comercializados em supermercados e varejões, é um tema de discussões recorrentes. Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de monitorar os níveis de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor.¹¹ O PARA é coordenado pela ANVISA, que atua em conjunto com os órgãos de Vigilância Sanitária e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública de diversos estados. Segundo a ANVISA, o PARA visa aumentar a segurança alimentar, prevenindo intoxicações agudas ou crônicas resultantes da exposição dietética indevida aos pesticidas. Este programa monitora os alimentos comercializados no varejo, os quais devem apresentar níveis de resíduos de agrotóxicos abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA para cada agrotóxico. Além disto, possibilita verificar se os pesticidas utilizados são registrados no país e se foram aplicados em culturas

para as quais eles foram autorizados.¹² Em outubro de 2014 foi publicado um relatório complementar àquele publicado em 2012, onde os resultados de resíduos de agrotóxicos em 1.397 amostras obtidas de culturas de abobrinha, alface, feijão, milho (fubá), tomate e uva foram apresentados.¹² A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para cada Estado da União:

Tabela 1 - Resultados obtidos para as culturas especificadas nos Estados da União. Programa PARA da ANVISA, 2012, 2ª Etapa

Produto	Resultado	AC	AL	AM	AP	BA	CE	DF	ES	GO	MA	MG	MS	MT	PA	PB	PE	PI	PR	RJ	RN	RO	RR	RS	SC	SE	SP	TO
Abobrinha	I	3	5	5	3	4	3	1	7	3	5	6	3	4	3	2	2	1	7	6	6	4	-	5	7	5	7	3
	A	5	10	7	4	10	9	9	10	9	8	10	9	10	9	8	10	9	10	10	10	8	-	9	9	10	10	7
Alface	I	9	3	8	5	3	5	2	5	1	5	4	6	6	2	1		5	3	7	2	3	2	6	1	2	7	4
	A	10	9	8	6	9	11	9	9	10	8	10	10	9	10	8	8	10	9	10	10	9	2	11	8	10	9	8
Feijão	I	2		3			1	1	1	1	1					1	2				1	1			2			1
	A	10	10	10	3	10	10	10	10	10	10	9	9	10	10	8	10	9	10	9	10	7	3	10	10	8	10	10
Fubá de Milho	I					2								1	1										2			
	A	10	9	8	2	10	8	10	9	5	6	10	9	10	7	2	2	7	10	9	9	7	1	10	10	8	10	10
Tomate	I		1			1	4			3	2		2	1	1	2	1	6	1	2	1	1	-	2	1	1		6
	A	10	10	10	8	10	9	8	10	10	9	10	7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	9	10	10	6	10
Uva	I	3	6	2	1	6	5	2		2	2		3	5	2		2	2	4	2	3	2		1	2	3	1	6
	A	9	10	10	3	10	9	10	9	10	8	9	8	10	8	8	10	9	9	9	9	6	1	10	10	8	9	8
Total de amostras insatisfatórias por UF		17	15	18	9	16	18	6	13	10	15	10	14	17	9	6	7	14	15	17	13	11	2	14	15	11	15	20
Total de amostras analisadas por UF		54	58	53	26	59	56	56	57	54	49	58	52	59	54	44	50	54	58	57	58	47	7	59	57	54	54	53

I : Nº de amostras insatisfatórias
A : Nº de amostras analisadas
- : Amostras não coletadas ou análises não realizadas

Fonte: Relatório complementar da ANVISA, 2014¹²

Nesta Tabela, 25% dos resultados foram considerados insatisfatórios por mostrarem resíduos de produtos não autorizados ou autorizados em concentrações superiores ao LMR para as culturas especificadas. Daí se conclui que um quarto dos alimentos consumidos, da lista apresentada na Tabela 1, estão sendo distribuídos à população contaminados com concentrações de pesticidas suficientes para serem considerados como ameaça à saúde pública.

Após estas constatações, feitas em 2012, a situação dos agrotóxicos presentes em alimentos piorou, apesar do controle da ANVISA (diversas multas e advertências a supermercados e varejões foram distribuídas como consequência dos resultados acima). Em 4 de outubro de 2015, a Folha de São Paulo publicou uma reportagem no caderno Cotidiano, com o título: “*Sem controle, alimentos circulam com agrotóxico irregular no país*”.¹³ Nesta reportagem, resultados da análise de amostras de pimentão, morango, alface, tomate, mamão e

fubá de milho, coletadas pela ANVISA no Estado de São Paulo, mostraram que 31% das amostras apresentaram agrotóxicos proibidos ou em quantidade acima da permitida, onde 90% das amostras de pimentão foram consideradas insatisfatórias, assim como 70% das de morango, 60% de alface, 22% de tomate, 11% de mamão e 10% de fubá de milho.

Esta situação é inaceitável. O consumo de frutas, legumes e verduras tem sido recomendado por médicos como preventivo para certos tipos de câncer e outras doenças crônicas devido à presença de fibras e compostos com atividade fitoquímica como flavonoides e antocianinas, antioxidantes naturais e presentes em tomate, uva, por exemplo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de, pelo menos, 400 g/dia destes alimentos¹² para que se obtenha um ganho nutricional significativo na prevenção daquelas doenças. O aumento de consumo destes alimentos não pode ser associado com o aumento na ingestão de pesticidas, com seus efeitos nocivos. A solução para este problema de saúde pública passa, necessariamente, pelo aumento do monitoramento de pesticidas em alimentos e do aumento do rigor da legislação para coibir a comercialização de produtos contaminados. Esta contaminação afeta, inclusive, as exportações do país, pois o mercado nos países do primeiro mundo é muito atento a este tipo de contaminação. Monitoramento significa aumentar o ritmo das análises de resíduos de pesticidas no país. A ANVISA **publicou os resultados de análises de amostras coletadas em 2012, somente em outubro de 2014.**¹² É extremamente importante que estas análises sejam feitas em menor tempo, assim como diminuir os seus custos para possibilitar um controle mais efetivo.

A análise de amostras de pesticidas em alimentos é uma área especializada da Química Analítica moderna, onde a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas é de grande importância.¹⁴ A quantificação e identificação confiável de resíduos de pesticidas em alimentos são necessárias, visando atender a crescente legislação restritiva existente sobre **limites de resíduos permitidos**. O caráter polar da maioria dos pesticidas usados atualmente, assim como o de seus metabólitos, indica o uso da cromatografia líquida acoplada com a detecção por espectrometria de massas (LC-MS) como a técnica recomendada para estas determinações. A ANVISA utiliza, nas análises do PARA, o método analítico **multirresíduos**, ou outras metodologias específicas previamente validadas. Para isto, o analito é previamente extraído das amostras utilizando os métodos QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe, ou seja, rápido, fácil, barato, confiável e seguro) e Mini-Luke modificado. O método QuEChERS consiste na extração com acetonitrila de 10 g da amostra de alimentos triturada, remoção da água residual e adsorção do analito em um adsorvente por extração em fase

sólida.¹⁵ Segundo os autores, este método permite a análise de uma batelada de 6-12 extratos em 20 a 30 minutos, por um único analista. Já o método Mini-Luke é descrito como uma extração da amostra utilizando acetona, seguida de uma partição líquido-líquido utilizando éter de petróleo e diclorometano. O extrato resultante é analisado por LC-MS/MS.¹⁶ **O custo e tempo de execução destas metodologias tem limitado, e muito, o monitoramento de pesticidas em amostras de alimentos em países em desenvolvimento, como o Brasil.** Alternativas mais rápidas e menos custosas têm sido intensamente procuradas.

Na última década, o **Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos** do Instituto de Química de São Carlos, USP, tem dedicado uma de suas linhas de pesquisas ao desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de pesticidas em amostras de alimentos.^{17,18,19,20,21,22,23} Estas metodologias se baseiam nas características das técnicas eletroquímicas para a determinação de pesticidas. Técnicas como a voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial, cronoamperometria, são executadas em eletrodos avançados, com a sua superfície modificada por camadas auto organizadas, filmes finos de nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas metálicas, polímeros condutores, etc. Este conjunto de eletrodos/técnicas eletroquímicas apresenta grande seletividade (os potenciais de oxidação ou de redução das moléculas de pesticidas ou seus resíduos são muito seletivos em relação a possíveis interferentes na matriz), sensibilidade (possibilitam a detecção no nível de 10^{-9} mol L⁻¹ ou menor), reprodutibilidade (tanto da medida como da confecção do eletrodo modificado), repetibilidade e robustez (sendo possível um grande número de determinações com um único eletrodo) para a aplicação nesta área da Química Analítica. Além disso, em relação às técnicas cromatográficas, as técnicas eletroquímicas são rápidas, baratas, podem ser aplicadas em equipamentos miniaturizáveis, possibilitando análises *in situ* (por exemplo, em supermercados, varejões ou hortas), em tempo real e não requerem mão de obra qualificada.

O grande problema com as técnicas eletroanalíticas é que elas ainda não foram validadas, assim não são comumente aceitas por órgãos regulamentadores para a análise de pesticidas. Desta maneira, ainda não é possível utilizar as técnicas eletroanalíticas para analisar amostras reais e fazer o monitoramento dos níveis de pesticidas presentes em alimentos, tal como é feito no programa PARA da ANVISA.

Revisão dos resultados mais significativos da literatura

Neste item, os resultados mais relevantes da aplicação de técnicas eletroanalíticas para detecção de pesticidas em amostras de alimentos, publicados nos últimos 5 anos, para diversos pesticidas, tais como paraoxon, metil-paration, carbaril, metomil, aldicarb, carbendazim, entre outros, serão apresentados e discutidos. A pesquisa foi conduzida no Science Direct, a partir do dia 30 de outubro de 2015. Ressalta-se que esta revisão não é completa e visa apenas listar algumas aplicações de técnicas eletroquímicas e biossensores amperométricos na detecção de pesticidas. Não foram incluídos trabalhos de revisão pois em geral, suas informações são muito resumidas.

Na tabela 2, abaixo, se encontram as fórmulas estruturais de alguns dos pesticidas apresentados nesta revisão da literatura, a nomenclatura padrão e o grau de periculosidade para a saúde humana, conforme estabelecido pela ANVISA (grau 1: maior periculosidade).

Nos últimos dez anos, o desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados, trouxe um grande avanço na área de sensores e biossensores eletroquímicos. Materiais como nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas metálicas, nanopartículas de metais semicondutores (os assim chamados “Quantum Dots” – QDs), são indispensáveis no monitoramento e quantificação de espécies poluentes do meio ambiente. Esta grande evolução impulsionou a eletroanálise de substâncias perigosas à saúde humana, como os pesticidas em alimentos.

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas dos pesticidas em estudo

Fórmula Molecular	Nome oficial IUPAC	Função	Classe (ANVISA)
Paraoxon	Fosfato de dietila-4-nitrofenila Massa Molar: 275,19g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	1
Metil-paration	O,O-dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato Massa Molar: 291,30g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	1
Carbaril	1-naftilo-metilcarbamato Massa Molar: 201,22 g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	3
Metomil	S-metil N-[(metilcarbamoil)oxi]-tioacetamida Massa Molar: 162,20 g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	3
Aldicarb	2-metil-2-(metiltio)propanal O-(N-metilcarbamoil)oxima Massa Molar: 190,27 g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	1
Carbendazim	Metil benzimidazol-2-ilcarbamato Massa Molar: 191,19 g mol ⁻¹	Inseticida (inibidor da enzima acetilcolinesterase)	1

Fonte: Autoria própria. A classificação toxicológica dos pesticidas foi obtida do site <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>, visitado em 2 de novembro de 2015

Em 2010, Alizadeh ²⁴ desenvolveu um sensor voltamétrico para paraoxon, utilizando um filme de polímero molecularmente impresso (MIP) integrado a um transdutor eletroquímico. Três tipos de eletrodo foram desenvolvidos: partículas MIP ocluídas em pasta de carbono (MIP-CP), MIP acoplado ao eletrodo de carbono vítreo usando poli-epiclorohidrina (MIP/PECH-GC), e uma fina camada da mistura MIP/grafite sobre o eletrodo de carbono vítreo (MIP/Grafite-PECH-GC). A metodologia de quantificação incluía a extração do analito no eletrodo, lavagem e determinação eletroquímica do paraoxon por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. A etapa de concentração e lavagem da superfície seletiva minimiza qualquer tipo de efeito de matriz, embora, segundo o autor, também diminua a resposta de corrente nos eletrodos MIP/PECH-GC e MIP/Grafite-PECH-GC). Para o eletrodo MIP/CP sem utilizar a etapa de lavagem, observou-se um pico de oxidação em aproximadamente 0,38 V; para o MIP/grafite-PECH-GC e MIP/PECH-GC em aproximadamente 0,28 V. A resposta do sensor MIP-CP foi linearmente proporcional à concentração de paraoxon no intervalo entre 3,8-750 nmol L⁻¹, enquanto para o MIP/grafite-PECH-GC foi entre 40-460 nmol L⁻¹ e para o MIP/PECH-GC, no intervalo de 55-420 nmol L⁻¹. Assim, dentre os três sensores, o sensor MIP-CP apresentou maior sensibilidade, e um limite de detecção de 1×10^{-9} mol L⁻¹, calculado pelo método da IUPAC (S/N=3). Este sensor foi empregado para a análise de paraoxon em amostras de couve contaminadas artificialmente, com uma recuperação de 98,4%, com um desvio padrão relativo (RSD) de 4,2%.

Chen *et al.* ²⁵ propuseram um biossensor para metil-paration usando um nanocompósito e a enzima metil-parationhidrolase (MPH/SP@AuNPs/MWCNTs/GCE). O filme de nanocompósito foi preparado pela formação de nanopartículas de ouro sobre partículas de sílica, misturados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, seguida da imobilização covalente da enzima metil-paration hidrolase. Este filme foi imobilizado de maneira a ter uma grande área superficial e alta condutividade. A técnica eletroquímica utilizada foi a voltametria de onda quadrada, onde nenhum pico redox foi observado para o biossensor (MPH/SP@AuNPs/MWCNTs/GCE) na ausência de metil-paration em solução. Após a adição do pesticida, um pico de oxidação foi observado em 589 mV devido à oxidação do 4-aminofenol (gerado na reação enzimática), para quinonaimina. A corrente de pico relacionada a este pico de oxidação mostrou-se linearmente proporcional à concentração de metil-paration em solução, no intervalo de 0,001 µg mL⁻¹ a 5,0 µg mL⁻¹, com um limite de

detecção de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$. Este biossensor foi empregado na análise de metil-paration em amostras de alho.

Sanghavi *et al.* ²⁶ utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de carbono (CNP) e nano partículas de argila tipo *halloysite* (um mineral aluminosilicato argiloso com fórmula empírica $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com uma estrutura predominantemente nanotubular oca) (HNC), para a determinação de metil e etil-paration por redissolução. Neste caso, o eletrodo de pasta de carbono foi preparado com a composição de 70:30 (grafite:óleo mineral) em massa. Já o eletrodo modificado foi obtido pela incorporação de HNC ao grafite e empregando Nujol como aglutinante, numa composição de 63:7:30 (grafite:HNC:óleo mineral) em massa. O eletrodo modificado com CNP apresentava a composição de 66:4:30 (grafite:CNP:óleo mineral) em massa e o HNC-CNP-CPE, 59:7:4:30 (grafite:HNC:CNP:óleo mineral) em massa. Estes eletrodos foram empregados na determinação dos pesticidas em amostras de frutas (laranja e maçã) e vegetais (tomate e couve) obtidas do mercado local, limpas e homogeneizadas. Após procedimento de extração, as amostras foram contaminadas com soluções estoque de $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metil paration e $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de etil-paration, de forma a ter uma concentração final na célula eletroquímica, no intervalo entre 1×10^{-8} a $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. As análises foram feitas por redissolução cronopotenciométrica em tampão acetato, pH 5,0, após uma etapa de pré-concentração. Os parâmetros utilizados foram $E_{ac} = -0,9 \text{ V}$, $t_{ac} = 120 \text{ s}$ e corrente de redissolução de $i_{str} = +0.45 \text{ }\mu\text{A}$. Os autores encontraram limites de detecção de $4,70 \times 10^{-10}$ e $3,67 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para MP e EP, respectivamente.

Cesarino *et al.* ²² desenvolveram um biossensor para a detecção de carbamatos em frutas e vegetais, baseado na imobilização da enzima acetilcolinesterase em uma estrutura tipo “core-shell” de nanotubos de carbono recoberto com polianilina. A estrutura “core-shell” foi obtida pela eletrodeposição conjunta de polianilina e nanotubos de carbono de paredes múltiplas por voltametria cíclica a partir de 25 mL de um eletrólito contendo H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 500 μL de anilina e 7,0 mg de nanotubos de carbono funcionalizados, sobre um eletrodo de carbono vítreo. Devido à estrutura extremamente porosa do filme obtido e à capacidade catalítica dos nanotubos de carbono e da polianilina, não foi necessário o emprego de promotores de ligações cruzadas (glutaraldeído, por exemplo) ou de mediadores (ftalocianina de cobalto, por exemplo) para a imobilização da enzima. Isto possibilitou a obtenção de uma alta taxa de atividade enzimática após a imobilização. Este dispositivo foi utilizado para a determinação de carbaril e metomil em amostras de maçã, brócolis e couve. Os limites de

detecção para carbaril e metomil foram de 1,4 e 0,95 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os autores reportam ainda uma reprodutibilidade e repetibilidade de 2,6% e 3,2%. Os limites de detecção encontrados estão muito abaixo dos valores máximos de resíduos destes pesticidas, estabelecidos pelo governo brasileiro, e são similares aos resultados obtidos por cromatografia.

Raghu *et al.*²⁷ demonstraram o desenvolvimento de um biossensor da enzima acetilcolinesterase para a determinação de metil-paration e monocrotofos em amostras de água e de frutas (laranjas, bananas e tomate). O biossensor foi preparado a partir da mistura de 2 mL de uma solução de tetraetilortosilicato (TEOS), 1 mL de água, 50 μL de HCl 0,1 mol L^{-1} e 25 μL de Triton X-100 10%, que foi agitada até a obtenção de um sol-gel de sílica. A mistura foi homogeneizada antes de cada utilização e armazenada a -20°C por dois meses. Adicionou-se 5 μL desta mistura a 45 μL de tampão fosfato contendo 0,5 U da enzima e a solução resultante foi homogeneizada por agitação. Gotejou-se 4 μL desta solução sobre a superfície do eletrodo de pasta de carbono e deixou-se secar por 3-5 minutos.²⁷ Este biossensor foi utilizado para a determinação direta de pesticidas em amostras contaminadas artificialmente no nível de ppb, sem qualquer etapa prévia de pré-tratamento da amostra. A tiocolina produzida no processo enzimático é oxidada e apresenta um pico em 0,6 V *vs.* SCE. Este biossensor amperométrico apresentou limites de detecção de 0,04 ppb e 0,14 ppb para o metil-paration e monocrotofos, respectivamente, os quais foram calculados pelo método proposto pela IUPAC.²⁸ A aplicação deste biossensor na análise das amostras proporcionou recuperações de 77%, 84% e 92% para laranja, tomate e banana, respectivamente.

Zhao *et al.*²⁹ apresentaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme molecularmente impresso (MIP) de polímero-líquido iônico-grafeno para determinação de metil-paration. O eletrodo foi preparado pelo recobrimento do carbono vítreo com uma mistura de líquido iônico-óxido de grafeno, seguido da suspensão MIP. Esta foi preparada dissolvendo-se 65,7 mg (0,25 mmol) de metil-paration em 35 mL de metanol desidratado, 87 μL de ácido metacrílico (1 mmol), 0,95 mL (5 mmol) de dimetacrilato de etilenoglicol e 12 mg de 2,2'-Azobis-(isobutironitrila). A solução resultante foi desaerada por 10 minutos num banho ultrassônico, purgada com N_2 por 10 minutos e selada numa atmosfera de N_2 , até o uso. O eletrodo resultante foi então condicionado em -1,3 V *vs.* SCE em Na_2SO_4 por 600 s, para reduzir o óxido de grafeno.²⁹ Sob condições otimizadas, a resposta de corrente de pico do eletrodo foi linear com a concentração de metil-paration com um limite de detecção de 6 nmol L^{-1} . O desvio padrão relativo de cinco determinações de metil paration com um mesmo

eletrodo foi de 2,3% e com vários eletrodos de 6,4%. O sensor foi aplicado na determinação do pesticida em amostras de couve e de maçã contaminadas artificialmente, com recuperações na faixa de 97 a 110%.

Yao *et al.*³⁰ propuseram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes simples funcionalizados com ácido carboxílico e β -ciclodextrina para a detecção de metil-paration em amostras de vegetais. Neste caso, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado com uma suspensão contendo 20 ou 50 mg mL⁻¹ de β -ciclodextrina dissolvida em água a 60° C e diferentes quantidades de nanotubos de carbono de paredes simples. Esta suspensão foi gotejada em alíquotas de 5 μ L na superfície do carbono vítreo e seco com uma lâmpada infravermelho. Este eletrodo exibiu um limite de detecção de 0,4 ng mL⁻¹. Utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial, em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, onde foi observado um pico em -0,07 V. Com estes eletrodos, amostras de cebola, alface, bagaço e espinafre foram contaminadas artificialmente e analisadas, com recuperações de 92 a 107%. Os autores estudaram ainda a ação de diferentes interferentes como: derivados de nitrofenil, metil paraoxon, carbaril, atrazina, bentazona e furadan, assim como espécies inorgânicas como chumbo, cálcio, níquel, zircônio, ferro, cobre, sulfato, fosfato, nitrato e nitrito, e observaram que a variação de corrente de pico foi menor que 5% em todos os casos, sugerindo assim uma boa seletividade.

Oliveira *et al.*³¹ prepararam um biossensor bi-enzimático utilizando a lacase e a tirosinase imobilizadas sobre uma superfície de pasta de carbono dopada com grafeno para a determinação de carbaril e outros pesticidas em limão, tangerina e laranja. A pasta de carbono foi preparada misturando pó de grafite, óleo de parafina (70:30 w/w) e, a seguir, a mistura foi dopada com 20% de grafeno (w/w). Esta pasta foi colocada manualmente em um eletrodo de Teflon® com uma cavidade central. O material compósito foi produzido pela mistura de diferentes quantidades de nanopartículas de ouro, quitosana, lacase e tirosinase. O biossensor de LACC–TYR–AuNPs–CS/GPE foi obtido pela imersão do eletrodo de pasta de carbono dopado nesta solução de compósito, com a aplicação de um potencial de -1,5 V vs. Ag/AgCl por 200 s.³¹ Os pesticidas carbamatos selecionados foram quantificados com base nas suas capacidades de inibir a reação enzimática do substrato, 4,75 $\times$ 10⁻⁵ mol L⁻¹ de 4-aminofenol.³¹ A porcentagem de inibição do pico de oxidação do substrato, em -0,07 V vs. Ag/AgCl em tampão Britton-Robinson, pH 5,5, foi linear para uma ampla faixa de concentração de pesticidas nas amostras de frutas, as quais foram obtidas do mercado local, cortadas e homogeneizadas. O método QuEChERS foi utilizado para a remoção dos pesticidas

acrescentados às amostras. O limite de detecção do método foi de $1,98 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o carbaril e as recuperações do pesticida adicionado às amostras de frutas variaram de 94,8 a 96,8%.

Wang *et al.*³² desenvolveram um sensor não enzimático baseado em óxido de grafeno reduzido decorado com óxido de cobalto (II) (CoO), para a determinação simultânea de carbofurano e carbaril em frutas e vegetais. O óxido de grafeno foi sintetizado segundo o método de Hummers.³³ O nanocompósito CoO/rGO foi sintetizado dissolvendo-se 2 mmol L^{-1} de $\text{Co}(\text{Ac})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 2 mmol L^{-1} de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ em 30 mL de água destilada. A seguir, o pó de óxido de grafeno (GO) foi adicionado à solução (quantidade variável) e sonificado por 1 h, seguido da adição de hidrazina (1 mL) e agitação por 6 h em temperatura ambiente. Para a modificação do eletrodo de trabalho (GC) uma quantidade de CoO/rGO foi disperso em uma solução de Nafion® 0,081%; gotejou-se 10 μL desta dispersão na superfície do carbono vítreo e secou-se ao ar.³² As determinações dos pesticidas foram feitas por voltametria de pulso diferencial, após um tempo de acumulação de 300 s em circuito aberto. Os parâmetros da voltametria de pulso diferencial foram: amplitude de 0,05 V; duração do pulso de 0,05 s; tempo de estabilização de 2 s. As amostras das seguintes frutas: uva, laranja, tomate, couve, foram cortadas em pequenos pedaços. Pesou-se 10 g de cada amostra e adicionou-se 50 mL do eletrólito (tampão Britton-Robinson, pH 4,0). As misturas foram colocadas no liquidificador, agitadas vigorosamente por ultrassom e centrifugadas, e o sobrenadante foi coletado para as análises de carbofurano e carbaril, pelo método de adição de padrão. Um pico de oxidação do carbofurano foi observado em 0,42 V vs. Ag/AgCl, o que é 0,29 V mais negativo do que o do carbaril. Isto possibilita a determinação simultânea dos dois pesticidas em uma matriz. Os limites de detecção foram calculados como $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para carbofurano e $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para carbaril ($S/N = 3$).

Noyrod *et al.*³⁴ desenvolveram um sensor eletroquímico em um eletrodo descartável do tipo “screen-printed” feitos no próprio laboratório, segundo a metodologia: (1) o eletrodo de referência foi inicialmente impresso com tinta de prata sobre o PVC utilizado e seco a 55°C por 1 h, (2) a mistura homogeneizada de 1,0 g de tinta de carbono, 0,2 g de pó de grafite e 20 gotas de éter dietileno glicol monobutílico + acetato 2-butoxietílico (1:1 v/v) foi impressa na posição do contra-eletrodo e (3) 10,7 mg de grafeno foi disperso em 25 mL de etanol para formar uma dispersão homogênea sob ultrassom por 2 h, seco em estufa a 100°C por 1 h, moído e misturado com 1,0 g de tinta de carbono, 0,2 g de pó de carbono, 20 gotas da solução descrita acima em um almofariz, para produzir uma mistura homogênea para ser impressa na

posição do eletrodo de trabalho e seco a 55°C por 1 h.³⁴ Este eletrodo foi utilizado para fazer a determinação simultânea de isoproturon e carbendazim em amostras de água, solos e vegetais (tomates e alface) por voltametria de onda quadrada utilizando apenas uma gota do analito, colocada sobre o eletrodo descartável. O sensor apresentou picos bem definidos em 0,78 V e 1,08 V para isoproturon e carbendazim, respectivamente. Após a otimização do método, obteve-se um limite de detecção ($3S_b/S$) de 0,02 e 0,11 mg L⁻¹ para o isoproturon e carbendazim, respectivamente. As amostras estudadas acima foram contaminadas com determinadas quantidades dos pesticidas e a recuperação foi obtida pela voltametria de onda quadrada. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (HPLC-UV). Esta comparação, que visou a validação da técnica eletroquímica, foi feita pela comparação estatística das porcentagens de recuperação das amostras contaminadas.

Shamagsumova *et al.*³⁵ desenvolveram um biossensor com a enzima acetilcolinesterase imobilizada sobre uma superfície modificada com negro de fumo e pillar[5]areno (MP[5]A) não substituído. Gotejou-se sobre o eletrodo de carbono vítreo, 2 µL de uma suspensão de negro de fumo 1 mg mL⁻¹ em dimetilformamida, o qual foi seco por 20 min a 70°C. A seguir, 2 mL de uma solução de MP[5]A 0,1 mol L⁻¹ foi dispersa na área de trabalho e deixou-se secar por 20 min. Para a imobilização da enzima, o eletrodo modificado foi inicialmente tratado com uma mistura de cloreto de N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida(EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), misturando-se 5 µL de EDC 15 mM e 5 µL de NHS 8,7 mM em tampão MES 0,05 M (pH 5,5). Após 30 min, o eletrodo foi lavado com água purificada e gotejou-se 2 mL da solução de AChE (3-50 U/mL) na sua superfície e deixou-se secar.³⁵ O eletrodo preparado foi aplicado na quantificação dos pesticidas malaoxon, metil-paraoxon, carbofurano e aldicarb. A porcentagem de inibição da reação enzimática acetilcolinesterase + acetiltiocolina → tiocolina + acetato foi avaliada por cronoamperometria, a 200 mV vs. Ag/AgCl, após exposição do eletrodo contendo a enzima ao pesticida, seguido de acréscimo do substrato. Este biossensor mostrou limites de detecção tão baixos quanto 2×10^{-11} mol L⁻¹, conforme reportado para o carbofurano. Este dispositivo foi aplicado na quantificação dos pesticidas em amostras de amendoim e de beterraba.

Liu *et al.*³⁶ descreveram o desenvolvimento de um eletrodo modificado com óxido de grafeno e líquido iônico para a determinação de carbaril em amostras de frutas. A superfície do carbono vítreo foi modificada com uma solução de óxido de grafeno-líquido iônico (1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([Bmim]PF₆), pela dispersão de 3,0 mg de óxido de

grafeno em 4,0 mL de [Bmim]PF₆ por agitação ultrassônica por 1 h. A suspensão foi, então, centrifugada a 7000 rpm por 30 min. O compósito GO-IL foi coletado com a remoção do sobrenadante. Para a modificação do eletrodo, 2,0 mg de GO-IL foi disperso em 2,0 mL de dimetilformamida (DMF). A seguir, gotejou-se 10 µL da suspensão na superfície do eletrodo e secou-se ao ar para preparar o GO-IL/GCE. As amostras de frutas foram adquiridas no mercado local. Destas frutas, 10,0 g de uvas ou tomate foram cortados e transferidos para um frasco contendo 20,0 mL de etanol. Após agitação vigorosa e ultrassonicação por 40 min, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante coletado para a análise.³⁶ As análises foram feitas por voltametria de onda quadrada, com os parâmetros otimizados: intervalo de potenciais de 0,3 a 1,0 V, com um incremento de 4 mV, amplitude de 25 mV e frequência de 15 Hz. O eletrodo modificado apresentou um pico de oxidação do carbaril em 0,64 V *vs.* SCE. A corrente de pico de oxidação aumentou linearmente com a concentração de carbaril no eletrólito, na faixa de 0,10-12,0 mmolL⁻¹ com um limite de detecção (IUPAC) de 0,02 mmolL⁻¹. Recuperações acima de 90% do pesticida adicionado às amostras mostram a adequação da metodologia.

Finalmente, Razzino *et al.*²³ propuseram uma metodologia para a determinação sensível de carbendazim em suco de laranja utilizando um eletrodo modificado com um material híbrido. Este material inorgânico-orgânico (sílica mesoporosa contendo nanotubos de carbono, SiO₂/MWCNT) foi sintetizado com a seguinte metodologia.²³ Inicialmente uma solução de tetraetilortosilicato (TEOS, 98%) foi preparada pela dissolução de 0,045 mL em um volume igual de etanol sob agitação por 20 min. A seguir, adicionou-se 4 mL de H₂O, mantendo a proporção de Si/H₂O de 1:4 e 0,9 g de MWCNT foi adicionado. A suspensão foi ultrassonicada por 20 min. Na mistura resultante, adicionou-se 0,3 mL de HF, sob agitação ultrassônica. O gel obtido foi armazenado por 7 dias em temperatura ambiente. A seguir o xerogel foi moído e lavado com etanol por 2 h e submetido a um tratamento térmico a 323 K para evaporar os resíduos de solventes. O material resultante foi designado como SiO₂/MWCNT. Um filme fino deste material foi preparado pela mistura de 25 mg de SiO₂/MWCNT, 5 mL de H₂O e 10 µL de uma solução 5% de Nafion®. Esta mistura foi gotejada na superfície do eletrodo de carbono vítreo e seco em temperatura ambiente. O eletrodo foi imerso em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0 por 1 h para hidratar o filme. Este eletrodo foi designado como SiO₂/MWCNT/GCE. Este eletrodo, imerso em um eletrólito de tampão fosfato, pH 8,0 contendo 20 µmol L⁻¹ de carbendazim (CBZ) foi explorado por voltametria cíclica, originando um pico de oxidação em 0,688 V *vs.* Ag/AgCl. A voltametria

de onda quadrada foi utilizada, com os parâmetros otimizados, para a obtenção de uma curva analítica e observou-se que a corrente de pico foi diretamente proporcional à concentração de pesticida em solução. Os limites de detecção e quantificação foram calculados como sendo 0,056 e 0,187 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (S/N = 3, IUPAC). Este sensor foi aplicado na determinação de CBZ em suco de laranja diluído (5,0% v/v em tampão fosfato pH 8,0). Experimentos de recuperação mostraram resultados superiores a 94% para todas as determinações.

Os exemplos discutidos acima mostraram que as técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, cronoamperometria e cronopotenciometria) utilizando materiais nanoestruturados avançados, possibilitam a quantificação de diferentes pesticidas em matrizes de alimentos. Estas técnicas são muito sensíveis, permitindo alcançar limites de detecção suficientemente baixos para serem utilizados na verificação da aplicação da legislação de pesticidas em alimentos, como o programa PARA da ANVISA, por exemplo. A Tabela 3 lista os limites de detecção obtidos a partir das metodologias eletroquímicas discutidas nesta revisão da literatura.

Tabela 3 - Resumo dos valores de limites de detecção obtidos a partir das metodologias eletroquímicas discutidas na revisão da literatura

Sensores e Biossensores	Matriz	Limites de Detecção (mol L ⁻¹)	Ref.
<i>Polímero molecularmente impresso (MIP)</i>	Paraoxon em couve	$1,00 \times 10^{-9}$	24
<i>Nanocompósitos e enzima metil-parationhidrolase</i>	Metil-paration em alho	$1,03 \times 10^{-9}$	25
<i>Nanopartículas de carbono, nanopartículas de argila tipo halloysite e pasta de carbono</i>	Etil e metil-paration em laranja e maçã	$4,70 \times 10^{-10}$ e $3,67 \times 10^{-10}$	26
<i>Acetilcolinesterase em “core-shell” de nanotubos de carbono recoberto com polianilina</i>	Carbaril e metomil em maçã, brócolis e couve	$1,40 \times 10^{-6}$ e $9,50 \times 10^{-7}$	22
<i>Acetilcolinesterase imobilizada em sílica porosa</i>	Metil-paration e monocrotofos em laranja e tomate	$1,38 \times 10^{-10}$ e $6,28 \times 10^{-10}$	27
<i>Polímero molecularmente impresso (MIP) de polímero-líquido iônico-grafeno</i>	Metil-paration em couve e maçã	$6,00 \times 10^{-9}$	29
<i>Nanotubos de carbono funcionalizados com ácido carboxílico e β-ciclodextrina</i>	Metil-paration em cebola, alface e espinafre	$1,38 \times 10^{-9}$	30
<i>Biossensor bi-enzimático de lacase e tirosinase imobilizadas sobre pasta de carbono dopada com grafeno</i>	Carbaril em limão, tangerina e laranja	$1,98 \times 10^{-8}$	31
<i>Óxido de grafeno decorado com CoO</i>	Carbofurano e carbaril em uva, laranja, couve	$1,9 \times 10^{-8}$ e $3,73 \times 10^{-8}$	32
<i>Eletrodo descartável do tipo “screen-printed”</i>	Isoproturon e carbendazim em tomate e alface	$9,69 \times 10^{-8}$ e $5,75 \times 10^{-7}$	34

Continuação na próxima página →

Sensores e Biossensores	Matriz	Limites de Detecção (mol L ⁻¹)	Ref.
<i>Acetilcolinesterase imobilizada sobre negro de fumo e pillar[5]areno</i>	Carbofurano em amendoim e beterraba	$2,00 \times 10^{-11}$	35
<i>Óxido de grafeno e líquido iônico</i>	Carbaril em uva e tomate	$2,00 \times 10^{-5}$	36
<i>Material híbrido inorgânico-orgânico de sílica mesoporosa contendo nanotubos de carbono</i>	Carbendazim em suco de laranja	$5,60 \times 10^{-8}$	23

Fonte: Autoria própria

No entanto, para este tipo de aplicação, torna-se necessário validar as técnicas eletroquímicas, ou seja, testar diversos parâmetros estatísticos, principalmente a sua exatidão em relação a uma técnica analítica padrão, já aceita para este tipo de análises (no caso a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizada pela ANVISA no programa PARA).

Assim, seria muito importante se utilizar de uma ferramenta correta que possibilite fazer esta validação de maneira adequada e que permita a utilização de técnicas eletroquímicas para as análises de controle de qualidade de alimentos. Isto poderia simplificar a fiscalização de produtos servidos ao consumidor. Por exemplo, Noyrod *et. al.* ³⁴ propõem uma análise com eletrodos descartáveis modificados utilizando uma gota de eletrólito colocada sobre a superfície do eletrodo descartável. Este tipo de sistema possibilita a quantificação *in situ*, dentro de supermercados e varejões e, assim, a aplicação correta das diretrizes da ANVISA relativa aos limites máximos de resíduos em alimentos.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de monitoramento dos níveis de pesticidas presentes em alimentos, o objetivo deste trabalho é a quantificação do pesticida carbendazim em amostras de suco de laranja, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Este objetivo geral pode ser decomposto nos seguintes objetivos parciais:

- (a) Modificar e caracterizar a superfície de carbono vítreo modificada com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, devidamente funcionalizados e decorados com nanopartículas de ouro. Testar a repetibilidade e a reprodutibilidade na preparação dos eletrodos modificados.
- (b) Utilizar os eletrodos modificados na quantificação do pesticida carbendazim. Obter uma curva analítica e seus respectivos limites de detecção e de quantificação.
- (c) Aplicar a metodologia eletroquímica desenvolvida na quantificação do pesticida carbendazim em amostras de suco de laranja.
- (d) Empregar um tratamento estatístico ³⁷ para a determinação de parâmetros como a reprodutibilidade e a repetibilidade, o limite de detecção e quantificação e os erros inerentes à metodologia eletroanalítica proposta, determinando se os resultados obtidos são, ou não, adequados para análise de pesticidas em amostras reais.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Soluções

Para a preparação do tampão fosfato com concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foram utilizados fosfato de potássio monobásico (Sigma) e fosfato de sódio dibásico (Sigma). Para o ajuste de pH foram utilizados ácido fosfórico (Mallinckrodt) e hidróxido de sódio (Mallinckrodt).

Solução sulfonítrica ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$, 3:1, v:v, ambos concentrados) (Synth) foi utilizada para a etapa de purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) (Sigma).

O protocolo de limpeza consistia no tratamento dos materiais em duas soluções. Os materiais de vidro e de politetrafluoretileno (PTFE) foram imersos em solução sulfonítrica (3:1 de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$, ambos concentrados) por 10 minutos, enquanto o contra-eletrodo, eletrodo de referência e a barra magnética de agitação foram imersos em solução “piranha” (1:3:7 de $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}$) (Synth) durante 5 minutos. Após a imersão, todos os materiais foram enxaguados com água purificada em abundância.

Para a limpeza dos eletrodos de carbono vítreo (área: 3 mm), foram utilizados etanol (Synth), alumina $0,3 \mu\text{m}$ e água purificada. Na etapa de limpeza eletroquímica, utilizou-se H_2SO_4 (Tedia, supra-puro). A resposta voltamétrica obtida em uma solução de cloreto de hexaminrutênio (II) e (III) (Aldrich) em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma), permitiu analisar a superfície do eletrodo.

Para o preparo da suspensão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs), com concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizou-se N, N-dimetil-formamida (DMF) (Mallinckrodt).

A solução estoque de ácido tetraclooroáurico (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich) $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 1 g de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de água purificada.

Os pesticidas utilizados (carbaril, etil-paration, malation e carbendazim) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções estoque de carbaril, etil-paration e malation foram preparadas em etanol (Synth). A solução estoque de carbendazim $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,0382 g de carbendazim em 25 mL de DMF.

A amostra de suco de laranja foi adquirida do comércio local e diluída em tampão fosfato.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, sistema de purificação Barnstead™Nanopure™ (ThermoScientific).

3.2 Instrumentação Geral

O ultrassom utilizado para o preparo de soluções foi adquirido da Thornton - modelo CHUBBY.

Para ajustes e medidas de pH utilizou-se um pH-metro Qualxtron - modelo 8010.

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

Para a secagem dos nanotubos de carbono foi utilizado um forno da Qualxtron. Para a etapa de filtração dos nanotubos de carbono utilizou-se um sistema de filtração à vácuo, utilizando filtros Millipore®.

Os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos com espectrofotômetro da marca Bomem, modelo MB-102, na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos – SP. Para preparar as pastilhas de KBr, pequenas quantidades de MWCNT foram maceradas no almofariz com 100 mg de KBr. Vale mencionar que as pastilhas não podem ficar muito escuras para que a leitura da amostra no espectrofotômetro não seja prejudicada. A linha de base foi corrigida pelo sinal obtido apenas com o uso de pastilhas de KBr.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram feitas em um microscópio eletrônico de transmissão da marca FEI modelo Tecnai G2 F20, no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos – SP.

As medidas espectrofotométricas na região do UV-vis foram feitas em um espectrofotômetro JASCO, modelo V-630. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

3.3 Materiais e instrumentos para medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT30/Autolab® utilizando o *software* GPES (General Purpose Electrochemical System).

Para as medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula eletroquímica de vidro borossilicato com compartimento único de 25 mL com tampa de PTFE contendo orifícios de encaixe para três eletrodos: (1) um contra-eletródo de placa de platina; (2) um eletródo de referência de Ag/AgCl (KCl saturado) e (3) eletródo de trabalho, de carbono vítreo. A célula eletroquímica está representada na Figura 1. O eletródo modificado foi preparado de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Figura 1 - Representação esquemática da célula eletroquímica

1-contrá-eletródo; 2-eletródo de referência; 3-eletródo de trabalho. Fonte: Autoria própria

3.4 Procedimento Experimental

3.4.1 Purificação / funcionalização dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono foram funcionalizados pelo procedimento descrito a seguir.

Adicionou-se 50,0 mg de MWCNT (diâmetro 110-170 nm) em um béquer contendo uma mistura de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido nítrico (HNO_3) concentrados, na proporção 3:1. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética, em temperatura ambiente, por 9 h e em seguida, submetida ao processo de filtração à vácuo utilizando filtro Millipore® e lavagem com água purificada, até que o pH da solução ficasse neutro. O produto final foi seco em estufa por 12 h, a 60° C.

3.4.2 Modificação dos nanotubos de carbono com nanopartículas de ouro

A metodologia de síntese para o ancoramento de nanopartículas de ouro sobre os nanotubos de carbono submetidos ao processo de funcionalização é descrita a seguir.

O procedimento de síntese de nanopartículas de ouro descrita por Zhang et al.³⁸ e otimizado por Ruiz³⁹ em nosso grupo de pesquisa, foi utilizado. Duas sínteses foram feitas, variando a quantidade de MWCNT: síntese 1 (3 mg de MWCNT funcionalizados); síntese 2 (5 mg de MWCNT funcionalizados). Em uma etapa de pré-dispersão, 3 mg ou 5 mg de MWCNT funcionalizados foram misturados com 4 mL de solução aquosa de citrato de sódio (1% m/m) e submetido a tratamento ultrassônico, com amplitude 100%, durante 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi colocada em um balão de três bocas e completou-se com 96 mL de água purificada. Utilizou-se um sistema de refluxo, no qual a suspensão foi aquecida lentamente, sob agitação, até entrar em ebulição. Ao entrar em ebulição, adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1% m/m) e o sistema foi mantido sob agitação e aquecimento por mais 5 minutos. O aquecimento foi cessado e manteve-se a agitação até a solução atingir a temperatura ambiente. No decorrer da reação, observou-se a mudança de coloração da solução, de incolor com partículas pretas em suspensão, para vermelho com partículas pretas em suspensão.

3.4.3 Limpeza e pré-tratamento dos eletrodos de carbono vítreo

Os eletrodos de carbono vítreo foram previamente limpos com etanol, polidos com alumina 0,3 μm e depois submetidos à agitação ultrassônica por 3 minutos em água purificada. Posteriormente, foi feita a etapa de limpeza eletroquímica, onde o eletrodo de carbono vítreo foi polarizado em -2 V por 30 s em solução de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Após tal procedimento, foram feitos 20 ciclos de voltametria cíclica entre 0 e 1 V a 1 V s^{-1} , em uma solução de H_2SO_4 .

Após a limpeza eletroquímica, os eletrodos foram submetidos a uma etapa de pré-tratamento, usualmente utilizado em nosso grupo de pesquisa,⁴⁰ no qual o eletrodo foi submetido a 100 ciclos de voltametria cíclica utilizando H_2SO_4 como eletrólito suporte, a uma velocidade de 1,0 V s^{-1} . Após a lavagem do conjunto eletroquímico e troca do eletrólito suporte, o eletrodo foi submetido a 50 ciclos de voltametria cíclica, a uma velocidade de 0,5 V s^{-1} . O intervalo de potencial utilizado foi de 0 a 1,4 V.

3.4.4 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro

Após a limpeza eletroquímica, o eletrodo foi seco com jato de nitrogênio, gotejou-se 10 μL de uma suspensão de MWCNT em DMF com concentração 0,5 mg mL^{-1} , e deixou-se secar a temperatura ambiente. Após seco, gotejou-se mais 10 μL da suspensão de MWCNT e novamente deixou-se secar a temperatura ambiente.

O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi avaliado por medidas de voltametria cíclica, em solução de cloreto de hexaminrutênio (II) e (III) na concentração $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 0,100 V s^{-1} .

3.4.5 Caracterização morfológica e eletroquímica do sensor

A superfície do sensor foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e espectroscopia na região do UV-Vis, para se detectar e quantificar (qualitativamente) a quantidade e o tamanho médio das nanopartículas formadas. A voltametria cíclica em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} foi utilizada para mostrar o perfil voltamétrico relativo ao ouro superficial, e a voltametria cíclica em meio de cloreto de hexaminrutênio (II) e (III) foi utilizada para analisar o efeito da adição de nanopartículas aos nanotubos de carbono.

3.4.6 Comportamento eletroquímico do carbendazim sobre a superfície do sensor

O estudo do comportamento eletroquímico do pesticida carbendazim foi feito utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de voltametria de onda quadrada. Estudos para a escolha do eletrólito suporte e o pH deste também foram feitos, e parâmetros como frequência, amplitude e salto de potencial foram otimizados na técnica de voltametria de onda quadrada.

3.5 Procedimento Analítico

3.5.1 Preparo das Amostras na Análise Eletroquímica

Para as determinações em suco de laranja, no qual não foi detectado a presença de carbendazim, foi seguido o seguinte protocolo: inicialmente, o suco de laranja (adquirido no comércio local) foi diluído em tampão fosfato (numa razão em volume de 1:9 de

suco:tampão). A seguir, determinadas quantidades do carbendazim foram acrescentadas à célula eletroquímica contendo suco de laranja dissolvido em tampão fosfato.

3.5.2 Análise Voltamétrica

A fim de obter o melhor desempenho para os experimentos de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, Square Wave Voltammetry) com o eletrodo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, os parâmetros voltamétricos (frequência, amplitude e degrau de potencial) foram otimizados. Como as solubilidades dos pesticidas estudados em água são baixas, as soluções estoque com concentração de pesticidas de $8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em dimetilformamida e, posteriormente, acrescentadas à solução tampão fosfato da célula eletroquímica em alíquotas com volumes apropriados, com o auxílio de uma micropipeta. Usando a técnica de voltametria de onda quadrada, com os parâmetros voltamétricos otimizados, a resposta de $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dos pesticidas em tampão fosfato pH 7,0 foram obtidas para o eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e nanotubos de carbono modificados com nanopartículas de ouro (MWCNT-AuNPs).

A curva analítica do pesticida carbendazim em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi obtida por SWV usando os parâmetros otimizados em uma faixa de concentração de carbendazim de 0,2 a $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Pela correlação linear obtida, os limites de detecção e quantificação foram calculados, de acordo com um procedimento estatístico discutido por Miller e Miller.³⁷

3.6 Análise Estatística

3.6.1 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O emprego de técnicas instrumentais para a quantificação de analitos requer a construção e utilização de curvas analíticas, ou seja, relações entre o sinal analítico e a concentração do analito, em condições bem estabelecidas. Esta relação direta, em muitos sistemas estudados, é linear. Para se estimar quão bem os pontos experimentais se ajustam em uma linha reta, calcula-se o coeficiente de correlação produto-momento, r , dado por:³⁷

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

onde $(\bar{x}, \bar{y})$ é a posição da curva analítica conhecida como “centróide”, ou seja, a média dos valores de x (concentrações dos padrões) e dos valores de y (resposta do instrumento). O coeficiente de correlação pode variar no intervalo entre $-1 \leq r \leq +1$. O valor de $r = +1$ descreve uma correlação perfeita, isto é, todos os pontos experimentais se localizam sobre a linha reta. A equação algébrica que satisfaz um gráfico linear é dada por:

$$y = a + bx \quad (2)$$

sendo b a tangente da reta e a o intercepto no eixo y .

Assumindo que existe uma correlação linear entre o sinal analítico (y) e a concentração (x), deve ser calculada a melhor linha reta que passa pelos pontos da curva analítica. Além disso, os erros experimentais de cada ponto da curva devem ser considerados. Assume-se que os erros estão preferencialmente na direção y e que as concentrações padrão (valores de x) estão relativamente livres de erros. Esta condição dá origem às barras de erros paralelas ao eixo y , nas curvas analíticas. Desta forma, procura-se uma reta que minimize os desvios na direção y entre os dados experimentais e a reta calculada. Como alguns desses desvios, conhecidos tecnicamente como resíduos y , serão positivos e outros negativos, é conveniente tentar minimizar a soma dos quadrados dos resíduos. Isso explica o uso do termo “método dos mínimos quadrados” para esse procedimento.

A tangente b e o intercepto a calculados com base nesse princípio são dados por: ³⁷

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (4)$$

A linha calculada desta maneira é conhecida como curva de regressão de y em x , isso é, a curva indicando como y varia quando x é colocado nos valores escolhidos.

Com esta curva analítica, é possível encontrar o limite de detecção (*LD*) e o limite de quantificação (*LQ*) da metodologia. O *LD* é definido como a menor concentração em que um analito dá um sinal diferente daquele do branco, com, por exemplo, 95% de confiança.

O *LD* pode ser representado pela equação (6), onde y_B e s_B são a resposta analítica do branco (eletrólito contendo todos os componentes do analito, exceto a espécie que está sendo detectada) e o desvio padrão do branco, respectivamente.³⁷ Os valores de y_B e s_B podem ser calculados adequadamente pela regressão linear da curva analítica, sendo y_B o seu coeficiente linear (intercepto do eixo y) e s_B o erro (desvio padrão) deste intercepto. Este último parâmetro é calculado como ($S_{y/x}$):³⁷

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

onde, $S_{y/x}$ é o desvio padrão estimado de cada ponto do gráfico, incluindo o ponto do “branco”, com uma variação de erros normalmente distribuída apenas na direção y . Nesta equação, $\hat{y}$ são os valores do y (sinal analítico) calculados pela reta de regressão linear.

Assim, os limites de detecção e quantificação podem ser calculados como:³⁷

$$LD = y_B + 3s_B \quad (6)$$

$$LQ = y_B + 10s_B \quad (7)$$

3.6.2 Comparação de valores de média. Teste t de Student

Neste trabalho, amostras de suco de laranja foram contaminadas artificialmente com quantidades conhecidas de pesticidas. A seguir, estas amostras contaminadas foram tratadas como desconhecidas e a quantidade de pesticida foi calculada por meio da voltametria de onda quadrada, utilizando uma curva analítica obtida para a solução tampão fosfato. Esta quantia deve ser diferente daquela inicialmente acrescentada, devido aos erros aleatórios das medidas e, também, devido à inadequação da curva analítica para estas determinações. Assim, o valor encontrado será comparado com o valor conhecido por meio de um teste estatístico, desenvolvido exatamente para comparar valores de médias. Neste caso o “teste t ”. Para se

aplicar este teste, postula-se uma hipótese, conhecida como hipótese nula, que garante que os dois valores sempre são iguais, se não contarmos os erros aleatórios. Assim, se a hipótese nula for verdadeira, a quantia de pesticida determinada pela voltametria de onda quadrada será igual à adicionada nas amostras. Se a hipótese nula for falsa, esta afirmação não pode mais ser sustentada e existem erros maiores que os aleatórios, ou seja, o método analítico não foi capaz de avaliar corretamente a quantidade de pesticida na amostra.

Para testar a veracidade da hipótese nula, calcula-se um valor de t , o parâmetro de Student. Este valor calculado é comparado com valores tabelados para vários graus de confiança (normalmente trabalha-se com 95% de confiança no resultado obtido). Se o valor encontrado for igual ou menor ao tabelado, a hipótese nula é verdadeira e os erros aleatórios podem explicar as possíveis diferenças observadas. Se o valor encontrado for superior, os erros aleatórios não podem mais explicar as diferenças e o método analítico não é adequado. Para se calcular o valor de t , emprega-se a equação:³⁷

$$t = (\bar{x} - \mu)\sqrt{n}/s \quad (8)$$

onde $\bar{x}$ é a média de n medidas, μ é o valor real e s o desvio padrão de n medidas da amostra. A tabela dos valores de t , a ser utilizada, está apresentada no Anexo I.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, os resultados obtidos para a determinação de carbendazim em suco de laranja por métodos eletroquímicos serão apresentados e discutidos. A determinação eletroquímica de carbendazim em suco de laranja será feita utilizando sensores construídos com nanotubos de carbono e modificados com nanopartículas de ouro. Como técnica analítica será empregada a voltametria de onda quadrada, com os parâmetros voltamétricos devidamente otimizados. Um procedimento estatístico de análise dos dados obtidos será utilizado.

4.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono contêm impurezas tais como carbono amorfo, fulerenos e partículas do metal catalisador provenientes da sua síntese, independentemente da rota utilizada para sua síntese.⁴¹ Os métodos de purificação podem ser divididos em três categorias: químicos, físicos e uma combinação de ambos. Neste estudo, foi utilizado o método de purificação química, o qual se baseia no conceito de oxidação seletiva, em que as impurezas são oxidadas mais rapidamente que os nanotubos, e as impurezas metálicas são dissolvidas por ácidos.⁴²

Além disso, com o tratamento ácido, é possível modificar as paredes externas dos nanotubos de carbono, adicionando grupos funcionais como hidroxilas e carboxilas na cadeia carbônica e, assim, gerar “portas” de saída para os elétrons, facilitando sua transferência para o analito em solução.

Sendo assim, o procedimento utilizado teve como objetivo eliminar as impurezas e modificar a superfície dos nanotubos, principalmente nas paredes laterais, aumentando a reatividade e a dispersão dos nanotubos em solventes aquosos e orgânicos. Além disso, os nanotubos foram “quebrados” em fragmentos menores dotados de grupos funcionais adequados para a transferência de elétrons, tais como ácidos carboxílicos, o que facilita e aumenta sua dispersão.⁴² O sucesso deste procedimento pode ser observado na Figura 2, abaixo, que apresenta os espectros de absorção no infravermelho (FTIR) para amostras de nanotubos de carbono antes e após o procedimento de funcionalização.

Figura 2 - Espectros de FTIR na região do infravermelho para MWCNT antes (—) e após (—) tratamento em meio ácido

Fonte: Autoria própria

Os espectros de FTIR obtidos para amostras de nanotubos de carbono antes (linha vermelha) e após (linha preta) o tratamento em meio ácido, apresentam similaridades em algumas regiões. Em ambos, observa-se um pico na região de 3400 cm^{-1} associado com grupos hidroxila, que estão sempre presentes em amostras de nanotubos de carbono. A região próxima de 2900 cm^{-1} indica um estiramento da ligação dos grupos $\text{CH}_2\text{-CH}_3$. O efeito do tratamento ácido, quebrando as ligações sp^2 e formando ligações sp^3 , produz o aumento da intensidade desta banda para os MWCNT tratados.^{43,44}

Também é observado um pico de absorção na região de 1630 cm^{-1} em ambas as amostras (tratada ou não), que pode ser atribuído à vibração de grupos carboxílicos. A funcionalização introduziu alguns picos e aumentou a intensidade de outros, em relação ao espectro obtido para os nanotubos não funcionalizados. O pico discreto, que aparece em 1385 cm^{-1} , está possivelmente associado com a deformação da ligação O-H de grupos ácido carboxílicos, enquanto que o pico em 1100 cm^{-1} pode estar associado ao estiramento da ligação C-O.⁴⁵ O pequeno pico que aparece em 700 cm^{-1} pode estar associado com o grupo éter ou alguns grupos aromáticos substituídos, presentes após o tratamento.⁴⁵

O pico de absorção na região de 2250 cm^{-1} , observado no espectro para amostra de nanotubos antes do tratamento ácido, pode ser atribuída ao $-\text{CO}_2$ e provavelmente ocorreu devido ao contato da amostra com o ar, durante o procedimento de obtenção dos espectros de FTIR.

4.2 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

Após a modificação descrita no item 3.4.4, a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificada com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, foi caracterizada. Inicialmente, avaliou-se o efeito da quantidade de suspensão de nanotubos de carbono ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$), aplicada na superfície do carbono vítreo. Para isto, imagens de microscopia óptica do eletrodo de carbono vítreo sem modificação, modificado com 1 gota ($10\text{ }\mu\text{L}$) da suspensão, e modificado com 2 gotas ($10\text{ }\mu\text{L}$ cada, com a superfície do eletrodo seca antes de aplicar a segunda gota) da suspensão foram obtidas e estão apresentadas na Figura 3.

Como pode ser observado nas imagens de microscopia óptica, o eletrodo modificado com 2 gotas ($10\text{ }\mu\text{L}$ cada) mostrou um recobrimento mais eficiente da superfície. Observa-se, na imagem (E), que as regiões mais claras observadas na imagem (C), correspondentes à superfície não-recoberta do eletrodo, foram preenchidas em grande parte, com a aplicação da segunda gota da suspensão. Isto pode ser observado com maior detalhe nas imagens (D) e (F), que apresentam uma ampliação do recobrimento do eletrodo com 1 e 2 gotas da suspensão, respectivamente. Portanto, selecionou-se o eletrodo modificado com 2 gotas da suspensão de nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro para ser utilizado nos experimentos eletroquímicos posteriores.

Figura 3 - Imagens de microscopia óptica do eletrodo de carbono vítreo (A, B); eletrodo de carbono vítreo modificado com 1 gota da suspensão (C, D); eletrodo de carbono vítreo modificado com 2 gotas de suspensão (E, F)

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

4.3 Caracterização dos nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro

Os nanotubos de carbono funcionalizados e decorados com nanopartículas de ouro a partir do procedimento descrito no item 3.4.2, foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens obtidas para a síntese 1 (3 mg de nanotubos de carbono funcionalizados) e síntese 2 (5 mg de nanotubos de carbono funcionalizados) estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Imagens de MET dos nanotubos de carbono funcionalizados (A) e nanotubos de carbono modificados com nanopartículas de ouro, obtidas a partir da síntese 1 (B) e síntese 2 (C)

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Nas figuras (B) e (C) observa-se o ancoramento das nanopartículas de ouro sobre os nanotubos de carbono. Nota-se que na síntese 1 (Figura B), houve uma distribuição mais homogênea das nanopartículas em toda a extensão dos nanotubos de carbono, quando comparado com a síntese 2 (Figura C). Além disso, a síntese 1 apresenta nanopartículas com tamanho médio de 20 nm, enquanto na síntese 2 podem ser observadas nanopartículas maiores. Portanto, as nanopartículas obtidas a partir da síntese 1 foram utilizadas para os estudos posteriores.

Segundo Haiss *et al.*,⁴⁶ as propriedades óticas das nanopartículas de ouro são dependentes do seu tamanho, sendo que partículas com tamanho aproximado de 20 nm apresentam absorção no UV-vis no comprimento de onda de 525 nm, aproximadamente, com o deslocamento para valores maiores de comprimento de onda para partículas que apresentam maior tamanho. Foi obtido um espectro de absorção na região do UV-vis, o qual Como pode ser observado na Figura 5, as sínteses 1 e 2 apresentam absorção em aproximadamente 525nm, coerente com o valor encontrado na literatura. Assim, pode-se assumir que as nanopartículas de ouro depositadas sobre os nanotubos de carbono apresentam um tamanho médio de aproximadamente 20 nm.

Figura 5 - Espectro na região do UV-vis do sobrenadante da síntese 1

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Neste método de síntese para ancoramento das nanopartículas de ouro sobre os nanotubos de carbono utilizando citrato como agente redutor, Zhang *et al.*³⁸ sugerem que na etapa de pré-dispersão, os nanotubos de carbono são recobertos por uma camada de citrato, tornando-os um substrato conveniente para a nucleação e crescimento das nanopartículas de ouro. Ao se adicionar HAuCl_4 ao sistema reacional, o íon Au^{3+} é reduzido a Au^0 diretamente na superfície dos nanotubos, atuando como pontos de crescimento para outros átomos de ouro. Dessa forma, as nanopartículas de ouro são ancoradas sobre os nanotubos de carbono.

4.4 Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro foi analisado por voltametria cíclica em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, no intervalo de 0 a $1,4 \text{ V}$, a uma velocidade de 100 mV s^{-1} .

O voltamograma cíclico de estado estacionário obtido é apresentado na Figura 6 (linha preta) e mostra um perfil similar ao do eletrodo de ouro, com um processo de oxidação pouco definido em $1,2 \text{ V}$ e um processo de redução bem definido em $0,86 \text{ V}$.

Com o objetivo de se obter uma superfície com maior reprodutibilidade e “ativar” a superfície do eletrodo, os eletrodos de carbono vítreo modificados foram submetidos a uma etapa de pré-tratamento. Para isto, o eletrodo foi submetido a 100 ciclos voltamétricos, entre 0 e $1,4 \text{ V}$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O efeito deste pré-tratamento pode ser visualizado na Figura 6 (linha vermelha).

Os voltamogramas apresentados na Figura 6 mostram que a ciclagem de potenciais na velocidade indicada, desbloqueou a superfície das nanopartículas de ouro de diferentes espécies adsorvidas, provavelmente durante a redução dos íons Au^{3+} . Este desbloqueio ficou evidenciado na melhor definição dos picos de oxidação na região do óxido de ouro ($E > 1,0 \text{ V}$). Por outro lado, ainda se observa uma corrente capacitiva considerável nos dois voltamogramas, devido à presença dos nanotubos de carbono. Desta forma, o eletrodo de carbono vítreo foi convenientemente modificado com os nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro.

Figura 6 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs -AuNPs, antes (—) e após (—) pré-tratamento eletroquímico em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de 0 a $1,4 \text{ V}$. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Potencial inicial $0,0 \text{ V}$

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Na continuação da avaliação do comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com nanotubos de carbono funcionalizados (MWCNT) e modificado com nanotubos de carbono funcionalizados e nanopartículas de ouro (MWCNT - AuNPs), foram feitas voltametrias cíclicas em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, variando o potencial de $-0,5$ a $0,2 \text{ V}$, a uma velocidade de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de carbono vítreo sem modificação (—), modificado com MWCNT (—) e MWCNT - AuNPs (—) na presença de $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Os valores dos parâmetros voltamétricos relativos aos processos de redução e oxidação do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros voltamétricos do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ para os diferentes eletrodos de trabalho (CV – carbono vítreo, CV/MWCNT, CV/MWCNT – AuNPs)

Eletrodo	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_p	I_{pc}	I_{pa}	I_{pc}/I_{pa}
CV	-0,111	-0,194	0,083	58,63	45,77	1,28
CV / MWCNT	-0,087	-0,166	0,079	52,35	43,46	1,20
CV / MWCNT - AuNPs	-0,086	-0,167	0,081	52,01	43,39	1,19

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Como se pode observar, o efeito de modificação da superfície do eletrodo não é dramático, pois o processo eletroquímico em questão, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$, ocorre em solução e não depende da superfície do eletrodo. Entretanto, pode-se observar que a presença de nanotubos de carbono reduz a ΔE_p do processo, tornando-o mais reversível.

4.5 Comportamento eletroquímico dos pesticidas sobre os eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MWCNT e com MWCNT-AuNPs foi estudado por voltametria de onda quadrada em tampão fosfato pH 7, na presença de 4×10^{-4} mol L⁻¹ dos pesticidas carbaril, etil-paration, malation e carbendazim. Todos os pesticidas analisados, exceto o carbendazim, não forneceram qualquer sinal analítico útil, nas superfícies modificadas em estudo. Vários procedimentos de ativação e limpeza eletroquímica das superfícies foram testados, porém sem resultados positivos. Desta forma, somente o pesticida carbendazim foi utilizado para os estudos posteriores.

4.6 Comportamento eletroquímico do pesticida carbendazim sobre os eletrodos modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

Neste item discutiremos o comportamento eletroquímico (voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada) do pesticida carbendazim sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (MWCNT) ou decorados com nanopartículas de ouro (MWCNT-AuNPs). Esta discussão será dividida em dois subitens distintos.

4.6.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é a técnica eletroquímica mais frequentemente utilizada para se obter informações qualitativas sobre reações eletródicas, tais como a cinética das reações de transferência eletrônica, a existência de reações químicas acopladas ou processos de adsorção.

47

O comportamento eletroquímico do carbendazim sobre os eletrodos modificados foi estudado por voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, na ausência e na presença de 4×10^{-4} mol L⁻¹ de carbendazim. Os voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mVs⁻¹ estão apresentados juntamente com aqueles referentes ao branco, na Figura 8. Nesta Figura é possível observar um pico de oxidação bem definido, que para o MWCNT (Fig. 8(a)) ocorre em aproximadamente 0,85 V e para o MWCNT –AuNPs (Fig. 8(b)) em aproximadamente 0,76 V.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT (a) e com MWCNT - AuNPs (b) em tampão fosfato pH 7, na ausência (—) e presença (—) de 4×10^{-4} mol L⁻¹ de carbendazim. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹. Ei = 0,0 V

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Os voltamogramas apresentados na Figura 8(a), relativos ao eletrodo modificado com MWCNT, sugerem que o mecanismo eletroquímico da reação de oxidação do carbendazim pode ser quase-reversível, ou ocorre uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química (mecanismo EC).⁴⁷

Já na Figura 8(b), os voltamogramas apresentados mostram a presença de um pequeno pico de redução, na varredura reversa, o que pode sugerir um mecanismo de transferência

eletrônica reversível, seguido por uma reação química que transforma o produto do processo eletródico (mecanismo EC).

Como o comportamento eletroquímico do carbendazim sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro apresentou uma resposta com detalhes mais adequados que aquele sem as nanopartículas (potencial de pico um pouco menos positivo e caráter mais reversível no perfil voltamétrico), decidiu-se optar por este eletrodo para as medidas eletroanalíticas. Assim, os resultados seguintes foram obtidos utilizando-se unicamente o eletrodo modificado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (MWCNT – AuNPs).

Conhecendo-se o perfil voltamétrico do carbendazim, foram feitas varreduras em diferentes velocidades, para se obter maiores informações sobre o tipo de mecanismo eletroquímico envolvido. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs em tampão fosfato pH 7, na presença de 4×10^{-4} mol L⁻¹ de carbendazim. Intervalo de potencial: 0 a 1,2 V. Variação de velocidade de varredura de 10 a 100 mV s⁻¹, $E_i = 0$ V

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

As curvas relacionando a corrente de pico anódica (I_{pa}) em função da velocidade (v) e em função da raiz quadrada da velocidade ($v^{1/2}$) estão apresentadas na Figura 10, onde observa-se uma maior linearidade entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a velocidade de varredura (v), sugerindo que o processo é limitado pela cinética de transferência eletrônica.⁴⁷

Figura 10 - Gráfico de I_{pa} vs v (■) e I_{pa} vs $v^{1/2}$ (○)

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

No entanto, para confirmar se o mecanismo eletroquímico da reação de oxidação do carbendazim é irreversível, ou ocorre uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química (mecanismo EC), é necessário utilizar a técnica de voltametria de onda quadrada

4.6.2 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma técnica reversa, de onde se podem extrair dados da varredura direta (no sentido do aumento do sobrepotencial da reação) e da varredura reversa (no sentido contrário ao do aumento do sobrepotencial). Por se tratar de uma técnica de pulso, é livre da contribuição das correntes capacitivas nos processos faradaicos; além do que, sua velocidade de varredura (produto da frequência de aplicação do pulso e do degrau de potencial) pode alcançar valores elevados, aumentando assim a sua resposta de corrente de pico. Com isto, dados do mecanismo da reação eletródica podem ser obtidos e utilizados para interpretar os processos eletródicos. Revisões, em português, estão disponíveis sobre as características e aplicações da técnica.^{48,49}

Foram obtidos voltamogramas de onda quadrada nas direções direta e reversa, para confirmar se o mecanismo eletroquímico da reação de oxidação do carbendazim é quase-reversível, ou se ocorre uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química (mecanismo EC). Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-AuNPs em tampão fosfato pH 7, na presença de 6×10^{-6} mol L⁻¹ de carbendazim. Varredura direta (—) e reversa (—). Parâmetros utilizados: frequência 40 Hz; amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V. A seta indica o potencial inicial e a direção de varredura.

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

A presença do pico de corrente reversa no voltamograma indica que, no mecanismo eletroquímico da reação de oxidação do carbendazim, ocorre uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química (mecanismo EC), onde a oxidação do carbendazim pode ter formado um produto reversível, o qual reage no meio e forma outro composto, inibindo a resposta de corrente no voltamograma cíclico. Como a técnica de voltametria de onda quadrada aplica o pulso reverso numa velocidade muito grande, não há tempo para a reação química se completar e assim, uma resposta “reversa” do produto formado no processo eletroquímico, é obtida. Entretanto, observa-se que a corrente reversa é menor que a corrente direta ($I_{p,r}/I_{p,d} = 0,8$), mostrando a influência da cinética da reação química acoplada. Esta relação aumenta com o aumento da velocidade de varredura (no caso, da frequência), podendo chegar muito próximo de 1,0, quando a velocidade de varredura exceder a constante de velocidade da reação química acoplada.

O mecanismo da reação de eletro-oxidação do carbendazim não está esclarecido na literatura. Entretanto, segundo Pavão et al.,⁵⁰ durante o processo metabólico do carbendazim em ratos, a principal reação química que ocorre é a hidroxilação, fornecendo como principal metabólito o 5-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato (5-HBC) encontrado na urina e fezes de ratos machos. Assim, neste trabalho propomos que a eletro-oxidação do carbendazim ocorre segundo o mecanismo:

A etapa química de oxidação do epóxido para o hidróxido é a responsável pela resposta quase-reversível observada no voltamograma do carbendazim.

▪ *Variação do pH do tampão fosfato*

Escolheu-se utilizar o tampão fosfato como eletrólito suporte, e em seguida foi feito um estudo da variação do pH deste eletrólito. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão apresentados na Figura 12 onde nota-se que a solução tampão com pH 7 apresenta o maior valor de corrente, comparado com as soluções tampão de pH diferentes. Observa-se também, que ao aumentar o valor do pH da solução tampão, o potencial é deslocado para valores mais negativos. Esta dependência dos parâmetros da reação com o pH também está relacionada com a participação de prótons na etapa determinante da velocidade da reação de oxidação do carbendazim, como sugerido anteriormente.

Figura 12 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com pH de 1 a 9. Parâmetros utilizados: frequência 40Hz; amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V

Na Figura 13 tem-se o gráfico dos valores de $I_{pa}/\Delta E_{p1/2}$ versus pH, indicando que a solução tampão com pH 7 apresenta o maior valor de $I_{pa}/\Delta E_{p1/2}$. Portanto, este foi o valor de pH da solução tampão fosfato escolhido para os estudos posteriores. =

Figura 13 - Valores de $I_{pa}/\Delta E_{p1/2}$ versus pH

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

▪ *Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada*

Estudou-se o efeito dos parâmetros experimentais utilizados na voltametria de onda quadrada, na presença de $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbendazim em solução de tampão fosfato pH 7.

- *Frequência*

Inicialmente, variou-se a frequência, mantendo fixos amplitude em 0,05 V e o salto de potencial em 0,001 V. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos encontram-se na Figura 14, na qual observa-se um aumento no valor de corrente até a frequência de 30 Hz. Para frequências maiores, nota-se uma diminuição no valor de corrente. Assim, adotou-se o valor de frequência de 30 Hz, o qual apresentou o maior valor de corrente.

Figura 14 - Variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Parâmetros utilizados: amplitude 0,05 V; salto de potencial 0,001 V

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

- Amplitude

Também estudou-se o efeito da amplitude, mantendo fixos a frequência em 30 Hz, e salto de potencial em 0,001 V. Os voltamogramas obtidos estão na Figura 15. Nota-se que há aumento no valor de corrente até a amplitude de 100 mV, e aumento da largura de pico de acordo com o aumento da amplitude. Adotou-se a amplitude de 60 mV, já que apresenta uma corrente relativamente alta e para amplitudes maiores que 60 mV, observa-se que os picos são muito largos, perdendo seletividade.

Figura 15- Variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Parâmetros utilizados: frequência 30 Hz; salto de potencial 0,001 V

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

- Salto de potencial

O último parâmetro avaliado foi o salto de potencial, mantendo fixos a frequência em 30 Hz e amplitude em 60 mV. Na figura 16 tem-se os voltamogramas obtidos. Observa-se que o salto de potencial de 0,2 mV apresentou o pico mais simétrico; adotou-se portanto, este valor para o salto de potencial.

Figura 16 - Variação do salto de potencial. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT - AuNPs, utilizando solução de carbendazim com concentração $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Parâmetros utilizados: frequência 30 Hz; amplitude 60 mV

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

Os valores dos parâmetros otimizados para a voltametria de onda quadrada, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs – AuNPs, estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos parâmetros otimizados para a voltametria de onda quadrada

Parâmetro	Valor
Frequência	30 Hz
Amplitude	60 mV
Salto de potencial	0,2 mV

Fonte: Relatório FAPESP, Proc. No. 2013/01905-7 Erica Megumi Kataoka, 2014

4.7 Determinação eletroquímica de carbendazim

Neste item, a metodologia eletroquímica desenvolvida será aplicada para a quantificação do pesticida carbendazim em tampão fosfato e em amostras de suco de laranja contaminadas artificialmente. Um tratamento estatístico ³⁷ será utilizado para a determinação de parâmetros como a reprodutibilidade e a repetibilidade, o limite de detecção e quantificação e os erros inerentes à metodologia eletroanalítica proposta.

Todas as medidas foram repetidas cinco vezes e o resultado apresentado é a média destas medidas, com sua respectiva barra de erros. Estimou-se o desvio padrão relativo para as medidas repetidas, assim como para o método de preparação dos eletrodos modificados. Para a preparação dos eletrodos, 10 medidas com eletrodos diferentes, no mesmo analito, geraram um desvio padrão relativo de 5,8%. Já para as medidas repetidas com o mesmo eletrodo, em 10 soluções diferentes de carbendazim com concentração 1×10^{-5} mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, utilizando os parâmetros otimizados previamente, forneceram um desvio padrão relativo de 3,2%.

4.7.1 Determinação de carbendazim em tampão fosfato

A Figura 17 mostra a resposta da voltametria de onda quadrada para o eletrodo MWCN - AuNPs em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, contendo diferentes

quantidades de carbendazim, de 1×10^{-7} a 3×10^{-6} mol L⁻¹. Os parâmetros utilizados foram: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV.

Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo MWCNT - AuNPs em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, contendo diferentes quantidades de carbendazim: (1) branco, (2) 2×10^{-7} , (3) 3×10^{-7} , (4) $4,0 \times 10^{-7}$, (5) 5×10^{-7} , (6) $6,0 \times 10^{-7}$, (7) $7,0 \times 10^{-7}$, (8) 8×10^{-7} , (9) $1,5 \times 10^{-6}$, (10) 2×10^{-6} , (11) $2,5 \times 10^{-6}$, (12) 3×10^{-6} mol L⁻¹, com os seguintes parâmetros da onda quadrada: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV

Fonte: Autoria própria

Conforme se pode observar na Figura 17, os valores de corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada estão diretamente relacionadas com a concentração de carbendazim presente no eletrólito. Esta relação está demonstrada na Figura 18, que apresenta a curva analítica para a determinação eletroquímica do pesticida em tampão fosfato pH 7,0. Cada ponto nesta curva analítica é a média aritmética de 5 determinações diferentes da mesma concentração de carbendazim. Os erros envolvidos na determinação estão apresentados na forma de barras de erro, na Figura 18.

Figura 18 – Curva analítica para concentrações crescentes do pesticida carbendazim, em tampão fosfato pH 7,0

Fonte: Autoria própria

Observa-se, na Figura 18, que a reta intercepta o eixo y no valor de 2,3, um valor muito próximo daquele da corrente obtida para o branco (tampão fosfato), no potencial de 0,76 V, que é equivalente ao valor do potencial de pico de oxidação do carbendazim, nestas condições experimentais, i.e., 2,2. Assim, pode-se considerar este intercepto como a contribuição do branco na corrente faradaica total do processo de oxidação.

Utilizando-se as equações (1) – (7) apresentados na Metodologia, chega-se à equação da reta dos mínimos quadrados (reta preta na Figura 18) como sendo:

$$I_p = 0,1 + 4,30 [\text{carbendazim}], \text{ com } r^2 = 0,9911 \quad (n = 5) \quad (9)$$

Além disto, calcula-se o desvio padrão do intercepto como sendo $S_{y0} = 0,25$ e o desvio padrão da tangente como sendo $S_b = 0,18$. Com estes valores e a equação (6), $LD = y_b + 3S_{y0}$, obtém-se o limite de detecção para o carbendazim nas condições otimizadas, a partir das Figuras 19 e 20. Assim:

$$I_{LD} = (2,30 - 2,20) + 3 \times 0,25 = 0,85 \mu\text{A} \quad (10)$$

Da equação da curva analítica (equação 9):

$$0,85 = 0,1 + 4,30 \times LD \rightarrow LD = 0,17 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \quad (11)$$

Já o limite de quantificação é obtido considerando que $LQ = 3,3LD$.

$$LQ = 0,17 \times 10^{-6} \times 3 = 0,56 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \quad (12)$$

Os valores de limites de detecção e quantificação encontrados aqui se comparam com aqueles previamente publicados ²³. Entretanto, deve-se ressaltar que estes limites foram determinados com um tratamento estatístico que leva em consideração o desvio padrão do intercepto da reta de mínimos quadrados, obtida de todos os pontos da reta e não apenas de medidas repetidas do branco. Este tratamento estatístico ⁵¹ fornece resultados usualmente maiores que aqueles obtidos pelo método proposto pela IUPAC, o qual é utilizado na maioria dos trabalhos publicados na literatura.

4.7.2 Determinação de carbendazim em suco de laranja

Como já descrito anteriormente, amostras de suco de laranja adquiridas no comércio local foram utilizadas para a determinação do pesticida carbendazim, utilizando-se a metodologia descrita anteriormente. Não se observou qualquer sinal analítico da reação de oxidação do pesticida nas amostras recém adquiridas. Estas medidas serviram apenas como branco, para as determinações posteriores.

Para se fazer a determinação foi necessário, então, contaminar artificialmente estas amostras. Assim, concentrações de 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbendazim foram acrescentadas à célula eletroquímica contendo suco de laranja dissolvido em tampão fosfato (numa razão em volume de 1:9 de suco:tampão). Os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão apresentados na Figura 19.

Antes de obter cada voltamograma de onda quadrada, foram feitas ciclagens em tampão fosfato utilizando a voltametria cíclica, a fim de garantir que o pesticida não estava adsorvido na superfície do eletrodo.

Figura 19 - Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo MWCNT - AuNPs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + suco de laranja (razão em volume 1:9 suco:tampão) contendo diferentes quantidades de carbendazim: (1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-7}$, (3) $5,0 \times 10^{-7}$, (4) $1,0 \times 10^{-6}$, (5) $1,5 \times 10^{-6}$, (6) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV

Fonte: Autoria própria

A partir dos voltamogramas de onda quadrada obtidos, as correntes de pico para cada concentração foram coletadas e, com o auxílio da equação (9), transformadas em concentrações de carbendazim medidas nas amostras de suco de laranja. Assim, se obtém as concentrações conhecidas (μ) e as obtidas experimentalmente ($\bar{x}$). Para se comparar ambos os valores (equação (8)), é necessário obter o desvio padrão das medidas. Consequentemente foram executadas 5 medidas distintas para a concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbendazim em tampão com suco de laranja, e os resultados são apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Cinco repetições dos voltamogramas de onda quadrada, na presença de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbendazim. Parâmetros utilizados: frequência 30Hz; amplitude 60 mV; salto de potencial 0,2 mV

Fonte: Autoria própria

As correntes de pico dos cinco voltamogramas foram obtidas e estão apresentadas na Tabela 6, abaixo, juntamente com o cálculo de $\bar{x}$ e de s .

Tabela 6 - Valores das correntes de pico obtidos a partir da Figura 20 e parâmetros estatísticos calculados

$I_p / \mu\text{A}$	$\bar{x} / \mu\text{A}$	$s / \mu\text{A}$
8,02	7,83	0,23
7,82		
7,73		
7,85		
7,76		

Fonte: Autoria própria

Assim, considera-se o desvio padrão obtido, $s = 0,23$, como representativo para todas as outras concentrações de carbendazim nas amostras de suco de laranja.

Com todos os valores de I_p apresentados na Tabela 6 e a equação (9) é possível calcular os valores de concentrações recuperadas para as diferentes concentrações do pesticida. Estes dados estão incluídos na Tabela 7.

Tabela 7-Valores das correntes de pico obtidos a partir da Figura 19 e sua conversão para concentrações de carbendazim utilizando a equação (9)

$I_p / \mu A$	$I_p = 0,1 + 4,30 [\text{carbendazim}]$	$[\text{carbendazim}]_{\text{adicionada}}$
	$[\text{carbendazim}] / \mu\text{mol L}^{-1}$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
1,42	branco	0
2,36	0,19	0,2
3,76	0,52	0,5
4,96	1,02	1,0
6,0	1,37	1,5
8,2	1,90	2,0

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 8, os valores de concentrações obtidos pela voltametria de onda quadrada e aqueles adicionados inicialmente nas amostras de suco de laranja estão apresentados. Com estas concentrações e a equação (8) podem ser calculados os valores dos parâmetros t de Student, para cada recuperação da Tabela 7. O valor tabelado foi obtido da Tabela apresentada no Anexo I, para 4 graus de liberdade e 95% de certeza, num teste bicaudal.

Tabela 8 - Valores das concentrações de carbendazim obtida e adicionada, juntamente com os valores calculados e o valor tabelado de t . Grau de confiança de 95% para $n=5$ e $s = 0,23$

[carbendazim]	[carbendazim]_{adc}	t_{calc}	t_{tab}
$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\mu\text{mol L}^{-1}$	Equação (8)	
0,19	0,2	0,09	
0,52	0,5	0,19	
1,02	1,0	0,19	2,78
1,37	1,5	1,22	
1,90	2,0	0,97	

Fonte: Autoria própria

Como se pode observar na Tabela 8, todos os valores de t_{calc} são menores que o valor tabelado. Portanto, a hipótese nula é verdadeira: não se conseguiu demonstrar qualquer diferença entre os valores de carbendazim adicionados às amostras e os valores obtidos pela análise por voltametria de onda quadrada e, desta forma, é possível utilizar a curva analítica obtida no tampão fosfato e, ainda assim, obter o valor exato de pesticida na amostra de suco de laranja.

O estudo de interferentes tais como ácido ascórbico e ácido cítrico, os quais são os principais componentes do suco de laranja, não foi necessário. Isto porque a metodologia proposta foi capaz de recuperar a mesma quantidade de pesticida que foi adicionada à amostra de suco. Além disso, Razzino et. al ²³ demonstraram que o ácido ascórbico é detectado em um valor de potencial distinto do valor de potencial de oxidação do carbendazim, e o ácido cítrico não apresentou sinal eletroquímico nas condições utilizadas.

Esta discussão atesta a exatidão da metodologia proposta, ou seja, a sua capacidade de fornecer o “valor real” do analito, sem sofrer qualquer influência dos componentes da matriz complexa do suco de laranja. Desta forma, o método voltamétrico é adequado para estas quantificações.

5 CONCLUSÕES

A metodologia analítica proposta neste trabalho, empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro e a técnica de voltametria de onda quadrada, mostrou-se adequada para a quantificação de carbendazim em amostras de suco de laranja dissolvidas em solução tampão fosfato pH 7,0. A reprodutibilidade na confecção dos eletrodos foi bastante alta, permitindo obter superfícies semelhantes.

O tratamento estatístico utilizado ³⁸ permitiu a obtenção de um limite de detecção tão baixo quanto outros publicados anteriormente, porém com um tratamento estatístico muito mais sólido que aquele proposto pela IUPAC, para o mesmo fim.

Com o tratamento estatístico empregado mostrou-se, com 95% de certeza, que a voltametria de onda quadrada pode ser utilizada como técnica analítica para quantificar o carbendazim em suco de laranja, fornecendo resultados precisos e exatos, o que possibilita uma eventual miniaturização do equipamento analítico e a quantificação do pesticida em análises “in situ” e em tempo real, em amostras de alimentos. Além disto, não requer uma mão de obra altamente qualificada, como a técnica cromatográfica utilizada pela ANVISA, e tem um custo e tempo de execução muito menores.

ANEXO I

Valores críticos de t para testes bicaudais

Graus de liberdade	Valores de t	
	95%	99%
1	12,71	63,66
2	4,30	9,92
3	3,18	5,84
4	2,78	4,6
5	2,57	4,03
10	2,23	3,17
20	2,09	2,85
30	2,04	2,75
50	2,01	2,68
100	1,98	2,63

Fonte: Autoria própria

6 REFERÊNCIAS

- ¹ MALTHUS, T. **An essay on the principle of population**. London: Oxford University Press, 1798. 208 p.
- ² UNITED NATIONS. **The World at Six Billion**. 2004. Disponível em: < <http://www.un.org/esa/population/publications/sixbillion/sixbilpart1.pdf> >. Acesso em: 21 out. 2015.
- ³ GRID-ARENDAL. **The environmental food crisis: world food supply**. 2014. Disponível em: < <http://www.grida.no/publications/rr/food-crisis/page/3562.aspx> >. Acesso em: 21 out. 2015.
- ⁴ ENVIRONMENT PROTECTION AUTHORITY (EPA). **What are pesticides and how do they work?**. Disponível em: < <http://www.epa.nsw.gov.au/pesticides/pestwhatrhow.htm> >. Acesso em: 21 out. 2015.
- ⁵ PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **J. Agric. & Envir. Ethics**, v. 8, p. 17-29, 1995.
- ⁶ CARSON, R. L. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Gaia, 2010. 327 p.
- ⁷ MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms and perspectives. **Toxic. & Appl. Pharmacol.**, v. 268, p. 157-177, 2013.
- ⁸ ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, p. 141-147, 2004.
- ⁹ DE SOUZA, A.; MEDEIROS ADOS, R.; DE SOUZA, A. C.; WINK, M.; SIQUEIRA, I. R.; FERREIRA, M. B.; FERNANDES, L.; LOAYZA HIDALGO, M. P.; TORRES, I. L. Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). **Cien. Saude Colet.**, v. 16, p. 3519-3528, 2011.
- ¹⁰ MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 2, p. 1000-1108, 2012.

- ¹¹ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos> >. Acesso em: 26 out. 2015.
- ¹² AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) – Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília. 2014. 32 p.
- ¹³ FERRAZ, L.; GERAQUE, E. **Sem controle, alimentos circulam com agrotóxico irregular no país**. Folha de São Paulo (caderno Cotidiano). São Paulo. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2015/10/1689919-sem-controle-alimentos-circulam-no-pais-com-agrotoxico-irregular.shtml> >. Acesso em: 26 out. 2015.
- ¹⁴ HERNÁNDEZ, F.; IBÁÑEZ, M. Multiresidue Methods for Pesticides and Related Contaminants in Food. In: LIQUID Chromatography - Applications. [S.L.] Elsevier, 2013. Cap. 12, p.319-336.
- ¹⁵ SCHENCK, F. J.; HOBBS, J. E. Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) Approach to Pesticides Residue Analysis. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 73, p. 24-30, 2004.
- ¹⁶ EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR PESTICIDES RESIDUES - FRUITS AND VEGETABLES (EURL-FV). **Dutch mini-Luke (“NL-”) extraction method followed by LC and GC-MS/MS for multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables**. Disponível em: < <http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/NL-miniLuke-extraction-method.pdf> >. Acesso em: 30 out. 2015.
- ¹⁷ SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Electroanalytical determination of the herbicide paraquat in natural water and commercial tea samples with gold electrodes obtained from recordable compact disc. **Anal. Letters**, v. 38, p. 331-341, 2005.
- ¹⁸ SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Electrochemical detection of the herbicide Paraquat in natural waters and citric fruits juices using ultramicroelectrodes. **Anal. Chim. Acta**, v. 546, p. 85-91, 2005.
- ¹⁹ GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLIN, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na

determinação de pesticidas em alimentos: métodos diretos e indiretos. **Quím. Nova**, v. 2006, p. 105-112, 2006.

- ²⁰SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; PIRES, R. C. Multiple square wave voltammetry for analytical determination of Paraquat in natural water, food and beverages using ultramicroelectrodes. **Talanta**, v. 69, p. 1200-1207, 2006.
- ²¹CAETANO, J.; MACHADO, S. A. S. Determination of Carbaryl in tomato “in natura” by an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sens. Act. B**, v. 129, p. 40-46, 2008.
- ²²CESARINO, I.; MORAES, F. C.; LANZA, M. R. V.; MACHADO, S. A. S. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilized on a core-shell composite of polyaniline-carbon nanotubes. **Food Chem.**, v. 135, p. 873-879, 2012.
- ²³RAZZINO, C. A.; SGOBBI, L. F.; CANEVARI, T.; CANCINO, J.; MACHADO, S. A. S. Sensitive determination of carbendazim in orange juice by a glassy carbon electrode modified with a thin film of mesoporous inorganic-organic hybrid material. **Food Chem.**, v. 170, p. 360-365, 2015.
- ²⁴ALIZADEH, T. Comparison of different methodologies for integration of molecularly imprinted polymer and electrochemical transducer in order to develop a paraoxon voltammetric sensor. **Thin Sol. Films**, v. 518, p. 6099-6106, 2010.
- ²⁵CHEN, S.; HUANG, J.; DU, D.; LI, J.; TU, H.; LIU, D.; ZHANG, A. Methyl parathion hydrolase based nanocomposite biosensors for highly sensitive and selective determination of methyl parathion. **Bios. Bioelect.**, v. 26, p. 4320-4325, 2011.
- ²⁶SANGHAVI, B. J.; HIRSCH, G.; KARNA, S. P.; SRIVASTAVA, A. K. Potentiometric stripping analysis of methyl and ethyl parathion employing carbon nanoparticles and halloysite nanoclay modified carbon paste electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 735, p. 37-45, 2012.
- ²⁷RAGHU, P.; REDDY, T. M.; SWAMY, B. E. K.; CHANDRASHEKAR, B. N.; REDDAIAH, K. Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples: A cyclic voltammetric study. **J. Electroanal. Chem.**, v. 665, p. 76-82, 2012.

- ²⁸MOCÁK, J.; JANIGA, I.; RÁBAROVÁ, E. Evaluation of IUPAC limit of detection and ISO minimum detectable value: electrochemical determination of lead. **N. Biotech.**, v. 9, p. 91-100, 2009.
- ²⁹ZHAO, L.; ZHAO, F.; ZENG, B. Electrochemical determination of methyl parathion using a molecularly imprinted polymer-ionic liquid-graphene composite film coated electrode. **Sens. Act. B**, v. 176, p. 818-824, 2013.
- ³⁰YAO, Y.; ZHANG, L.; XU, J.; WANG, X.; DUAN, X.; WEN, Y. Rapid and sensitive stripping voltammetric analysis of methyl parathion in vegetable samples at carboxylic acid-functionalized SWCNTs-b-cyclodextrin modified electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 713, p. 1-8, 2014.
- ³¹OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidase-goldnanoparticles-chitosan hybridfilm-graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection. **Bioelectrochem.**, v. 98, p. 20-29, 2014.
- ³²WANG, M. Y.; HUANG, J. R.; WANG, M.; ZHANG, D. E.; CHEN, J. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. **Food Chem.**, v. 151, p. 191-197, 2014.
- ³³HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 80, p. 1339-1339, 1958.
- ³⁴NOYROD, P.; CHAILAPAKUL, O.; WONGSAWAT, W.; CHUANWATANAKUL, S. The simultaneous determination of isoproturon and carbendazim pesticides by single-drop analysis using a graphene-based electrochemical sensor. **J. Electroanal. Chem.**, v. 719, p. 54-59, 2014.
- ³⁵SHAMAGSUMOVA, R. V.; SHURPIK, D. N.; PADNYA, P. L.; STOIKOV, I. I.; EVTUGYN, G. A. Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurement based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar[5]arene. **Talanta**, v. 144, p. 559-568, 2015.
- ³⁶LIU, B.; XIAO, B.; LIQIANG, C. Electrochemical analysis of carbaryl in fruit samples on graphene oxide-ionic liquid composite modified electrode. **J. Food Comp. Anal.**, v. 40, p. 14-18, 2015.

- ³⁷MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 4. ed. New York: Prentice Hall, 2000.
- ³⁸ZHANG, R.; HUMMELGARD, M.; OLIN, H. Simple and efficient gold nanoparticles deposition on carbon nanotubes with controllable particle sizes. **Mat. Sci. Eng. B**, v. 158, p. 48-52, 2009.
- ³⁹RUIZ, J. P. **Desenvolvimento e caracterização de eletrodos baseados em nanotubos de carbono de paredes múltiplas decorados com nanopartículas de ouro para detecção de NO**. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- ⁴⁰COELHO, D. **Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- ⁴¹VAIRAVAPANDIAN, D.; VICHCHULADA, P.; LAY, M. D. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. **Anal. Chim. Acta**, v. 626, p. 119-129, 2008.
- ⁴²HOU, P.-X.; LIU, C.; CHENG, H.-M. Purification of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, p. 2003-2025, 2008.
- ⁴³GOYANES, S.; RUBIOLO, G. R.; SALAZAR, A.; JIMENO, A.; CORCUERA, M. A.; MONDRAGON, I. Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy. **Diam. Relat. Mat.**, v. 16, p. 412-417, 2007.
- ⁴⁴ZHANG, J.; ZOU, H.; QING, Q.; YANG, Y.; LI, Q.; LIU, Z.; GUO, X.; DU, Z. Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. **J. Phys.Chem. B**, v. 107, p. 3712-3718, 2003.
- ⁴⁵MORAES, F. C.; CABRAL, M. F.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. **Surf. Sci.**, v. 605, p. 435-440, 2011.
- ⁴⁶HAISS, W.; THANH, N. T. K.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 4215-4221, 2007.

- ⁴⁷ WANG, J. Study of electrode reactions. In: ANALYTICAL electrochemistry. 2. ed. New York: Wiley-VCH. 2000. p.28-59.
- ⁴⁸ SOUZA, D.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos **Quím. Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- ⁴⁹ SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quím. Nova**, v. 27, p. 790-797, 2004.
- ⁵⁰ SILVA, R. C.; BARROS, K. A.; PAVÃO, A. C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Quím. Nova**, v. 26, p. 81-89, 2014.
- ⁵¹ SILVA, O. B.; MACHADO, S. A. S. Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination. **Anal. Methods**, v. 4, p. 2348-2354, 2012.