



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SISBI/UFU



1000219849

MOU
54
A347b
TES/mem

BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS INIBIDORES DA
ACETILCOLINESTERASE

Autora: MARIA MADALENA DE ALCÂNTARA

ORIENTADORA: Profa. Dra. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

UBERLÂNDIA

- 2004 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS INIBIDORES DA
ACETILCOLINESTERASE

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de
Pós-Graduação do Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Química.

AUTORA: MARIA MADALENA DE ALCÂNTARA

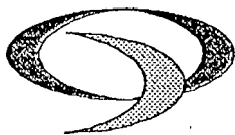
ORIENTADORA: Profa. Dra. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

CURSO: QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

UBERLÂNDIA

- 2004 -



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

e-mail: cpqquimica@ufu.br

Fone/Fax: 3239-4385

ALUNA: MARIA MADALENA DE ALCÂNTARA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5001404-5

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Biossensor Potenciométrico para a Determinação de Pesticidas Inibidoras da Enzima Acetilcolinesterase"

ORIENTADORA: PROF^ª. DR^ª. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco "X" do Campus Santa Mônica no dia 05 de novembro de 2004 às 09:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof^ª. Dr^ª. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
(Universidade Federal de São Carlos/SP)

Uberlândia, 05 de novembro de 2004.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

- *A Deus pelo Dom da vida, e por estar sempre comigo.*
- *Aos meus pais: Edgar (In memorian) e Doralice pelo incentivo e exemplo de luta, minha eterna gratidão.*
- *Ao meu esposo: Trajano e filho: Lucas Daniel, pelo companheirismo e principalmente pela imensa paciência e dedicação em todos esses anos.*
- *A minha orientadora, Prof^a. Dra. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque pela dedicação, amizade, confiança e paciência, possibilitando-me entre riscos e rabiscos, a emoção de construir o conhecimento sistematizado.*
- *Aos meus irmãos e irmãs: Marcos Antônio (In memorian), Alfredo Júlio, Abelardo, Bráulio, Joana D'arc e Aparecida com quem compartilho as lições da vida.*
- *Em especial as grandes amigas mentoras espiritual: Waltra, Edemir e Clotildes pelas orações, ensinamentos e companhia valiosa.*
- *Em especial aos amigos: Lucas, Rosilene, Delaine, Edones e Cleide.*
- *Aos amigos que contribuíram com suas experiências ou ainda com um sorriso: Wallans, Douglas, Thiago, Mário Henrique, Leonardo, Débora, Vanessa, Tatiana, Kênia, Daniella, Zuleide, Cleide Lúcia, Marluce, Maria das Graças, Ildo, Márcia e Marilene.*
- *À Isabel, secretária do Curso de Pós-Graduação em Química, pela colaboração e grande demonstração de apreço.*
- *Ao Anísio, técnico do curso de Engenharia Química pelo excelente trabalho de confecção da célula eletroquímica.*
- *Aos membros da Comissão Examinadora deste trabalho, pelas valiosas críticas e sugestões.*
- *Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFU.*
- *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido.*
- *À Universidade Estadual de Goiás (UEG).*

SUMÁRIO

	p.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
NOMENCLATURA	vii
 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO	 1
1.1 – Considerações Gerais sobre os Agrotóxicos.....	2
(a) <i>Organoclorados (OC)</i>	3
(b) <i>Organofosforados (OF)</i>	4
(c) <i>Carbamatos (CB)</i>	5
(d) <i>Piretróides</i>	6
1.2 – Considerações sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE)	6
1.3– Substâncias que desativam a enzima AChE	8
1.4 – Métodos de Determinação de Organofosforados e Carbamatos.....	12
1.5 – Biossensores.....	15
1.5.1 – Definição e Aspectos Gerais	15
1.5.2 – Tipos de transdutores eletroquímicos empregados nos Biossensores	
Enzimáticos.....	18
a) Transdutores Potenciométricos.....	18
b) Transdutores Amperométricos	20
c) Transdutores Condutométricos.....	22
1.6 – Considerações gerais sobre a imobilização da enzima AChE	24
 1.7 – JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS DO TRABALHO.....	 28

CAPÍTULO 29: PARTE EXPERIMENTAL.....	29
2.1 – Reagentes e Soluções	30
2.1.1 – Solução padrão de TiCl_4 e RuCl_3	30
2.1.2 – Soluções tampão Ácido Cítrico - Citrato de Sódio	31
2.1.3 – Soluções Tampão Ácido Cítrico - Fosfato de Sódio	31
2.1.4 – Solução de Albumina de Soro Bovino 1% m/v (BSA)	32
2.1.5 – Solução de Cloreto de Acetilcolina	32
2.1.6 – Solução de Glutaraldeído	32
2.2 – Eletrodos à Base de Óxido de Rutênio	33
2.2.1. Preparação do Eletrodo	33
2.2.2 - Montagem do Eletrodo	34
2.3 – Preparação do Eletrodo de Referência.....	35
2.3.1 - Eletrodo de referência com capilar de Luggin.....	35
2.3.2- Eletrodo de referência para as investigações do biossensor potenciométrico.....	36
2.4 - Comportamento Eletroquímico do eletrodo de Óxido de Rutênio (RuO_2)	37
2.5 – Resposta potenciométrica dos eletrodos de RuO_2	37
2.5.1 – Em função da concentração de ácido acético, em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	37
2.5.2 - Em função do pH da solução	39
2.5.3 - Em função da concentração de ácido acético, em solução tamponada	39
2.6 – Preparação do biossensor potenciométrico à base de eletrodo de RuO_2 e enzima acetilcolinesterase (AChE).....	39
2.7 – Investigações do eletrodo de RuO_2 como transdutor potenciométrico de biossensores à base de AChE	40
2.7.1 – Célula potenciométrica utilizada.....	40
2.7.2 – Resposta do eletrodo de RuO_2 para o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina, catalisada pela enzima AChE livre.....	41
2.7.3 - Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração da solução tampão fosfato	41

2.7.4 – Resposta do biossensor potenciométrico em função do pH da solução tampão	41
2.7.5 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de acetilcolina	42
2.8 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de metil paration	42

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....44

3.1 – Considerações sobre o comportamento eletroquímico dos eletrodos de óxido de rutênio (RuO ₂).....	45
3.2 – Potencial de equilíbrio dos eletrodos de RuO ₂ e efeito do pH da solução.....	47
3.3 – Avaliação da resposta dos eletrodos de RuO ₂ para ácido acético.....	50
3.3.1 - Em eletrólito suporte KNO ₃	50
3.3.2 – Em tampão fosfato como eletrólito suporte.....	53
3.4 – Avaliação do biossensor potenciométrico	54
3.4.1 – Otimização da resposta do biossensor potenciométrico	54
3.4.2 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de cloreto de acetilcolina.....	59

CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES.....65

4.1– Conclusões do Trabalho Desenvolvido	66
4.2– Propostas de Continuidade do Trabalho	67

CAPÍTULO 5 : REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....68

RESUMO

Foi investigado nesse trabalho o uso de eletrodo de filme de óxido de rutênio (IV) (RuO_2) como transdutor potenciométrico de biossensores à base de enzima acetilcolinesterase (AChE). Eletrodos de composição nominal $\text{Ru}_1\text{Ti}_0\text{O}_2$ (RuO_2 100% m/m) e $\text{Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$ (RuO_2 30% m/m) foram preparados pela imobilização de RuO_2 na superfície de placas de titânio metálico, por meio da decomposição térmica, à 450 °C, de soluções de RuCl_3 e de TiCl_4 (em HCl 1:1, v/v), previamente pincelados na superfície do titânio metálico. O potencial de equilíbrio dos eletrodos de RuO_2 30% e 100%, em KNO_3 0,1 mol L^{-1} , estão de acordo com a transição de estado sólido do par $\text{Ru}^{(\text{IV})}/\text{Ru}^{(\text{III})}$, que ocorre com a participação de H^+ .

As investigações mostraram que ambos os eletrodos de RuO_2 apresentam resposta rápida e nernstiana para pequenas variações na concentração de ácido acético, seja em solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} como em soluções tampão fosfato $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

A enzima AChE foi imobilizada na superfície do eletrodo de RuO_2 100% pelo procedimento de *cross-linking* com vapor de glutaraldeído e albumina de soro bovino. O biossensor mostrou boa sensibilidade para a determinação de ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina, em solução tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (pH 7,3). Uma resposta linear na faixa de concentração, de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mol L^{-1} de cloreto de acetilcolina foi encontrada.

O biossensor mostrou alta estabilidade, apresentando 80% da resposta original, mesmo após 3 meses de uso contínuo. Estudos de inibição pelo metil paration como modelo de pesticida organofosforado foram realizados. A incubação do biossensor por 10 min em metil paration resultou numa curva de calibração da inibição versus log da concentração de metil paration, na faixa de $5,0 \times 10^{-8}$ a $1,8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} . Os resultados obtidos nos estudos mostraram que o biossensor pode ser usado para detectar pesticidas em amostras reais.

ABSTRACT

It was investigated in this work the use of ruthenium dioxide film (RuO_2) as a potentiometric transducer of an enzymatic biosensor based on acetylcholinesterase (AChE). Electrodes of nominal composition $\text{Ru}_1\text{Ti}_0\text{O}_2$ (100% RuO_2 m/m) and $\text{Ru}_{0.3}\text{Ti}_{0.7}\text{O}_2$ (30% RuO_2 m/m) had been prepared by the immobilization of RuO_2 on the titanium support, by thermal decomposition, at 450 °C, of chloride precursors mixture solution, which was previously spilled on titanium surface. The equilibrium potential of both electrodes, 30% RuO_2 and 100% RuO_2 , in KNO_3 0.1 mol L^{-1} , is in according to the solid state transition of redox pair Ru (IV) / Ru(III) , that occurs with the participation of H^+ .

The results had shown that both RuO_2 electrodes enable fast measurements for small variations in the acetic acid concentration, either in solution of KNO_3 0.1 mol L^{-1} as in 2.0×10^{-3} mol L phosphate buffer solutions.

The AChE enzyme from electric eel was immobilized on the surface of 100% RuO_2 electrode by a glutaraldehyde in vapours and bovine serum albumin cross-linking procedure. The biosensor has shown good sensitivity for the acetic acid produced in the enzymatic hydrolysis of acetylcholine chloride, in the 5.0×10^{-3} mol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.3). The calibration graph was linear from 1.0×10^{-4} to 1.0×10^{-1} mol L^{-1} of acetylcholine chloride.

The stability of the biosensor was high and even after repetitive use for tree months the biosensor retained 80% of its original response. Inhibition studies of the biosensor by parathion methyl as a model organophosphate pesticide was investigated. Incubation of the biosensor for 10 min in parathion methyl solution resulted in a calibration plot of the inhibition versus the log of parathion methyl that was linear over range 5.0×10^{-8} to 1.8×10^{-7} mol L^{-1} . The results have shown that the biosensor can be used to detect organophosphate pesticides in real samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do aminoácido Serina [10].....	7
Figura 2: Mecanismo de catálise da acetilcolina pela enzima AChE.	8
Figura 3: Esquema de uma inibição reversível. K_M é a constante de Michaelis-Menten e K_I é a constante do inibidor [12].	9
Figura 4: Complexo carbamil-enzima.....	10
Figura 5: Alguns compostos que atuam como inibidores reversíveis da enzima AChE [13]	11
Figura 6: Esquema da reação envolvida na inibição da enzima AChE pelo diisopropilfluorofosfato (inibição irreversível)	11
Figura 7: Inibidores irreversíveis da enzima AChE [4, 5, 9].....	12
Figura 8: Esquema proposto para a imobilização de enzimas pelo método da Ligação Covalente Cruzada utilizando o glutaraldeído[84].	25
Figura 9: Esquema representativo do eletrodo de trabalho. A: fio de cobre; B: tubo de vidro de $\Phi_i = 4,0$ mm e 10,0 cm de comprimento; C: camada ativa do óxido de RuO_2 (áreas de 0,50 e 2,0 cm^2) sobre suporte de Ti metálico.	34
Figura 10: Representação esquemática da célula eletrolítica empregada para a eletrodeposição de AgCl sobre o fio de Ag. Solução eletrolítica: KCl 0,1 mol L^{-1}	35
Figura 11: Representação esquemática do eletrodo de referência com capilar de LUGGIN. A: fio de prata, b: fio de Ag/AgCl, C: solução de KCl 3,00 mol L^{-1} , saturada com AgCl.	36
Figura 12: Esquema representativo do eletrodo de referência Ag/AgCl A: fio de cobre; B: contato cobre-Ag; C: filme de AgCl.	37

- Figura 13:** Esquema da célula eletroquímica. A: Eletrodo de RuO_2 ; B: Eletrodo de referência Ag/AgCl com capilar de Luggin; C: Solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; D: Agitador magnético; E: Barra magnética. 38
- Figura 14:** Esquema da célula eletroquímica ($4,0 \times 15 \times 0,5 \text{ cm}$). A: eletrodo RuO_2 ou eletrodo de RuO_2/AChE (biossensor potenciométrico) de $0,5 \text{ cm}^2$ de área; B: eletrodo de referência Ag/AgCl ($3,0 \times 7,0 \text{ mm}$). Temperatura de trabalho = 25°C 40
- Figura 15:** Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$ e $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ em ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Área geométrica do suporte de Ti = $0,50 \text{ cm}^2$. Velocidade de varredura = $0,025 \text{ V s}^{-1}$ 45
- Figura 16:** Resposta dos eletrodos de (●) RuO_2 100 % e (■) RuO_2 30 % em função do pH da solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Temperatura: 25°C 49
- Figura 17:** Resposta dos eletrodos de (●) RuO_2 100 % e (■) RuO_2 30 % em função do pH da solução tampão ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). 49
- Figura 18:** Resposta dos eletrodos de (●) RuO_2 100 % e (■) RuO_2 30 % em função da concentração crescente de ácido acético. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). 50
- Figura 19:** Resposta dos eletrodos de (●) RuO_2 100 % e (■) RuO_2 30 % em função da concentração decrescente de ácido acético. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). 51
- Figura 20:** Resposta do eletrodo $\text{Ru}_{(x)}\text{Ti}_{(1-x)}\text{O}_2$ para CH_3COOH presente na solução aquosa. 52
- Figura 21:** Resposta do eletrodo de RuO_2 100% em função da concentração de ácido acético, em solução tampão fosfato $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). 54

- Figura 22:** Centro ativo de uma enzima com estrutura espacial específica (a) e ligação do substrato ao centro ativo (b). (Reproduzida de Lehninger, 1982)..... 55
- Figura 23:** Resposta do biosensor potenciométrico para ácido acético produzido pela hidrólise das acetilcolina. 56
- Figura 24:** Resposta do biossensor potenciométrico em função do pH da solução tampão fosfato (A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Concentração de cloreto de acetilcolina: $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 57
- Figura 25:** Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração da solução tampão fosfato, pH 7,0. Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Concentração de cloreto de acetilcolina: $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 59
- Figura 26:** Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de cloreto de acetilcolina, em solução tampão fosfato de concentração (A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$)..... 60
- Figura 27:** Resposta do biossensor para o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo de uso. Concentração da solução tampão: $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Média da resposta de 03 biossensores.. 61
- Figura 28:** Inibição da resposta do biossensor potenciométrico em função do log da concentração de Metil Paration, obtida em tampão fosfato $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Cloreto de acetilcolina: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns biossensores enzimáticos disponíveis comercialmente [35]..... 17

NOMENCLATURA

Ω - ohm – resistência elétrica

μ - Micro – 10^{-6}

v - Velocidade de varredura [mV s^{-1}]

ϕ_i - Diâmetro interno [mm]

[X] – Concentração do composto X

AchE – Enzima acetilcolinesterase

BSA – Albumina de Soro Bovino

CB – Inseticidas Carbamatos

CG – Cromatografia Gasosa

ChOD – Enzima Colina Oxidase

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ddp – Diferença de Potencial

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DIPF – di-isopropil-fosfluoridato

DNP – Detecção Nitrogênio-Fósforo

E - Enzima

E_(x) – Potencial

EIS – Eletrodos de Íons Seletivos

ERH – Eletrodo Reversível de Hidrogênio

ES – Complexo Enzima-Substrato

GOD – Enzima Glicose Oxidase

I – Inibição

KM – Constante de Michaelis-Menten

LD – Limite de Detecção

MP – Metil Paration

OC – Inseticidas Organoclorados

OF – Inseticidas Organofosforados

P – Produto de Reação Enzimática

S – Substrato

SNC – Sistema Nervoso Central

U – Unidades de enzima

UV – Ultra-violeta

V – Volts

VC – Voltamograma Cíclico

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 – Considerações Gerais sobre os Agrotóxicos

Os compostos orgânicos sintéticos começaram a ser usados como agrotóxicos no mundo após a Segunda Guerra Mundial. O uso desses compostos nos países da África, Ásia e América Latina, que têm a agricultura como principal base de sustentação econômica, foi intensificado após fortes pressões de organismos financiadores internacionais, de que tal uso garantiria o aumento na produção de alimentos, contribuindo, dessa forma, para o combate à fome nesses países [1].

No Brasil, os agrotóxicos começaram a ser usados em larga escala a partir da década de 70. A Lei Federal nº 7.802, de 11/07/89 define o termo AGROTÓXICOS como:

"... produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja a de alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento".

Dada a grande diversidade de produtos, cerca de duas mil formulações comerciais diferentes no Brasil, os agrotóxicos são classificados quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem. Nesse sentido, os agrotóxicos podem ser classificados como Inseticidas; Fungicidas; Herbicidas; outros grupos como os Raticidas, Acaricidas; Nematicidas; Fumegantes etc. A classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem é de grande utilidade para o diagnóstico das intoxicações e instituição de tratamento específico [1,2,3].

Cabe ressaltar que os agrotóxicos não são usados exclusivamente na agricultura. Por exemplo, muitos inseticidas que encontram uso intensivo na agricultura, especialmente

nos sistemas de monocultura em grandes extensões, são também empregados no controle de pragas domésticas e na eliminação e controle de vetores transmissores de enfermidades endêmicas, em saúde pública. Muitos herbicidas e derivados de inseticidas encontram aplicação para fins militares, como armas químicas [3,4,5].

O Brasil encontra-se entre um dos maiores consumidores de produtos agrotóxicos do mundo, seja para uso agrícola, doméstico e em Campanhas de Saúde Pública, segundo dados da Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura e Abastecimento, de 1995 [1].

Dentre os agrotóxicos, os inseticidas e herbicidas representam as classes de compostos de maior preocupação para a sociedade, considerando-se o uso intensivo e em grande escala dos mesmos na agricultura. Os inseticidas pertencem a quatro grupos químicos distintos: organoclorados; organofosforados, carbamatos e piretróides. Os organofosforados e carbamatos encontram aplicação também como fitossanitários, nematicidas, larvicidas e acaricidas sistêmicos ou como zoossanitários, no campo ou nas residências domésticas [2-5].

(a) Organoclorados (OC)

Os compostos organoclorados são compostos clorados derivados do benzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno. São exemplos o diclorodifeniltricloroetano (DDT), primeiro composto orgânico sintético a ser usado como inseticida, Aldrin, Endrin, BHC, Endossulfan, Heptacloro, Lindane. Esses compostos foram os primeiros compostos a serem utilizados na agricultura e no controle de insetos transmissores de doenças e demais pragas. Embora esses compostos sejam menos tóxicos (em termos de toxicidade aguda, que provoca morte imediata) que outros compostos organo-sintéticos, são mais persistentes nos organismos, podendo concentrar-se nos tecidos adiposos, especialmente no abdômen, cérebro e fígado, e causar efeitos patológicos em longo prazo e impactos ambientais de grandes proporções. A eliminação dos OC se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno [1-5].

Dentre os problemas causados pelo DDT sobre os animais e seres humanos destacam-se os efeitos no sistema reprodutivo e a diminuição da produção do leite materno. Os OC podem apresentar, dentre outros, efeito cancerígeno, mutagênico e

neurotóxico. Nos casos agudos, os organoclorados atuam no sistema nervoso central (SNC), interferindo nas transmissões dos impulsos nervosos, podendo causar alterações no comportamento, no sistema imunológico, diminuindo a respostas do organismo às infecções, na atividade da musculatura involuntária, provocando distúrbios sensoriais e depressão dos centros vitais, particularmente do sistema respiratório. Devido aos problemas causados pelos OC, esses compostos foram progressivamente restringidos ou mesmo proibidos em muitos países [1,2- 5].

Apesar da proibição dos OC em muitos países, muitos desses compostos são ainda usados no Brasil, principalmente em culturas de hortaliças, como por exemplo, o uso de fungicidas como Maneb, Zineb e Dithane em culturas de tomate e pimentão. O Maneb e Zineb podem provocar doença de Parkinson e o Dithane pode causar câncer, mutação e malformações no feto [1].

(b) Organofosforados (OF)

Os organofosforados (OF) são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico. São exemplos o Paraoxon, Folidol, Azodrin, Malation, Diazinon, Paration e Metil Paration.

Tais compostos apresentam toxicidade aguda para os insetos e, muitos desses compostos, apresentam também toxicidade aguda para o homem e demais mamíferos. Por outro lado, têm como principal vantagem o fato de não sofrerem acumulação nos organismos, podendo sofrer rápida degradação e serem excretados pela urina. Assim, os OF resolvem o problema da persistência e da bioacumulação nos organismos mas às custas da maior toxicidade para os organismos, quando esses compostos ainda estão em atividade. A ação tóxica dos OF ou de seus produtos de bio-transformação (ou da transformação ocorrida no meio ambiente) sobre os organismos deve-se à inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos entre células neuro-musculares [6,7].

Os compostos OF mais lipofílicos podem alcançar concentrações significativas no tecido nervoso e/ou outros tecidos ricos em lipídios. Sendo assim, os OF podem desenvolver prontamente ou tardiamente os sinais clínicos da intoxicação. A toxicidade

destes produtos está intimamente ligada à sua bio-transformação, que pode ocorrer por vários mecanismos [8]. Dentre esses, encontram-se:

- Dessulfuração: constitui uma das principais vias de bio-transformação dos organofosforados, que envolve a conversão da ligação $P=S$ em $P=O$, resultando num aumento acentuado da toxicidade do inseticida, como ocorre com o Paration, que é convertido em Paraoxon, e Malation, que é convertido em Malaoxon;
- Oxidação do Grupo Tioéter: esta via também resulta na formação de compostos mais ativos, porém em menor grau;
- Oxidação dos Substitutos Alifáticos: essa via também eleva em geral a toxicidade do composto OF, como no caso do Diazinon.

No meio ambiente, os inseticidas OF podem sofrer os mesmos processos de transformação, que ocorrem com relativa facilidade, visto que o O_2 do ar pode oxidar o grupo fosforotioato, $P=S$, em $P=O$. A água pode também adicionar-se ao composto e produzir compostos menos tóxicos, reduzindo os problemas de contaminação e impactos ambientais.

(c) Carbamatos (CB)

Esses compostos são derivados do ácido carbâmico, como por exemplo o Carbaril, Carbofuran, Aldicarb, Temik, Zectram, Furan. O mecanismo de ação desses compostos é semelhante aos OF, através da inibição da enzima AChE [4]. Esse processo, por outro lado, é geralmente reversível e muito mais rápido que no caso dos OF. Assim, embora as intoxicações causadas pelos CB sejam igualmente graves, quando surgem os primeiros sintomas de intoxicação, a dose absorvida está bastante longe da dose letal, o que torna os CB menos perigosos. A recuperação começa em pouco tempo já que estes compostos são rapidamente metabolizados pelos organismos humanos e eliminados pela urina, não se acumulando no organismo [4].

Na bio-transformação dos carbamatos, as reações de maior importância compreendem a hidrólise; a hidroxilação do grupamento metil (ligado ao nitrogênio), com formação de compostos com menor toxicidade; a hidroxilação do anel aromático,

resultando em produtos que são mais tóxicos ou menos tóxicos, como é o caso do Carbaril [8].

Os carbamatos possuem, além da inibição reversível competitiva ou não-competitiva, outros efeitos bioquímicos e farmacológicos, incluindo um decréscimo de atividade metabólica do fígado, alterações dos níveis de serotonina no sangue e um decréscimo da atividade da glândula tireóide [5,7].

(d) Piretróides

São compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do crisântemo [3,4]. Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina e fenpropanato. Os produtos comerciais à base de piretróides são: Decis, Protector, K-Otrine e SBP. Os piretróides sintéticos atuam no sistema nervoso central e periférico, interagindo com os canais de Na^+ , tanto nos mamíferos quanto nos insetos. Em doses muito altas, despolarizam completamente a membrana da célula nervosa e bloqueiam a excitabilidade, podendo produzir danos permanentes ou durante um longo tempo nos nervos periféricos [9].

Os piretróides sintéticos são bastante tóxicos para os peixes e artrópodes aquáticos, assim como para as abelhas; porém, na prática, os efeitos adversos são pequenos. Para os pássaros, a toxicidade destes praguicidas é baixa. Os piretróides sintéticos são geralmente metabolizados no organismo dos mamíferos e excretados, não se acumulando nos tecidos [9].

1.2 – Considerações sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE)

Dado o uso indiscriminado e ao pouco controle dos compostos OF e CB e o desconhecimento da população em geral sobre os riscos à saúde, principalmente nos países em desenvolvimento, esses compostos têm sido responsáveis pelas elevadas taxas de intoxicações humanas e em animais domésticos, durante ou após a aplicação desses produtos químicos, quando os mesmos ainda se encontram na forma ativa [2,4]. Esses inseticidas são agentes neurotóxicos inibidores das enzimas colinesterases, especialmente a AChE, que catalisa a hidrólise da acetilcolina, um importante neurotransmissor envolvido

nas transmissões de impulsos nervosos. Os carbamatos, diferentemente dos organofosforados, são inibidores reversíveis das colinesterases, porém as intoxicações podem ser igualmente graves, pois afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) [7,9].

Esses compostos podem ser absorvidos pelos organismos através da pele, por ingestão ou por inalação. Os OF, dependendo da forma de absorção e da solubilidade nos tecidos, podem desenvolver mais prontamente ou tardiamente os sinais clínicos da intoxicação. Assim, por exemplo, por inalação de vapores do produto no ambiente os primeiros sintomas aparecem em poucos minutos, enquanto que, pela ingestão oral ou exposição dérmica pode haver um aparecimento tardio dos sintomas.

O sítio ativo específico da enzima AChE envolvido na catálise da reação de hidrólise da acetilcolina é um aminoácido serina, ilustrado na Figura 1. Esse aminoácido apresenta um grupo **polar -OH**, que é responsável pela interação com o neurotransmissor. Por simplicidade, a enzima com seu respectivo sítio ativo será designada como **Enz-Ser-CH₂OH**.

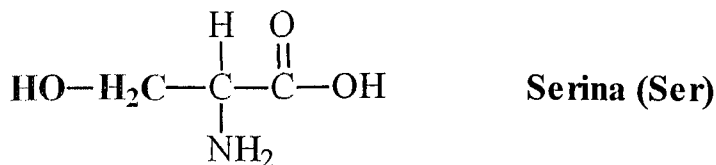


Figura 1: Estrutura do aminoácido Serina [10]

A Figura 2 mostra o esquema da reação envolvida entre a acetilcolina e o sítio ativo da enzima AChE. Nessa interação um intermediário covalente acetil-enzima é formado, ocorrendo à formação e liberação da colina. Em seguida, o intermediário acetil-enzima sofre hidrólise para formar ácido acético e colina, que são recapturados pelas vesículas pré-sinápticas, e a enzima livre pode ser usada num outro evento de transmissão de impulso nervoso [7,10].

Na presença de inibidores da enzima AChE, ocorre aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica. Se essa concentração permanecer alta, ocorre a dessensibilização do canal à acetilcolina, provocando um colapso no sistema nervoso

central, levando à perda da coordenação muscular, convulsões e, finalmente, a morte [7,11].

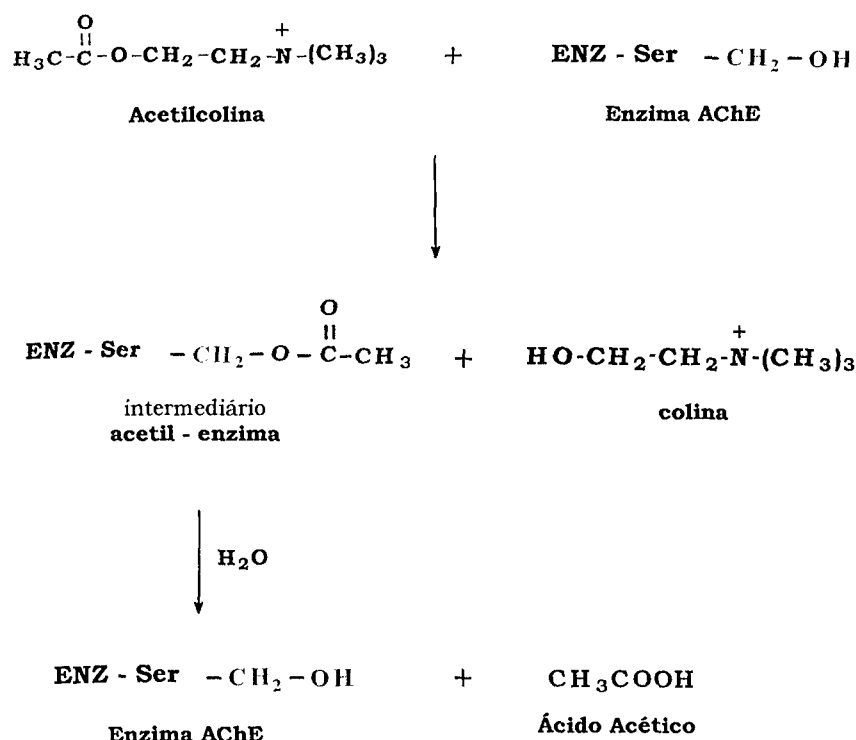


Figura 2: Mecanismo de catálise da acetilcolina pela enzima AChE.

1.3– Substâncias que desativam a enzima AChE

A atividade enzimática da AChE que ocorre nas terminações neuro-musculares, de modo particular nas fendas sinápticas, pode ser afetada por algumas substâncias, que podem provocar a inibição da atividade catalítica dessa enzima na hidrólise do neurotransmissor. Dada a grande importância do papel fisiológico da enzima AChE na transmissão de impulsos nervosos no sistema nervoso e no sistema neuro-muscular, estudos da inibição dessa enzima por diversas substâncias ou classe de substâncias têm sido realizados em grande extensão. Uma diversidade destes estudos encontra-se

disponível na literatura, como a inibição da AChE por alguns compostos, tais como: organofosforados, carbamatos, ésteres e ácidos sulfônicos [6].

Estudos da inibição enzimática são importantes porque as enzimas estão envolvidas nos principais mecanismos de controle dos sistemas biológicos e podem ser utilizados em muitos diagnósticos de doenças e tratamento. Vários medicamentos e agentes tóxicos atuam por meio da inibição de enzimas [6]. A inibição enzimática pode ser reversível e irreversível. Os inibidores irreversíveis reagem quimicamente com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva, pois podem formar uma ligação covalente com um resíduo de aminoácido, por exemplo, serina ou cisteína. A inibição reversível pode ser competitiva, incompetitiva ou mista. Os inibidores competitivos apresentam configuração espacial semelhante à do substrato e são capazes de se ligar ao sítio ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor semelhante ao complexo enzima-substrato [12].

Na inibição incompetitiva, por outro lado, a substância liga-se a um sítio diferente do catalítico, provocando desativação por modificação na conformação da enzima. Na inibição reversível, a enzima e o inibidor estão em equilíbrio, como mostra o esquema da Figura 3.

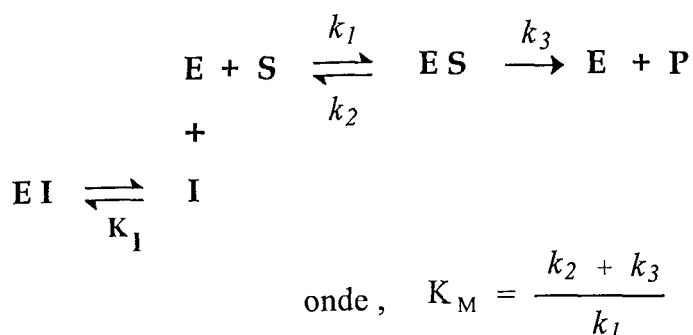


Figura 3: Esquema de uma inibição reversível. K_M é a constante de Michaelis-Menten e K_I é a constante do inibidor [12].

Entre as substâncias inibidoras destacam-se a neostigmina e a fisiostigmina, que inibem a atividade da enzima AChE de tal forma que esta, apesar de estar presente nas

sinapses, não hidrolisa a acetilcolina na placa terminal. Com isso, aumenta a quantidade de acetilcolina na fenda sináptica, após impulsos nervosos sucessivos [10,13].

As substâncias neostigmina e a fisostigmina ligam-se ao sítio catalítico da enzima AChE formando um complexo carbamil-enzima, mostrado na Figura 4, que é hidrolisado lentamente, levando à desativação da enzima por várias horas, impedindo que a AChE hidrolise de imediato a acetilcolina secretada na placa terminal [10,13].

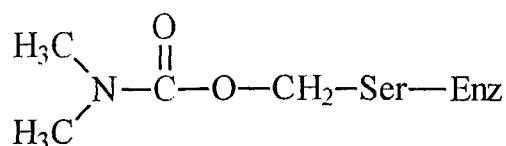
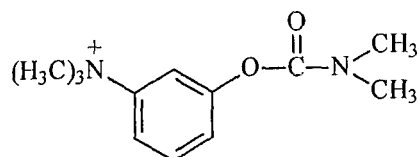


Figura 4: Complexo carbamil-enzima.

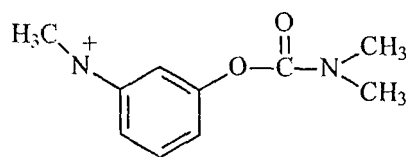
Porém, doses controladas dessas substâncias e de outros inibidores da AChE são utilizadas como fármacos no tratamento de algumas doenças. As substâncias neostigmina e a fisostigmina são utilizadas no tratamento de pacientes portadores da doença miastemia, que se caracteriza pela incapacidade das fibras nervosas em transmitir sinais para as fibras musculares. Quando o mal funcionamento dos músculos atinge os órgãos vitais, o paciente pode morrer de insuficiência respiratória, devido à paralisia dos músculos respiratórios [7].

A Figura 5 mostra alguns importantes compostos derivados do ácido carbâmico que atuam como inibidores da enzima AChE.

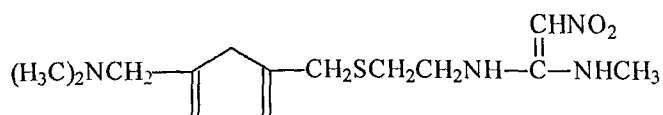
Os compostos organofosforados são inibidores potentes da enzima AChE. São capazes de inibir irreversivelmente esta enzima por meio do ataque nucleofílico sobre a cadeia lateral do aminoácido serina, presente no sítio ativo da enzima, produzindo uma serina fosforilester, que é hidrolisada muito lentamente [6,10,13]. Os compostos diisopropil-fosfluoridato (DIPF) são considerados os inibidores mais potentes da AChE. O DIPF forma complexos covalentes fosforil-enzima muito estáveis (di-disopropil-fosforil-enzima) [10,13], como mostra a Figura 6.



Neostigmina



Piridostigmina



Ranitidina

Figura 5: Alguns compostos que atuam como inibidores reversíveis da enzima AChE [13].

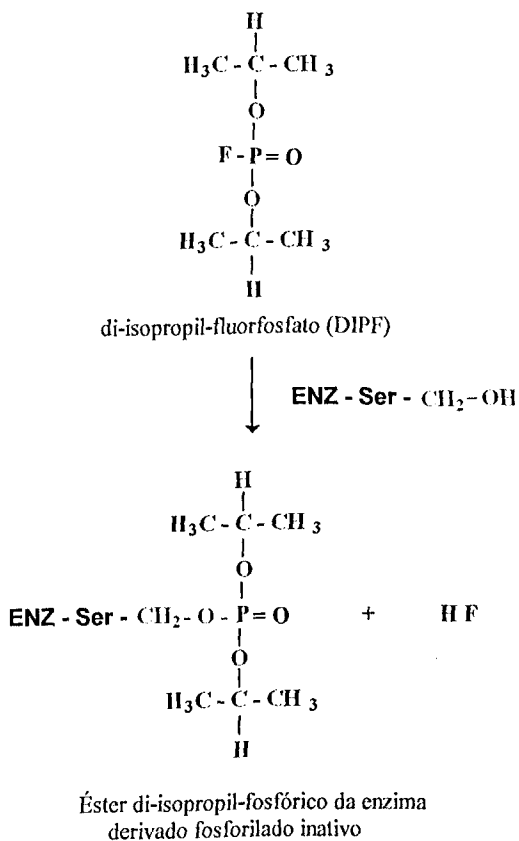
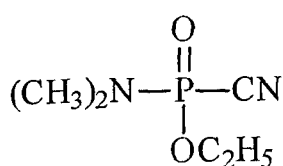


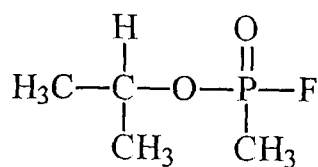
Figura 6: Esquema da reação envolvida na inibição da enzima AChE pelo diisopropilfluorofosfato (inibição irreversível).

A importância do estudo do DIPF como inibidor se deve ao fato de que ele não inibe somente a AChE, inibe também outras enzimas que possuem um resíduo de serina essencial em seus sítios ativos como, por exemplo, a quimotripsina, a tripsina, a fosfoglicomutase e várias estereases.

O DIPF, Sarin e o Tabum são compostos que apresentam utilidade militar como gases neurotóxicos em guerra química. São capazes de inativar a enzima AChE por várias semanas, causando paralisia respiratória com consequência morte por sufocamento [6,10,14]. O Tabum e o Sarin, ilustrados na Figura 7, estão entre as substâncias inibidoras da enzima AChE mais tóxicas.



Tabum



Sarin

Figura 7: Inibidores irreversíveis da enzima AChE [4,5,9].

Devido à capacidade de inativarem a enzima AChE, inseticidas OF e CB são compostos com alta aplicabilidade no combate às pragas na agricultura. O modo de ação dos CB é semelhante aos dos compostos OF, exceto que com estes compostos a enzima AChE é carbamilada e, geralmente, sua inibição não é irreversível e tem curta duração. Com isso, os distúrbios provocados no sistema nervoso central por esses compostos são menos intensos [7,9].

1.4 – Métodos de Determinação de Organofosforados e Carbamatos

O uso intensivo de grandes quantidades de OF e CB na agricultura, principalmente em monoculturas, deixam resíduos desses compostos nas plantas e no solo, os quais podem contaminar os alimentos e os mananciais de água. Considerando-se a toxicidade aguda dos OF e CB, na forma nativa ou dos compostos derivados da transformação desses

inseticidas, nos organismos ou no meio ambiente, uma diversidade de métodos encontram-se descritos na literatura para a determinação destes compostos nos alimentos, bem como nas matrizes ambientais, como solo e corpos d'água, particularmente aquela usada para o consumo pelo homem e animais [5,8]. Esses métodos buscam, em geral, alcançar seletividade e sensibilidade suficientemente elevados, tendo-se em vista as baixas concentrações dos compostos orgânicos tóxicos e a elevada complexidade das amostras, em termos de composição química, nas quais esses compostos se encontram. A busca por métodos analíticos confiáveis que atendam não somente aos requisitos de maiores seletividade e menores limites de detecção, mas também a requisitos como simplicidade, menor custo e rapidez da análise é ainda uma área de pesquisa de grande interesse.

De acordo com a Resolução CONAMA 20/86, os níveis de concentração permitidos para os pesticidas organofosforados e carbamatos totais em águas destinadas ao abastecimento público é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em Paration [14]. Deve-se considerar ainda que os baixos níveis de concentração desses compostos normalmente encontrados nos corpos d'água não representam uma situação real, pois a maior parte dos pesticidas podem se encontrar adsorvidos nas partículas coloidais dos solos, sedimentos ou dos sólidos em suspensão na água [8]. Assim, a concentração de um dado analito num corpo d'água torna-se difícil de ser estabelecida, pois depende da geoquímica e da dinâmica de funcionamento dos solos e ambientes aquáticos, como o pH, tipo e abundância de argilo-minerais, teor de matéria orgânica e de óxidos/hidróxidos de ferro, manganês e alumínio, reatividade química, gradientes hidráulicos, porosidade e permeabilidade das [8]. Muitas vezes, os efeitos tóxicos de uma substância podem se manifestar muito tempo depois de sua introdução no meio ambiente, podendo se dar em áreas pontuais ou ao longo de estruturas geológicas lineares, como as falhas [4,8,15].

A maioria dos métodos desenvolvidos para a determinação de organofosforados e carbamatos em alimentos e amostras ambientais estão baseados na cromatografia gasosa (CG) ou na cromatografia líquida (CL) [16,17]. Nesses métodos, os compostos organofosforados e carbamatos são normalmente extraídos e concentrados numa etapa prévia à análise cromatográfica, tendo-se em vista a composição química complexa da amostra e os baixos níveis de concentração (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) dos inseticidas nas amostras em questão. Para a análise cromatográfica, são empregadas colunas de separação em conjunto com sistemas detetores, para a separação e a detecção dos compostos presentes nos extratos obtidos das amostras [18].

De modo geral, a cromatografia gasosa (CG) é bastante explorada na determinação de pesticidas organofosforados, enquanto a técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV é mais empregada na determinação de carbamatos, pois esses compostos são termicamente instáveis [19,20]. A principal limitação da cromatografia líquida (CL) na determinação de organofosforados é a baixa sensibilidade da detecção UV, comparada à detecção Nitrogênio-Fósforo (DNP) empregados na CG para esses compostos [21,22,23].

Atualmente, o uso de detetores eletroquímicos acoplados à técnica CL contribuíram para a maior exploração dos métodos CLAE na determinação de certos organofosforados, em alimentos e demais matrizes ambientais como as águas e solos, pois esses detetores têm garantido maior seletividade e menores limites de detecção que os detetores UV na determinação dos referidos compostos [24,25].

O uso da técnica CLAE com detecção eletroquímica pode ser utilizada na determinação de pesticidas organofosforados que apresentam grupos nitro ou azo em suas estruturas, os quais podem ser eletroquimicamente reduzidos nos eletrodos. A maior sensibilidade da detecção eletroquímica possibilita que uma menor quantidade de amostra seja empregada na etapa de separação e concentração dos compostos orgânicos de interesse para alcançar os níveis de detecção exigidos pela técnica CLAE [15].

A principal desvantagem dos métodos cromatográficos é a necessidade de se utilizar procedimentos de tratamento da amostra, prévios à análise cromatográfica, para a separação e concentração dos pesticidas. Esses procedimentos em geral consomem muito tempo, além de consumirem grandes quantidades de solventes ou necessitarem de materiais sólidos para a extração sólido-líquido, de custo proibitivo. Devido a essas dificuldades, os métodos cromatográficos tornam-se inviáveis para análises de rotina, quando não se deseja discriminar os compostos OF e/ou CB presentes na amostra mas somente determinar a concentração total desses compostos nas amostras. Nesses casos, os métodos enzimáticos têm-se mostrado bastante promissores, tendo-se em vista a elevada seletividade e sensibilidade para a detecção de determinada classe de compostos orgânicos.

Nesse contexto, os biossensores têm sido principalmente explorados para detectar/determinar a quantidade total de pesticidas nas amostras ou nos extratos obtidos dessas amostras. Recentemente, a adaptação dos biossensores como detetores de CLAE vêm sendo também proposta para aumentar a sensibilidade e a seletividade da detecção dos compostos OF e CB separados por cromatografia líquida [15,26].

Dentre os métodos enzimáticos, os biossensores baseados na atividade da enzima AChE sobre a hidrólise do cloreto de acetilcolina têm sido bastante explorados na determinação de traços de inseticidas organofosforados e carbamatos [15,26, 27,28,29]. A simplicidade para a preparação, o baixo custo dos detetores e a rapidez das análises têm contribuído para a diversidade de biossensores propostos na literatura para aplicações em análises de inseticidas OF e CB em alimentos, em fluidos biológicos e em amostras ambientais. A adaptação dos biossensores em sistemas de análise em fluxo contínuo tornam os métodos enzimáticos mais eficientes, rápidos e sensíveis [30].

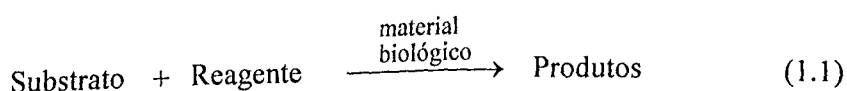
Os aspectos gerais sobre o funcionamento e tipos de biossensores aplicados na determinação de pesticidas OF e CB serão apresentados no item 1.5.3.

1.5 – Biossensores

1.5.1 – Definição e Aspectos Gerais

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que reconhece uma determinada substância química na solução (ou substrato) por meio de um componente biológico ativo, que se encontra conectado a um transdutor, que é responsável pela transformação do sinal de bio-reconhecimento num sinal óptico ou elétrico [31,32].

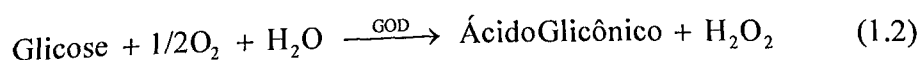
A maioria dos biossensores propostos na literatura envolve a transformação de um substrato num produto, por meio de uma reação química catalisada pelo material biológico (eq. 1.1), que se encontra normalmente imobilizado na superfície de um suporte ou do próprio transdutor, que monitorará o desaparecimento do substrato, do reagente ou o aparecimento do produto que é formado na reação [32].



Os biossensores são diferenciados de acordo com o componente biológico usado, que pode ser um anticorpo ou antígeno, uma enzima, um tecido animal ou vegetal, células, bactérias, organelas, etc. Esses materiais biocatalíticos estão intimamente conectados a transdutores que podem ser ópticos, eletroquímicos, outros.

Devido à grande variedade de componentes biológicos associados à disponibilidade de vários transdutores, pode-se obter uma grande variedade de opções frente ao desenvolvimento de metodologias analíticas. Com isso, a escolha do material biológico associado ao tipo de transdutor, bem como a escolha das condições ótimas para produzir o sinal analítico desejado definem a seletividade e a sensibilidade da análise [31].

Dentre os materiais biológicos usados na preparação de biossensores, as enzimas têm sido as mais exploradas. O biossensor enzimático mais conhecido é a base de glicose oxidase (GOD), que encontra larga aplicação em análises clínicas, no controle e diagnóstico de pacientes portadores de diabetes e outros desequilíbrios de glicemia no sangue [30,31,33,34]. A reação enzimática envolvida quando esse biossensor é colocado em contato com a solução aquosa tamponada de glicose é:



Nos biossensores à base de GOD, a concentração de glicose é normalmente determinada pela concentração de O_2 consumida ou de H_2O_2 produzida na reação de oxidação da glicose, catalisada pela enzima GOD, empregando-se um sensor ou transdutor adequado.

O princípio básico para se empregar um transdutor num biossensor enzimático é a capacidade deste em detectar uma substância química envolvida na reação catalisada pela enzima e produzir um sinal analítico de alta seletividade. Os transdutores são, portanto, sensores responsáveis pela conversão do sinal físico-químico num sinal óptico ou eletricamente detectável. Os transdutores mais empregados para essa finalidade são os espectrofotométricos e os eletroquímicos. Devido à simplicidade da instrumentação usada para a medida do sinal e o baixo custo, os transdutores eletroquímicos têm sido muito explorados na construção de biossensores, sendo os potenciométricos e os amperométricos os mais utilizados [31].

A importância dos biossensores enzimáticos com detecção eletroquímica tem crescido nas últimas décadas devido à combinação das vantagens oferecidas pela alta seletividade dos sistemas bioquímicos e pela sensibilidade da transdução eletroquímica [35]. A Tabela 1 apresenta alguns biossensores eletroquímicos disponíveis comercialmente.

Tabela 1: Alguns biossensores enzimáticos disponíveis comercialmente [35].

Substrato	Enzima	Substância monitorada / Sensor
Glicose	Glicose oxidase	H ₂ O ₂ ou O ₂ / amperométrico
Uréia	Urease	H ⁺ , NH ₃ , NH ₄ ⁺ / potenciométrico
Álcool Etilíco	Álcool oxidase	H ₂ O ₂ , O ₂ / amperométrico
Oxalato	Oxalato oxidase	H ₂ O ₂ , O ₂ / amperométrico
Salicilato	Salicilato hidroxilase	H ₂ O ₂ , O ₂ / amperométrico
Lactato	Lactato dehidrogenase	O ₂ / amperométrico
Penicilina	Penicilinase	H ⁺ / potenciométrico
Ácido Úrico	Urato oxidase	O ₂ / amperométrico
Ácido Acético	Álcool oxidase	O ₂ / amperométrico
Ácido Ascórbico	Ascorbato oxidase	O ₂ / amperométrico
Ácido Láctico	Lactato oxidase	H ₂ O ₂ ou O ₂ / amperométrico
Creatinina	Creatinase	NH ₃ ou NH ₄ ⁺ / potenciométrico
Ácido Pirúvico	Piruvato oxidase	O ₂ / amperométrico
Lactose	β-galactoxidase + glicose oxidase	H ₂ O ₂ / amperométrico
L-lisina	Lisina descarboxilase	CO ₂ / potenciométrico
Acetilcolina	Colinesterase	H ⁺ / potenciométrico

Os biossensores enzimáticos são dispositivos analíticos versáteis que têm substituído as técnicas convencionais devido a capacidade destes para determinarem seletivamente os analitos em amostras complexas, em tempo real. A facilidade de preparação, a rapidez da análise, o baixo custo, a sensibilidade e a facilidade de miniaturização constituem parâmetros relevantes para o rápido crescimento desses

sensores em análises *in vivo* e em sistemas em fluxo, em diferentes áreas tais como: medicina, alimentos e ambiental [30,31].

O uso dos biossensores enzimáticos na medicina têm merecido considerável atenção, seja para a detecção e controle de algumas doenças, como também para o monitoramento *in vivo* de metabólitos, drogas e diagnóstico de doenças. Dentre esses, destacam-se os biossensores à base da enzima AchE no sangue [36,37], os biossensores à base de urease para a determinação de ácido úrico, para o diagnóstico e tratamento de distúrbios hematológicos e os biossensores a base de glicose oxidase (GOD). Esses últimos encontram larga aplicação em análises clínicas, no controle e diagnóstico de pacientes portadores de diabetes e outros distúrbios de glicemia no sangue [30,31,33,34,38] e também na área de alimentos, no controle em processos de fermentação [31,35].

1.5.2 – Tipos de transdutores eletroquímicos empregados nos Biossensores Enzimáticos

a) Transdutores Potenciométricos

O princípio básico de funcionamento desses transdutores é o aparecimento de um potencial na interface eletrodo-solução, que é dependente da atividade de uma das espécies envolvidas na reação enzimática. A medida do potencial desses sensores é realizada em relação a um eletrodo de referência, geralmente o Ag/AgCl, em solução de KCl, sob concentração definida. Os sensores potenciométricos normalmente usados como transdutores de biossensores são os eletrodos íon seletivos (EIS) à base de membrana sólida. Guilbault & Montalvo construíram o primeiro biossensor potenciométrico para a determinação de uréia por meio da imobilização da enzima urease numa matriz de poliacrilamida, na superfície de um eletrodo de vidro seletivo a íons amônio [39].

Dentre os sensores potenciométricos, o eletrodo de vidro sensível a H^+ tem sido o mais explorado na preparação de biossensores. A origem do potencial nesse eletrodo se dá por um mecanismo diferente dos eletrodos redox, pois não envolve troca de elétrons na interface eletrodo-solução. No eletrodo de vidro a origem do potencial deve-se à elevada seletividade da membrana de vidro para H^+ .

A adsorção seletiva desse íon leva a um excesso de H^+ na superfície da membrana, produzindo uma separação de cargas na interface eletrodo-solução, que é responsável pela diferença de potencial (*ddp*). Essa *ddp* é governada pela atividade de H^+ na solução de medida, que por sua vez afetará o potencial da membrana de vidro.

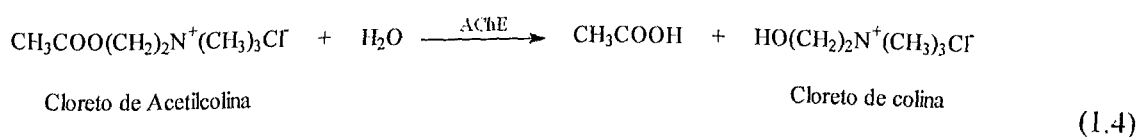
A variação do potencial da membrana de vidro pode ser medida empregando-se um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl ($HCl\ 0,1\ mol\ L^{-1}$), que faz parte do eletrodo de vidro, e um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl ($KCl\ 3,0\ mol\ L^{-1}$) para completar o circuito da medida.

A dependência entre o potencial do eletrodo de vidro, E_{vidro} , e a atividade de H^+ , a_{H^+} , é descrita por meio de uma expressão semelhante à equação de Nernst:

$$E_{vidro} = k + 0,059 \log a_{H^+} \quad (1.3)$$

onde, k inclui vários termos constantes como a_{H^+} da solução interna do eletrodo de vidro e o potencial do eletrodo de referência interno.

O eletrodo de vidro tem sido bastante explorado como transdutor potenciométrico de biossensores baseados na enzima AChE [39,40,41]. Nesses biossensores, o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina, catalisada pela enzima AChE, é o responsável pelo sinal potenciométrico medido:

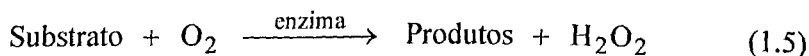


Outros transdutores potenciométricos foram também propostos para a detecção do ácido acético produzido, tais como os eletrodos à base de óxidos metálicos como Pd/PdO e Ir/IrO₂ [28,42] e os transistores com efeito de campo sensíveis a H^+ [43,44].

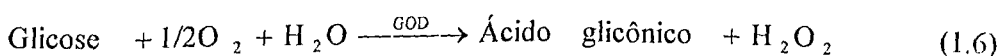
b) Transdutores Amperométricos

Os sensores amperométricos, diferentemente dos potenciométricos, são empregados quando uma das substâncias envolvidas na reação enzimática é eletroativa, isto é, pode ser oxidada ou reduzida eletroquimicamente num eletrodo, produzindo uma corrente que é proporcional à concentração da substância analisada.

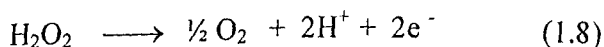
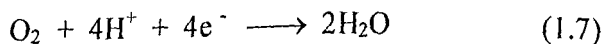
As enzimas óxido-redutases são as tipicamente usadas em biossensores com transdutores amperométricos. As enzimas óxido-redutases catalisam a reação de oxidação de uma classe de substratos pelo O_2 , com a produção de H_2O_2 , como representa a equação 1.5:



A concentração do substrato pode ser determinada pela detecção do O_2 ou do H_2O_2 sobre um eletrodo de Pt, mantido num potencial constante, para a redução de O_2 ou oxidação de H_2O_2 . O exemplo mais conhecido desse tipo de biossensor enzimático é o biossensor à base de glicose oxidase (GOD), que foi extensivamente estudado e é atualmente o biossensor comercial mais amplamente difundido em análises clínicas, para a determinação de glicose. A enzima GOD catalisa a oxidação da glicose pelo O_2 de acordo com a equação a seguir:



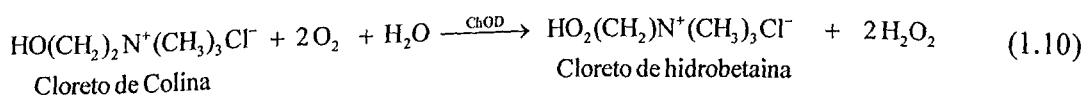
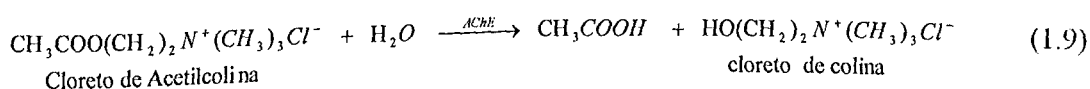
As reações de redução do O_2 e oxidação de H_2O_2 envolvida nos transdutores amperométricos de Pt são, respectivamente:



O primeiro biossensor enzimático à base de GOD foi desenvolvido por Clark & Lyons [45]. Nesse biossensor, a enzima foi fisicamente imobilizada numa membrana de celulose regenerada, que se encontrava presa à superfície de um eletrodo de Pt, usado para acompanhar eletroquimicamente o consumo de O_2 . Esse biossensor amperométrico foi sensivelmente melhorado por Updike & Hicks [46], utilizando-se gelatina para a imobilização da glicose oxidase na superfície do eletrodo. A partir destes, uma grande diversidade de biossensores à base de GOD foram desenvolvidos, para finalidades diversas, e encontram-se descritos na literatura [47,48,49,50].

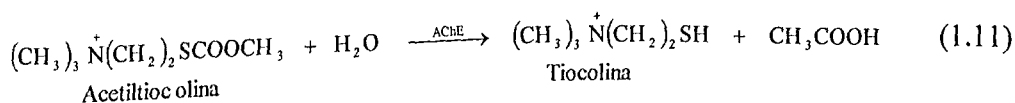
Outra classe de biossensores com transdutores amperométricos bastante estudada é aquela que utiliza a enzima AChE. Nesses biossensores, três tipos de detecção amperométrica são freqüentemente utilizadas:

1º Tipo: Determinação indireta da colina pela medida do H_2O_2 produzido na reação de oxidação da colina pelo O_2 , que é catalisada pela enzima colina oxidase (ChOD). Nesses biossensores, as enzimas AChE e ChOD estão imobilizadas juntas [51] e a seguinte sequência de reações enzimáticas estão envolvidas:

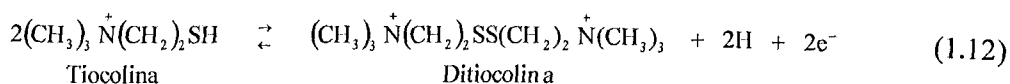


2º Tipo: Determinação indireta da colina pela medida do O_2 consumido na reação de oxidação da colina, catalisada pela enzima ChOD (eq. 1.10) [52].

3º Tipo: Determinação eletroquímica direta da tiocolina produzida, quando se utiliza a acetiltiocolina como substrato enzimático:



A tiocolina pode ser detectada por oxidação eletroquímica num eletrodo de Pt [53] ou num eletrodo de carbono quimicamente modificado [29]. A equação da reação envolvida no eletrodo é, dada pela equação 1.12:



Muitos biossensores amperométricos à base de AChE foram desenvolvidos para uso em análises clínicas, para diagnósticos e tratamento de doenças como por exemplo, o Mal de Alzheimer [34,37]. O emprego desses biossensores para a determinação de OF e CB em amostras de alimentos e de matrizes ambientais como solo e águas vem sendo também bastante explorado [31].

c) Transdutores Condutométricos

Os transdutores condutométricos são empregados quando o bioreconhecimento do substrato pela enzima produz mudanças na condutividade elétrica da solução em contato com o eletrodo, devido ao consumo ou produção de espécies iônicas [54].

Uma variedade de biossensores enzimáticos com transdutores condutométricos encontram-se descritos na literatura, envolvendo a produção de NH_4^+ ou de H^+ [30].

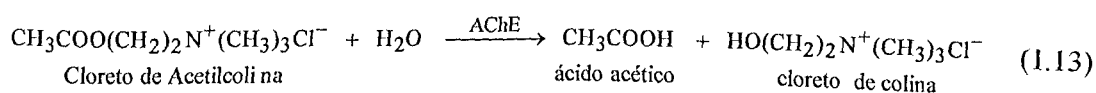
Dentre esses, encontram-se os biossensores à base de AChE, que produzem ácido acético, de acordo com a equação 1.4, que é responsável pela variação da condutividade da solução [30,55].

As principais vantagens dos biossensores condutométricos são a simplicidade de operação e o baixo custo dos detectores. Como principais desvantagens, encontram-se a baixa sensibilidade e a dependência da condutividade com a temperatura.

1.5.3 – Biossensores à base de AChE aplicados na determinação de OF e CB

Um diversidade de métodos enzimáticos baseados na inibição da atividade biocatalítica de enzimas encontra-se descrita na literatura para a determinação de OF e CB em amostras reais [28,56,57,58,59,60,61,62,63].

Devido ao fato dos compostos OF e CB serem inibidores de enzimas colinesterases, como a acetil ou a butirilcolinesterase, essas enzimas têm sido bastante investigadas como componente biológico dos biossensores [24, 56-61]. A inibição da atividade catalítica da enzima AChE provoca uma diminuição da taxa de hidrólise da acetilcolina (eq. 1.4), afetando a quantidade de ácido acético ou de colina que é produzida, quando uma quantidade definida de acetilcolina é utilizada. As mudanças nas quantidades das substâncias produzidas são proporcionais à taxa de inibição da enzima e podem ser acompanhadas por transdutores amperométricos [57-60,64,65,66,67,68,69] potenciométricos [42,70,71,72] ou condutimétricos [73].



A resposta do biossensor para uma quantidade definida de substrato obtida antes e após a inibição da enzima fornece a taxa de inibição, (I), do sinal eletroquímico. Esse parâmetro relaciona-se diretamente com a concentração de OF e/ou CB na solução.

Nos biossensores amperométricos, a determinação de pesticidas pode envolver um sistema de duas enzimas, como AChE e colina oxidase, e um detector amperométrico de O_2 [74] ou de H_2O_2 [57]. Alternativamente, foram propostos como substratos os ésteres de tiocolina [58-60,65,66,75,76] ou o *p*-aminofenilacetato [67,69], que produzem na hidrólise enzimática, as substâncias eletroativas tiocolina e *p*-aminofenol, respectivamente.

Uma diversidade de biossensores colinesterase com transdutores potenciométricos foram também investigados para a determinação de pesticidas OF e CB. Esses biossensores utilizam como sensores os eletrodos convencionais de vidro [69-71] ou eletrodos à base de óxidos metálicos como Pd/PdO, Ir/IrO₂, Sb/Sb₂O₃, em menor extensão [28,42,77,78] para medir as mudanças na quantidade de ácido acético que é produzida na

hidrólise enzimática da acetilcolina, antes e após a inibição da enzima pelos referidos pesticidas.

Embora os biossensores amperométricos sejam freqüentemente considerados como mais rápidos e sensíveis do que os potenciométricos, esses últimos são mais simples e compatíveis com os sistemas de medidas convencionais [77].

1.6 – Considerações gerais sobre a imobilização da enzima AChE

A imobilização da enzima AChE nos biossensores é uma etapa fundamental para a preparação dos biossensores, considerando-se o elevado custo da enzima, que inviabiliza o seu uso em solução. Essa imobilização pode ser feita sobre um material suporte ou diretamente na superfície do eletrodo, utilizando-se diversos métodos.

A imobilização da enzima por adsorção sobre um material suporte sólido como a sílica gel, o vidro e a alumina pode envolver interações do tipo forças de Van der Waals, dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio. Esse tipo de imobilização de enzimas tem como grande vantagem a simplicidade de execução. No entanto, esse método apresenta grandes dificuldades, tais como: falta de reprodutibilidade na forma de imobilização da enzima; possibilidade de lixiviação da enzima durante o processo de medida; possibilidade de perda acentuada da atividade da enzima, quando imobilizada; diminuição e perda da atividade da enzima durante o uso, frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura [32,79,80].

Diversos métodos de imobilização pelo trapeamento da enzima em eletrodos de pasta de carbono [80,81], em celulose polihidroxilada ou criohidrogel [82] e em polímeros derivados de polipirrol [83,84] encontram-se descritos na literatura. Esses métodos têm como principal vantagem o uso de procedimento relativamente simples. Entretanto, podem apresentar problemas associados à lixiviação, devido aos diferentes tamanhos de poros nos polímeros, como também problemas de tempo de resposta, pela dificuldade de difusão das espécies envolvidas através das membranas [32,79,81]. Recentemente, métodos de imobilização de enzimas por oclusão em materiais produzidos pelo método sol-gel, obtidos pela hidrólise e condensação de precursores alcóxidos, têm sido explorados por diversos autores [79,85,86]. Esses materiais exibem várias vantagens como a rigidez física, a inércia química, a estabilidade térmica e baixa tendência para inchamento [85,86].

A imobilização de enzimas pelo método da formação de ligação covalente envolve a formação de ligações entre o suporte sólido e a enzima. Os suportes mais utilizados são polímeros como *agar-agar*, celulose, membranas de colágeno, esferas de vidro, etc. As ligações covalentes são estabelecidas entre os grupos funcionais específicos da enzima, que não são essenciais para a sua atividade catalítica, com os grupos reativos presentes no suporte sólido ou na superfície do eletrodo. As grandes vantagens deste método são a minimização da lixiviação e a maior estabilidade do complexo enzima-suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica, do solvente. Entretanto, o método apresenta alta possibilidade de perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do sítio ativo da enzima, como também pela deformação da estrutura tridimensional da mesma [79].

O método da formação de ligações covalentes cruzadas é muito explorado para a imobilização de enzimas. Nesse método tem-se a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais da enzima e do suporte, utilizando-se reagentes multifuncionais como o glutaraldeído e o ácido NN'-bis-diazobenzidina-2,2'-dissulfônico [87]. O glutaraldeído é o reagente mais amplamente utilizado para esse tipo de imobilização de enzimas.

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar a imobilização da enzima por meio do glutaraldeído. Um esquema provável dessa reação está mostrado na Figura 8 [87], envolvendo os grupos carbonila do glutaraldeído com os grupos amina (NH_2) da enzima, formando um produto macromolecular.

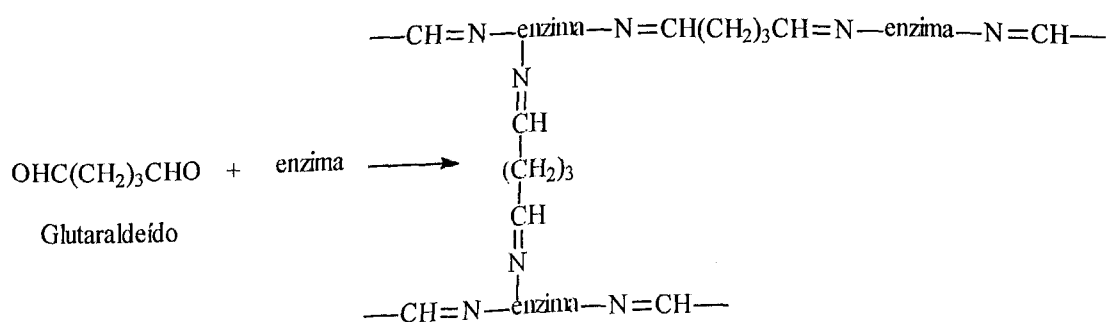


Figura 8: Esquema proposto para a imobilização de enzimas pelo método da Ligação Covalente Cruzada utilizando o glutaraldeído [84].

As principais vantagens da imobilização pela formação da ligação cruzada são a simplicidade de execução e a forte interação da enzima com o suporte, diminuindo drasticamente a lixiviação e proporcionando ao biossensor uma maior estabilidade. Entretanto, apresenta grandes desvantagens como a dificuldade do controle da imobilização, o uso de grandes quantidades de enzima, a baixa atividade da enzima imobilizada e dificuldades na reprodutibilidade do biossensor [32].

Para contornar os problemas citados e aumentar a estabilidade da enzima AChE imobilizada, diversos autores vêm utilizando a albumina de soro bovino (BSA), como proteína inerte fornecedora de grupos amino, para realizar as ligações de *cross-linking* com o glutaraldeído [67,77,88]. Ivanov e colaboradores [77] propuseram também um procedimento de imobilização suave, utilizando vapor de glutaraldeído, que resulta na formação de um fino filme enzimático como alta atividade específica.

A principal limitação prática dos biossensores colinesterase aplicados na determinação de pesticidas OF e CB é o elevado custo das enzimas e o fato das medidas de inibição limitarem o uso do biossensor em no máximo 10 a 15 medidas, independente da estabilidade da enzima imobilizada. Tal fato torna necessária a reativação constante da enzima, afetando, portanto, o tempo, o custo e a reprodutibilidade das análises [77]. A imobilização das enzimas em membranas comerciais como nylon, nitrato ou acetato de celulose, as quais podem ser estocadas e adaptadas, quando necessário, em qualquer tipo de sensor eletroquímico contorna em parte esses problemas [66-68]. Outro procedimento bastante utilizado para contornar a limitação prática dos biossensores colinesterase é o uso de sensores impressos em cerâmica, na superfície dos quais é feita a imobilização direta da enzima [63,89,90]. Esses biossensores são de baixo custo e podem ser descartados após a análise, evitando-se, assim, a necessidade da reativação da enzima colinesterase inibida.

De acordo com Ivanov et al [77], a imobilização direta da enzima na superfície do sensor eletroquímico, na forma de filmes muito finos, sob condições que asseguram a alta atividade catalítica da enzima e a menor difusão dos produtos da reação enzimática, do filme imobilizado para a solução, contribuem para a resposta mais rápida e maior sensibilidade do biossensor para detectar pequenas variações nas quantidades de ácido acético produzida. Por outro lado, a imobilização direta na superfície do eletrodo tem como principal limitação a perda gradual da atividade da enzima, ao longo das análises. A aplicação desses biossensores na determinação de substâncias que inibem a atividade da enzima colinesterase como, por exemplo, os pesticidas organofosforados e carbamatos

limita mais ainda o número de determinações que podem ser realizadas pelo biossensor, pois a reativação da atividade da enzima por meio de reagentes específicos recupera somente parcialmente a atividade da enzima.

Nesse contexto, os biossensores baseados no uso de sensores eletroquímicos de baixo custo, como os impressos em cerâmica, apresentam as vantagens da imobilização direta da enzima na superfície do eletrodo e, pelo fato de serem de baixo custo, podem ser descartados após a análise, evitando-se, assim, a necessidade da reativação da enzima colinesterase inibida.

1.7 – Justificativas e Objetivos do Trabalho

A maioria dos biossensores de AChE descritos na literatura utilizam o eletrodo de vidro convencional para medir a quantidade de ácido acético formado na hidrólise enzimática da acetilcolina. Os principais problemas atribuídos ao uso do eletrodo de vidro nessas determinações são a fragilidade, a dificuldade de miniaturizar e o custo do eletrodo de vidro, que inviabiliza o seu uso como eletrodos descartáveis. Esse último problema dificulta a preparação de biossensores potenciométricos pela imobilização direta da enzima na superfície do eletrodo, que oferece a maior sensibilidade para detectar pequenas variações de pH provocadas pela reação enzimática [77].

Os eletrodos de óxidos metálicos ou metal-óxidos representam uma alternativa aos eletrodos de vidro, para a medida de pH, pois apresentam vantagens como baixo custo, principalmente quando preparados na forma de filmes finos, são mecanicamente robustos e podem tolerar operações em ambientes agressivos e em altas temperaturas [91]. A facilidade da preparação de eletrodos de óxidos metálicos na forma de filmes finos favorece o emprego desses eletrodos como transdutores de biossensores potenciométricos de baixo custo, pois quantidades de enzimas bem pequenas podem ser diretamente imobilizadas na superfície desses eletrodos.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o uso de um eletrodo de filme de RuO_2 , imobilizado na superfície de titânio metálico (Ti) como transdutor potenciométrico de um biossensor AChE. A enzima AChE foi imobilizada diretamente na superfície do eletrodo de RuO_2 , segundo procedimento proposto por Ivanov et al [77].

Investigações da resposta do biossensor foram realizadas em função do pH e da concentração de ácido acético na solução, da concentração de acetilcolina, do pH e da concentração da solução tampão fosfato. Estudos da inibição do biossensor pelo metil paration foram conduzidos com a finalidade de propor o uso desse biossensor na determinação de pesticidas totais (OF e/ou CB) em águas ou nos extratos orgânicos obtidos de amostras de alimentos.

Capítulo 2:

PARTE EXPERIMENTAL

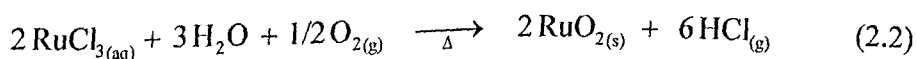
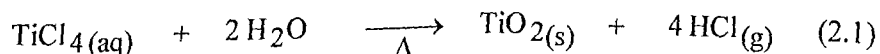
2.1 – Reagentes e Soluções

Todas as soluções estoque foram preparadas com água deionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Milli-Q_{Plus}) a partir de quantidades adequadas do reagente, grau PA. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho.

2.1.1 – Solução padrão de TiCl_4 e RuCl_3

As soluções de TiCl_4 e RuCl_3 foram preparadas com concentração aproximada de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, a partir dos sais precursores: TiCl_4 (Ventron), e $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich). Transferiu-se a massa desejada para um balão volumétrico apropriado. Em seguida, adicionou-se HCl (Nuclear, PA) em 1:1 (v/v), até obter total dissolução do sal e completar todo o volume do balão. A elevada acidez da solução é necessária para evitar a hidrólise dos precursores.

A padronização das soluções de TiCl_4 e RuCl_3 foram realizadas usando-se o procedimento termogravimétrico. Uma alíquota de 1,00 mL da solução precursora foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente limpo e aferido. Em seguida, evaporou-se o solvente sob temperatura de $80\text{-}90^\circ\text{C}$ utilizando-se uma chapa de aquecimento (Quimis). O resíduo foi calcinado em mufla (Fornite-Modelo Coel), mantida a 450°C , até massa constante. As reações globais de decomposição das substâncias precursoras são:



A partir das massas dos óxidos de TiO_2 e RuO_2 , calculou-se as seguintes concentrações para as soluções precursoras, que foram as seguintes:

$$[\text{RuCl}_3] = 0,200 \text{ mol L}^{-1}$$

$$[\text{TiCl}_4] = 0,183 \text{ mol L}^{-1}$$

Com o objetivo de se obter soluções de RuCl_3 e TiCl_4 em concentrações equimolares, uma alíquota de 9,2 mL de RuCl_3 $0,200 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada a um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com solução de HCl 1:1 (v/v). Esse procedimento facilitou o preparo dos eletrodos, pois a composição da camada de óxido pode ser obtida pela mistura das soluções precursoras nas proporções exigidas pela composição da camada ativa.

2.1.2 – Soluções tampão Ácido Cítrico - Citrato de Sódio

As soluções tampão no pH desejado foram preparadas misturando-se alíquotas das respectivas soluções de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e de citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, após a correção do pH, completando-se o volume com água deionizada.

A solução de citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 13,8000 g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, P.A-Merck) em água e completando-se o volume para 500 mL. A solução de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 10,5000 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, P.A-Merck) em água e completando-se o volume para 500 mL.

2.1.3 – Soluções Tampão Ácido Cítrico - Fosfato de Sódio

As soluções tampão foram preparadas em pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 misturando-se alíquotas das respectivas soluções de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrogenofosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e, após a correção do pH, completou-se o volume para 100 mL com água deionizada.

A solução de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 10,5000 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, P.A – Merck), em água e completando-se o volume para 500 mL. A solução de hidrogenofosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 35,8000 g de hidrogenofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada e completando-se o volume para 500 mL.

2.1.4 – Solução de Albumina de Soro Bovino 1% m/v (ASB)

Pesou-se 0,2500 g de albumina de soro bovino (Sigma) e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se solução tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 completando o volume para 25 mL.

2.1.5 – Solução de Cloreto de Acetilcolina

Transferiu-se 0,0908 g de cloreto de acetilcolina (Sigma, 99%) para um balão volumétrico e completou-se o volume para 50 mL com água deionizada para obtenção de cloreto de acetilcolina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.1.6 – Solução de Glutaraldeído

Transferiu-se 22,1238 mL de solução de glutaraldeído 50% v/v (Across Organics, densidade = $1,13 \text{ g mL}^{-1}$) para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água deionizada para obtenção de glutaraldeído 12,5% (v/v).

2.1.7 – Solução de Metil Paration

Preparou-se uma solução estoque de Metil Paration (Rudel de Haën) $6,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila (VETEC), que foi mantida em refrigeração. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição desta solução.

2.1.8 – Solução Cloreto de 2-aldoxima-N-metilpirodônio

Transferiu-se 0,2090 g do reagente Pyridin-2-aldoxim-1-methochloride ($\text{C}_7\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}$, 99%) e completou-se o volume para 50 mL para obtenção da solução $0,0240 \text{ mol L}^{-1}$.

2.2 – Eletrodos à Base de Óxido de Rutênio

2.2.1. Preparação do Eletrodo

Os eletrodos de composição nominal $\text{Ru}_{(x)}\text{Ti}_{(1-x)}\text{O}_2$ foram preparados por decomposição térmica dos sais precursores [92]. Na preparação dos eletrodos de óxido de rutênio, trabalhou-se com uma espessura nominal da camada ativa do óxido equivalente a 2 μm . A massa de óxido aplicada foi calculada levando-se em consideração o volume da camada ativa (V) correspondente a uma espessura de 2 μm aplicada em ambos os lados do suporte de Ti metálico, a porcentagem de cada óxido e as densidades (d) de RuO_2 e de TiO_2 , utilizando-se a equação abaixo:

$$\text{massa (g)} = V \text{ (mL)} \times [\% \text{RuO}_2 \cdot d_{\text{RuO}_2} + \% \text{TiO}_2 \cdot d_{\text{TiO}_2}] \text{ (g mL)} \quad (2.3)$$

As densidades dos respectivos óxidos foram tomadas como sendo [91]:

$$d_{\text{RuO}_2} = 7,01 \text{ g.mL}^{-1} \quad d_{\text{TiO}_2} = 4,21 \text{ g.mL}^{-1}$$

O volume total do óxido a ser depositado é calculado a partir da área versus espessura desejada. Foram utilizados suportes de área geométrica de 0,50 e 2,0 cm^2 . Para o eletrodo de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$, obteve-se, em média, as massas de 1,00 mg e 4,04 mg para os suportes de área geométrica 0,50 e 2,0 cm^2 , respectivamente. Para o eletrodo de composição nominal $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ foram depositadas massas de óxido de 1,40 mg e 5,60 mg em média para os suportes de área geométrica 0,50 e 2,0 cm^2 , respectivamente.

Os eletrodos de óxidos de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$ e $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ foram preparados sobre suporte de Ti metálico de áreas geométricas iguais a 0,50 cm^2 e 2,00 cm^2 . O filme de óxido foi obtido pela decomposição térmica, a 450 $^\circ\text{C}$, de misturas precursoras de RuCl_3 e TiCl_4 , ambas em concentração iguais a 0,183 mol L^{-1} em HCl 1:1 v/v [92]. Inicialmente, os suportes de Ti metálicos foram limpos em isopropanol. Posteriormente,

colocados em solução fervente de ácido oxálico a 10% m/v por 10 min e em seguida lavado com água deionizada. Após esse tratamento de limpeza e seco, pesou-se o suporte metálico em balança analítica (OHAUS, Analytical Standard).

Em seguida, aplicou-se o mais rapidamente possível, por pincelamento, a mistura das soluções precursoras de TiCl_4 e RuCl_3 , na proporção de 30:70 v/v, para a obtenção do eletrodo de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$.

Evaporou-se o solvente sob fluxo de ar quente ($80 - 90^\circ\text{C}$) e calcinou-se o resíduo à 450°C durante 5 min. Após resfriamento, pincelou-se novamente a mistura das soluções precursoras, evaporou-se o solvente e levou a calcinação por 5 min.

Repetiu-se esse procedimento por mais duas vezes. Finalmente, o suporte foi calcinado, por 1h, sob fluxo de ar atmosférico, à 450°C . Após resfriamento, o suporte foi pesado.

Para a obtenção do eletrodo de composição nominal $\text{Ru}_{(01)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$, usou-se o mesmo procedimento, porém empregou-se a solução precursora de RuCl_3 $0,183\text{ mol L}^{-1}$.

2.2.2 - Montagem do Eletrodo

Após a imobilização do óxido de rutênio no suporte de Ti metálico fez-se o contato elétrico com um fio de cobre (Figura 9). O contato elétrico Cu-Ti foi melhorado utilizando-se pasta de carbono, o qual foi mantido sobre a junção Cu-Ti por meio de *parafilm*. O conjunto foi colocado em um tubo de vidro de 4,0 mm de diâmetro interno e 12,0 cm de comprimento e a extremidade interior foi vedada com cola silicone.

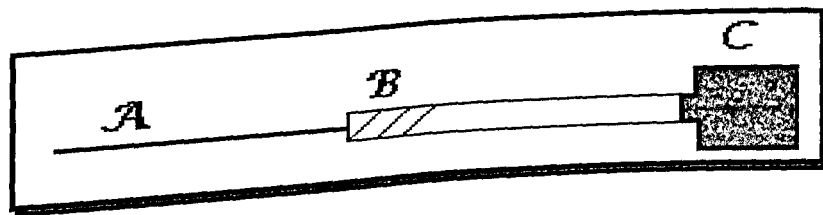


Figura 9: Esquema representativo do eletrodo de trabalho. A: fio de cobre; B: tubo de vidro de $\Phi_i = 4,0\text{ mm}$ e $10,0\text{ cm}$ de comprimento; C: camada ativa do óxido de RuO_2 (áreas de $0,50$ e $2,0\text{ cm}^2$) sobre suporte de Ti metálico.

2.3 – Preparação do Eletrodo de Referência

2.3.1 - Eletrodo de referência com capilar de Luggin

O eletrodo de Ag/AgCl foi obtido por eletrodeposição de AgCl na superfície de um fio de Ag, utilizando-se a célula eletrolítica como mostra a Figura 10. Para a eletrodeposição foi utilizado um fio de Ag e um fio de Pt, como anodo e catodo, respectivamente, e uma solução de cloreto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A eletrodeposição de AgCl no anodo de Ag foi realizada sob corrente constante de 1 mA, durante 2 h, utilizando-se o Potenciostato-Galvanostato PAR-M-270.

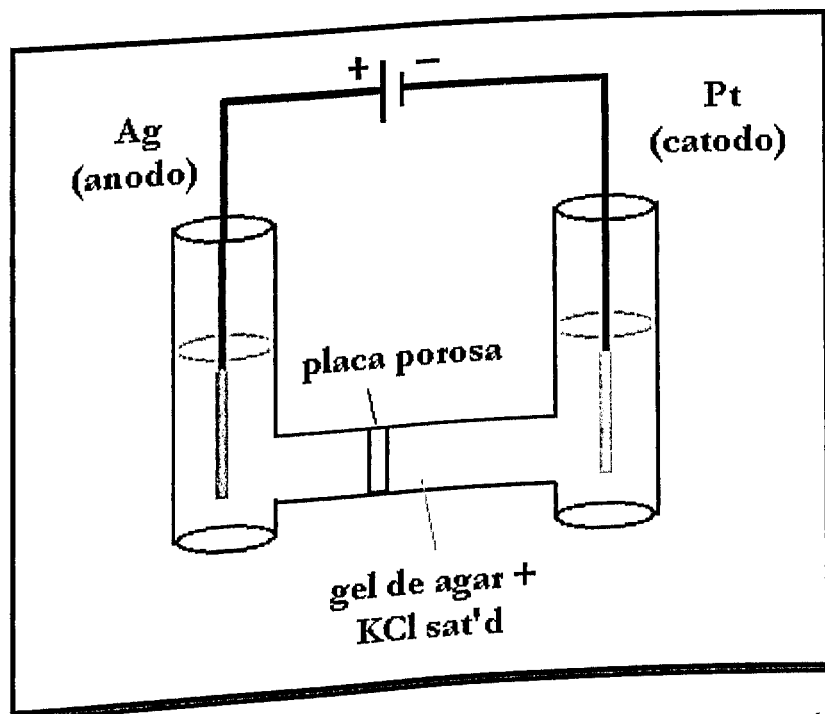


Figura 10: Representação esquemática da célula eletrolítica empregada para a eletrodeposição de AgCl sobre o fio de Ag. Solução eletrolítica: KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Terminada a eletrodeposição, o fio de Ag/AgCl foi colocado no interior de um tubo de vidro ($\Phi_i = 6,0 \text{ mm}$), que apresentava a sua extremidade inferior alongada, tipo capilar

de Luggin, vedado com caulim sinterizado. O tubo de vidro foi preenchido com uma solução de cloreto de potássio $3,00 \text{ mol L}^{-1}$, saturada com AgCl. A Figura 11 mostra o esquema do eletrodo obtido, que foi usado como eletrodo de referência.

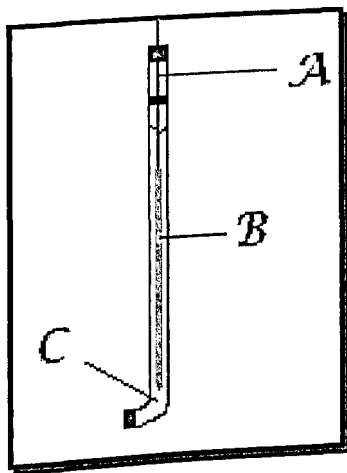


Figura 11: Representação esquemática do eletrodo de referência com capilar de LUGGIN. A: fio de prata, b: fio de Ag/AgCl, C: solução de KCl $3,00 \text{ mol L}^{-1}$, saturada com AgCl.

Após a preparação do eletrodo de referência o potencial do mesmo foi medido em relação ao Eletrodo Reversível de Hidrogênio, ERH, utilizando-se o equipamento ECOCHÉMIE PGSTAT 20, preparado conforme procedimento usado por De Faria et al. [92]. Os eletrodos foram colocados numa célula contendo cerca de 100 mL de solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O ERH foi mantido como referência e o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,00 \text{ mol L}^{-1}$) preparado foi considerado como eletrodo de trabalho. A medida do potencial da célula forneceu um valor de 0,28 V em relação ao ERH. Deve-se ressaltar que o ERH tem potencial ao redor de 30 mV em relação ao ENH.

2.3.2- Eletrodo de referência para as investigações do biossensor potenciométrico

Esse eletrodo de Ag/AgCl (Figura 12) foi preparado pela eletrodeposição de AgCl na superfície de uma lâmina de Ag metálica, de 5,0 mm x 7,0 mm, utilizando-se a célula eletrolítica da Figura 10, nas mesmas condições experimentais usadas para a obtenção do

eletrodo de referência com capilar de Luggin. Após a eletrodeposição, fez-se o contato elétrico do eletrodo com um fio de cobre preso, segundo procedimento usado na montagem do eletrodo de óxido rutênio.

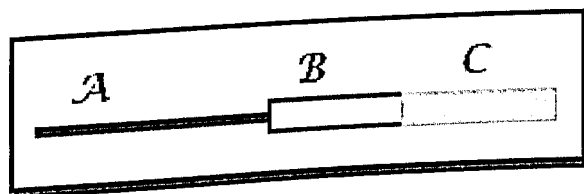


Figura 12: Esquema representativo do eletrodo de referência Ag/AgCl A: fio de cobre; B: contato cobre-Ag; C: filme de AgCl.

Após a preparação do eletrodo de referência, o potencial do mesmo foi medido, usando o Eletrodo Reversível de Hidrogênio do mesmo modo já citado no preparo do eletrodo de referência com capilar de Luggin.

2.4 - Comportamento Eletroquímico do eletrodo de Óxido de Rutênio (RuO_2)

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de RuO_2 foram investigados por voltametria cíclica, em função da concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4), empregando-se o equipamento Potenciostato Galvanostato PAR M-270. Um fio de Pt e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,00 mol L^{-1}) foram usados como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente. Os voltamogramas cíclicos (VCs) foram obtidos na faixa de - 0,45 a 0,90 V vs Ag/AgCl (KCl 3,00 mol L^{-1}) empregando-se velocidade de varredura do potencial igual a 0,025 V s^{-1} [93].

2.5 – Resposta potenciométrica dos eletrodos de RuO_2

2.5.1 – Em função da concentração de ácido acético, em KNO_3 0,1 mol L^{-1}

A resposta potenciométrica dos eletrodos de RuO_2 de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$ (RuO_2 30%) e $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ (RuO_2 100%) foi estudada em soluções de ácido

acético $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de concentrações crescentes e decrescentes, tendo o KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, como eletrólito suporte. Os experimentos foram conduzidos numa célula de 20 mL (Figura 13).

As medidas potenciométricas foram realizadas com o pH metro Analion Modelo PM 608, empregando-se como eletrodo de referência o Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), com capilar de Luggin. Para as medidas, transferiu-se 10 mL de solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para a célula eletroquímica junto aos eletrodos de RuO_2 30% e de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Com o sistema em agitação, mediu-se o potencial da célula ($E_{\text{célula}}$) da solução do eletrólito suporte (KNO_3). Medidas do $E_{\text{célula}}$ foram realizadas após a adição de alíquotas crescentes de solução de ácido acético $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e estabilização do sinal (2,0 min). Procedimento análogo foi conduzido com o eletrodo de RuO_2 100%. O estudo da resposta de ambos os eletrodos de RuO_2 em função da concentração decrescente de ácido acético foi realizado de forma semelhante, porém, após a adição de cada alíquota da solução de ácido acético e leitura do $E_{\text{célula}}$, a célula e os eletrodos eram lavados com água deionizada.

Foi também observado nos experimentos, o efeito da concentração do eletrólito suporte e o efeito da área dos eletrodos em estudo.

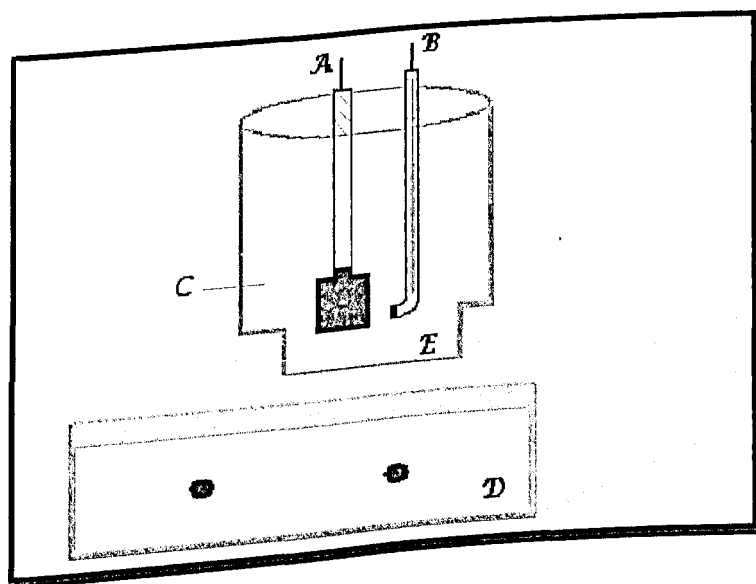


Figura 13: Esquema da célula eletroquímica. A: Eletrodo de RuO_2 ; B: Eletrodo de referência Ag/AgCl com capilar de Luggin; C: Solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; D: Agitador magnético; E: Barra magnética.

2.5.2 - Em função do pH da solução

A investigação da resposta dos eletrodos de RuO_2 em função do pH procedeu-se na célula eletroquímica da Figura 13, tendo como eletrodo de referência o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), com capilar de Luggin. Para esse estudo utilizou-se 10 mL das soluções tampão de ácido cítrico/citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de pH de 2,0 a 6,0. Com o sistema em agitação, realizou-se as medidas potenciométricas com o pHmetro Analion, modelo PM 608, após a estabilização do sinal (2 min). Após cada medida, a célula e o sistema de eletrodos eram lavados com água deionizada e solução tampão sob estudo.

2.5.3 - Em função da concentração de ácido acético, em solução tamponada

A resposta do eletrodo de RuO_2 100% em função da concentração de ácido acético $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi realizada empregando-se soluções tampão fosfato $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, como eletrólito suporte. Esse estudo foi conduzido utilizando-se a mesma célula eletroquímica, sistema de eletrodos e equipamento empregados nas investigações anteriores.

2.6 – Preparação do biossensor potenciométrico à base de eletrodo de RuO_2 e enzima acetilcolinesterase (AChE)

Para a construção do biossensor potenciométrico foi utilizado o eletrodo de RuO_2 100% de área geométrica de $0,5 \text{ cm}^2$. Para a imobilização da enzima, misturou-se 20 μL de solução de enzima AChE (30 U) e 10 μL de solução BSA 1,0% m/v, ambos solução tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após homogeneização, espalhou-se, uniformemente, essa solução sobre a superfície do eletrodo de RuO_2 . O eletrodo foi colocado para secar durante 30 min, à temperatura ambiente. Após seco, o eletrodo com a enzima imobilizada (biossensor) foi colocado numa atmosfera saturada com vapor de glutaraldeído, produzido a partir da respectiva solução à 12,5 % v/v, à temperatura de 37°C , durante 5 min [77].

Transcorrido esse tempo, retirou-se o biossensor e lavou-o com água deionizada e solução tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em pH 7,0. O biossensor foi colocado em solução tampão fosfato e guardado na geladeira ou guardado no freezer, no estado seco, até o uso.

2.7 – Investigações do eletrodo de RuO_2 como transdutor potenciométrico de biossensores à base de AChE

2.7.1 – Célula potenciométrica utilizada

Para investigar a potencialidade do eletrodo de RuO_2 como transdutor potenciométrico de biossensores à base da enzima acetilcolinesterase, construiu-se uma célula eletroquímica em placa de acrílico nas seguintes dimensões: 4,0 cm de comprimento x 1,5 cm de largura x 0,5 cm de altura (Figura 14). Na base dessa célula foram fixados o eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mm x 7,0 mm) e o eletrodo de RuO_2 (5,0 mm x 5,0 mm), para acompanhar o ácido acético produzido na reação de hidrólise do cloreto de acetilcolina, catalisada pela enzima AChE livre. Os estudos com o biossensor foram realizados nessa mesma célula, substituindo-se o eletrodo de RuO_2 pelo biossensor potenciométrico.

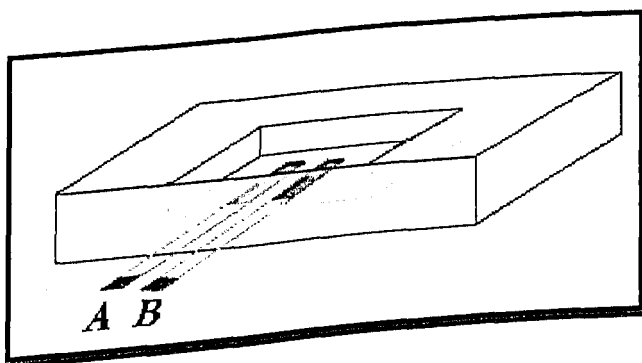


Figura 14: Esquema da célula eletroquímica (4,0 x 15 x 0,5 cm). A: eletrodo RuO_2 ou eletrodo de RuO_2/AChE (biossensor potenciométrico) de $0,5 \text{ cm}^2$ de área; B: eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 x 7,0 mm). Temperatura de trabalho = 25 °C.

2.7.2 – Resposta do eletrodo de RuO_2 para o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina, catalisada pela enzima AChE livre

No estudo foram empregados os eletrodo de RuO_2 100% e o eletrodo de Ag/AgCl ($3,0 \times 7,0$ mm) e 500 μL de solução tampão fosfato $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após a medida do E_{celula} , adicionou-se 25 μL de solução de cloreto de acetilcolina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e então, 30 μL de solução contendo enzima AChE (237 Unidades) e BSA 0,35% v/v. O momento da adição da enzima AChE foi considerado como tempo zero. Os valores de E_{celula} foram monitorados em função do tempo até atingir um valor estável.

2.7.3 - Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração da solução tampão fosfato

Nesse estudo foram utilizadas soluções tampão fosfato em diferentes concentrações: 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 50,0 e $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, todas mantidas em pH 7,0 contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A resposta do biossensor foi acompanhada pela variação do E_{celula} de uma alíquota de 500 μL de cada solução tampão, após a adição de 25 μL da solução de cloreto de acetilcolina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas potenciométricas foram realizadas em triplicata, após a estabilização do E_{celula} . Antes de cada medida, o biossensor foi lavado com água deionizada e solução tampão em estudo.

2.7.4 – Resposta do biossensor potenciométrico em função do pH da solução tampão

Nesse estudo foi realizado utilizando-se soluções tampão fosfato de $1,0 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ambas as soluções contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nos seguintes pH 6,5; 6,8; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0.

A resposta do biossensor foi acompanhada pela variação do E_{celula} de uma alíquota de 500 μL de cada solução tampão, após a adição de 25 μL da solução de cloreto de acetilcolina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas potenciométricas foram realizadas em triplicata, após

a estabilização do E_{celula} . Antes de cada medida, o biossensor foi lavado com água deionizada e solução tampão de estudo.

2.7.5 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de acetilcolina

O estudo foi realizado utilizando-se soluções tampão fosfato $1,0 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , ambas em pH 7,3 e contendo KCl $0,1$ mol L^{-1} . A resposta do biossensor foi acompanhada pela variação do E_{celula} de uma alíquota de $500 \mu L$ de cada solução tampão, após a adição de alíquotas de solução de cloreto de acetilcolina, nas seguintes concentrações: $1,0 \times 10^{-4}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $8,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; $8,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $3,0 \times 10^{-2}$; $8,0 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ mol L^{-1} .

As medidas potenciométricas em cada concentração de cloreto de acetilcolina foram realizadas em triplicata, após a estabilização do E_{celula} . Antes de cada medida, o biossensor foi lavado água deionizada e solução tampão de estudo.

2.8 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de metil paration

Essa investigação foi acompanhada pela inibição da enzima AChE imobilizada no biossensor potenciométrico, utilizando-se o procedimento descrito a seguir. Mediu-se o E_{celula} de $500 \mu L$ de uma solução de cloreto de acetilcolina $0,01$ mol L^{-1} em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , pH 7,3 contendo KCl $0,1$ mol L^{-1} . Em seguida, o biossensor foi cuidadosamente lavado com água deionizada e colocado em contato com 10 mL de solução aquosa de metil paration $1,5 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} , durante 15 min. Após esse tempo, o biossensor foi retirado da solução, lavado e colocado em $500 \mu L$ de uma solução de cloreto de acetilcolina $0,01$ mol L^{-1} em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , pH 7,3 contendo KCl $0,1$ mol L^{-1} . Após estabilização, o respectivo E_{celula} foi medido. Esse procedimento foi repetido para as demais soluções de metil paration, até concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

A resposta de inibição (I) do biossensor foi calculado pela diminuição da resposta potenciométrica, utilizando-se a expressão 2.4:

$$I = E_0 - E_i \quad (2.4)$$

onde, E_0 e E_i são respostas potenciométricas antes e após contato com a solução do pesticida, respectivamente.

Após as medidas de inibição, realizou-se a reativação da enzima AChE imobilizada na superfície do eletrodo, utilizando-se a solução cloreto de 2-aldoxima-N-metil-piridônio em concentração de $0,024 \text{ mol L}^{-1}$. O biossensor foi mantido nessa solução durante 10 min. Após o tratamento, lavou-o com água deionizada e solução tampão. Todas as medidas foram realizadas em duplicata. A solução de metil paration usada nesta investigação era preparada antes do uso.

Capítulo 3:

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Considerações sobre o comportamento eletroquímico dos eletrodos de óxido de rutênio (RuO_2)

Com a finalidade de entender o comportamento eletroquímico dos eletrodos de RuO_2 de composições nominais $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$ (RuO_2 30%) e $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ (RuO_2 100%), preparados conforme procedimento descrito no item 2.2.1, obteve-se os voltamogramas cíclicos (VCs) desses eletrodos, em soluções de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 15 estão apresentados os VCs obtidos para os respectivos eletrodos, em solução de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se pelos VCs a dependência da corrente com a % de RuO_2 no eletrodo e a existência de quatro processos redox, um na região de $0,35$ a $-0,1 \text{ V}$ e outro na região de $+0,3$ a $+0,8 \text{ V}$ vs Ag/AgCl .

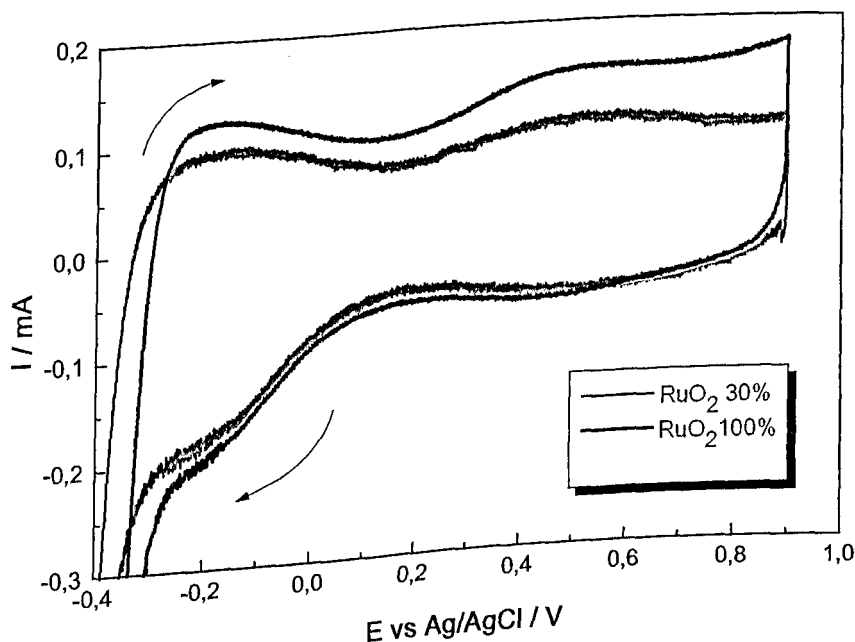
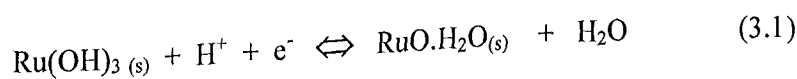


Figura 15: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de composição nominal $\text{Ru}_{(0,3)}\text{Ti}_{(0,7)}\text{O}_2$ e $\text{Ru}_{(1)}\text{Ti}_{(0)}\text{O}_2$ em ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Área geométrica do suporte de Ti = $0,50 \text{ cm}^2$. Velocidade de varredura = $0,025 \text{ V s}^{-1}$.

O comportamento eletroquímico apresentado na Figura 15 está em concordância com o esperado da literatura [94,95] para eletrodos de $\text{TiO}_2 + \text{RuO}_2$ em solução ácida. De

acordo com a literatura [95], os picos largos observados entre as evoluções de H_2 e de O_2 , podem ser interpretados como uma variação do estado de oxidação do Ru, desde + 2 até + 6.

De acordo com a literatura, o processo eletroquímico presente na região de potencial de - 0,1 a - 0,35 V é atribuído à transição de estado sólido envolvendo o par redox $Ru^{(III)}/Ru^{(II)}$ [95], é escrito de acordo com a equação 3.1:

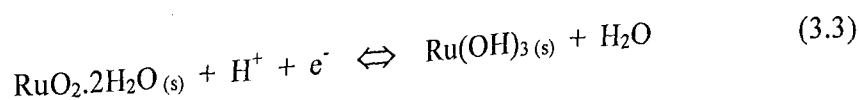


A equação de Nernst para o processo envolvendo a transição de estado sólido $Ru^{III} \rightarrow Ru^{II}$ é apresentada na equação 3.2:

$$E_{Ru(III)/Ru(II)} = E^0_{Ru(III)/Ru(II)} - 0,0591 \log \left(\frac{a_{Ru(II)}}{a_{Ru(III)}} \right) - 0,0591 \text{ pH} \quad (3.2)$$

sendo, $E_{Ru(III)/Ru(II)}$, o potencial do par redox nas condições da medida e $E^0_{Ru(III)/Ru(II)}$, o potencial padrão do par $Ru^{(III)}/Ru^{(II)}$ e $a_{Ru(III)}$ e $a_{Ru(II)}$, as atividades dos sítios de $Ru^{(III)}$ e $Ru^{(II)}$ na camada de óxido superficial.

O processo redox na região de + 0,2 a + 0,8 V é atribuído à transição redox do par $Ru^{(IV)}/Ru^{(III)}$. Segundo o diagrama de Pourbaix [94], o equilíbrio envolvido entre os óxidos de Ru^{IV} e Ru^{III} pouco solúveis, presentes no filme de óxido é dado de acordo com a equação 3.3:



onde, $RuO_2.2H_2O$ é a composição nominal do dióxido de rutênio hidratado e $Ru(OH)_3$ é o sesquióxido de rutênio hidratado, também escrito como $Ru_2O_3.3H_2O$.

Em analogia, a equação de Nernst para o processo envolvendo a transição de estado sólido $\text{Ru}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{III}}$ pode ser escrita conforme equação 3.4:

$$E_{\text{Ru(IV)/Ru(III)}} = E_{\text{Ru(IV)/Ru(III)}}^0 - 0,0591 \text{ pH} \quad (3.4)$$

sendo $E_{\text{Ru(IV)/Ru(III)}}$, o potencial do par redox nas condições da medida e $E_{\text{Ru(III)/Ru(II)}}^0$, o potencial padrão formal do par $\text{Ru}^{\text{(IV)}}/\text{Ru}^{\text{(III)}}$ na camada de óxido superficial.

Segundo Pourbaix [94], o potencial do par $\text{Ru}^{\text{(IV)}}/\text{Ru}^{\text{(III)}}$ vs ENH, a 25°C, é dado pela equação 3.5:

$$E_{\text{Ru(IV)/Ru(III)}} = 0,0937 - 0,0591 \text{ pH} \quad (3.5)$$

As equações das reações 3.1 e 3.3 mostram que as respectivas transições redox devem envolver a adição ou a subtração de H^+ ou OH^- . De acordo com Grazioli e colaboradores [96], a transição $+3 \rightarrow +2$ deve ser assistida pela penetração de prótons em quantidades muito elevadas.

De acordo com as expressões de Nernst, 3.2 e 3.4, os potenciais devido às transições $\text{Ru}^{\text{III}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{II}}$ e $\text{Ru}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{III}}$ dependem do pH da solução. Os respectivos potenciais deslocam-se para valores mais negativos à medida que a atividade de H^+ é diminuída. Estudos realizados por Martins e Albuquerque [93] mostraram que os eletrodos de RuO_2 30% e RuO_2 100%, preparados conforme procedimento descrito no item 2.2.1, apresentam comportamento eletroquímico fortemente dependente da concentração de ácido sulfúrico da solução, seja com relação ao potencial da transição $\text{Ru}^{\text{(III)}}/\text{Ru}^{\text{(II)}}$ e $\text{Ru}^{\text{(IV)}}/\text{Ru}^{\text{(III)}}$, como em relação às magnitudes das correntes de oxidação e de redução dos respectivos processos.

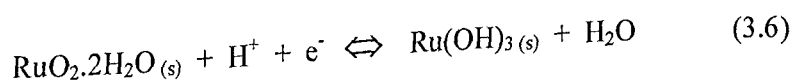
3.2 – Potencial de equilíbrio dos eletrodos de RuO_2 e efeito do pH da solução

O potencial de equilíbrio dos eletrodos de RuO_2 30% e RuO_2 100% foram obtidos inicialmente em solução aquosa de KNO_3 0,1 mol L^{-1} , como eletrólito suporte, empregando-se como eletrodo de referência o Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}). O valor do

potencial de equilíbrio é muito útil, pois indica qual equilíbrio prevalece na camada de óxido superficial do eletrodo.

A medida deste potencial dos eletrodos de RuO₂ 30% e RuO₂ 100% forneceram valores de 345 e 278 mV vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), respectivamente. Esses valores estão em concordância com os valores de potencial esperados dos VCs apresentados na Figura 15 e da equação de Nernst (3.5), para a transição de estado sólido do par Ru^(IV)/Ru^(III).

Segundo a literatura, a maioria dos compostos de Ru encontra-se, na presença de oxigênio, na valência + 4, como RuO₂, exceto em soluções alcalinas, que apresentam o estado + 6 como o mais estável [94]. De acordo com Trasati & Lodi [95], a reação 3.4 é a responsável pelo potencial de equilíbrio dos eletrodos de RuO₂:



Deve-se ressaltar, entretanto, que tal equilíbrio envolve os respectivos óxidos de Ru(IV) e Ru(III) hidratados. Essa dependência pode ser explicada considerando-se as propriedades superficiais dos óxidos de Ru(IV) e de Ru(III) em soluções aquosas. Os referidos óxidos possuem um forte caráter hidrofílico e quando interagem com a água, as moléculas do solvente ligam-se aos cátions metálicos (que se comportam como ácido de Lewis), envolvendo, geralmente, a transferência de um próton para o oxigênio vizinho ao sítio ativo. Desse modo, a superfície do óxido fica recoberta por um "tapete" de grupos OH⁻, os quais atuam como intermediários nas interações entre as espécies em solução e os sítios ativos do óxido [97].

Considerando a participação dos óxidos hidratados, os potenciais de equilíbrio dos respectivos eletrodos foram medidos após manter os eletrodos imersos na solução do eletrólito suporte durante tempo necessário para a hidratação da camada de óxido e estabilização do potencial do eletrodo. Um período de 24 hs foi necessário antes de iniciar as medidas.

A dependência do E do eletrodo com a concentração de H⁺ da solução foi investigada na faixa de pH 2,0 a 8,0, utilizando-se dois tipos de soluções tampão, preparadas a partir de ácido cítrico/citrato de sódio e ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio. Os respectivos valores de E do eletrodo obtidos em relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) estão apresentados nas Figura 16 e Figura 17.

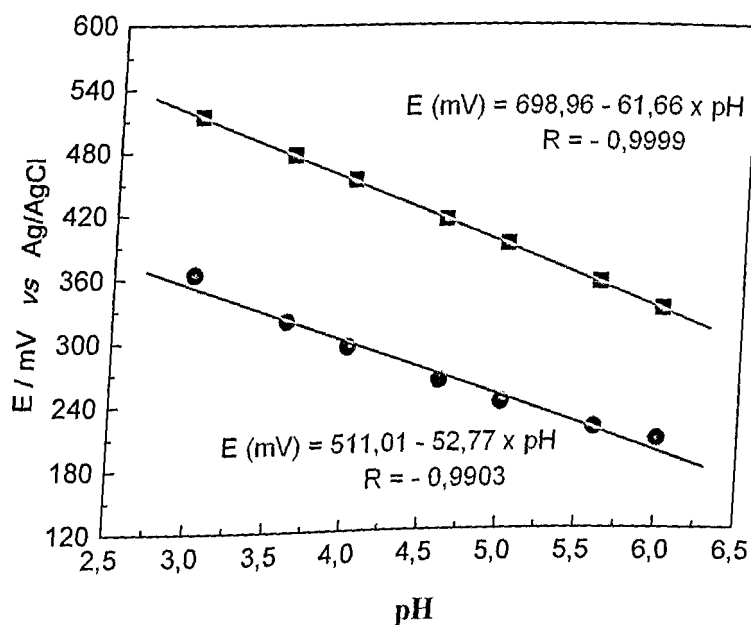


Figura 16: Resposta dos eletrodos de (●) RuO₂ 100 % e (■) RuO₂ 30 % em função do pH da solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Temperatura: 25 °C.

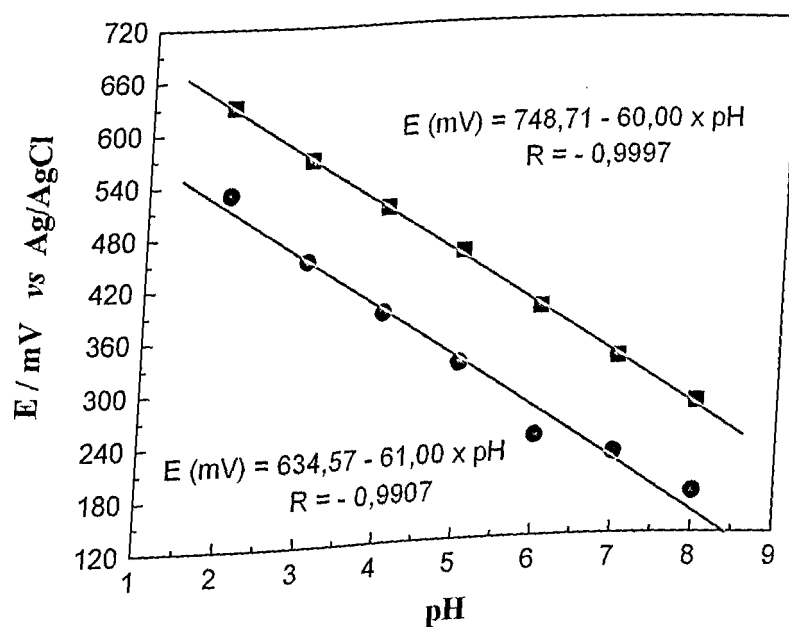


Figura 17: Resposta dos eletrodos de (●) RuO₂ 100 % e (■) RuO₂ 30 % em função do pH da solução tampão ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio 0,2 mol L⁻¹. Eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Observa-se nas Figura 16 e Figura 17 uma relação linear entre o potencial da célula e o pH da solução. A inclinação das retas forneceu um valor próximo de 60 mV para as medidas realizadas em solução tampão ácido cítrico, fosfato de sódio. Devido à maior facilidade para a preparação do eletrodo de RuO_2 100%, esse foi o escolhido para as investigações realizadas com o biossensor.

3.3 – Avaliação da resposta dos eletrodos de RuO_2 para ácido acético

3.3.1 - Em eletrólito suporte KNO_3

Com a finalidade de verificar se os eletrodos de RuO_2 30% e 100% podem ser utilizados como transdutores potenciométricos de biossensores AChE, investigou-se o comportamento dos respectivos eletrodos em contato com soluções aquosas de ácido acético, em diferentes concentrações. Para tanto, mediu-se a mudança do potencial do eletrodo em função da variação da concentração de ácido acético, no sentido crescente e decrescente, tendo KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Os resultados desse estudo estão apresentados na Figura 18 e Figura 19.

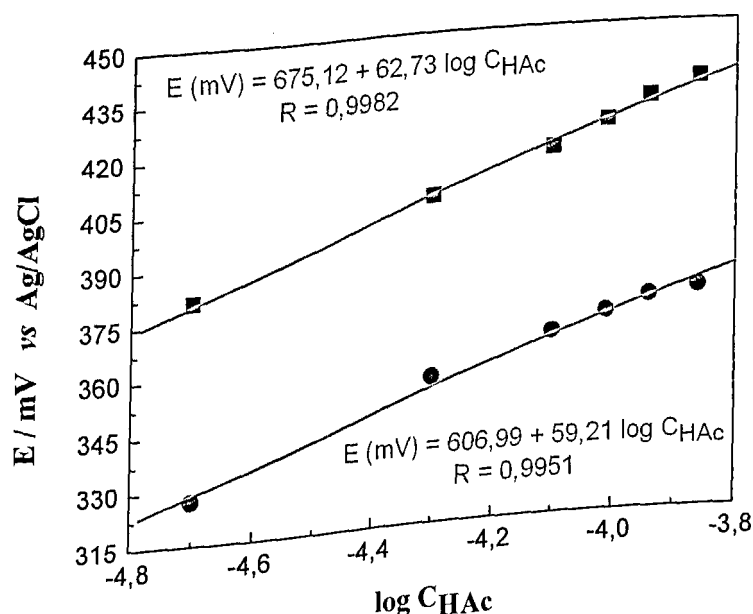


Figura 18: Resposta dos eletrodos de (●) RuO_2 100 % e (■) RuO_2 30 % em função da concentração crescente de ácido acético. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

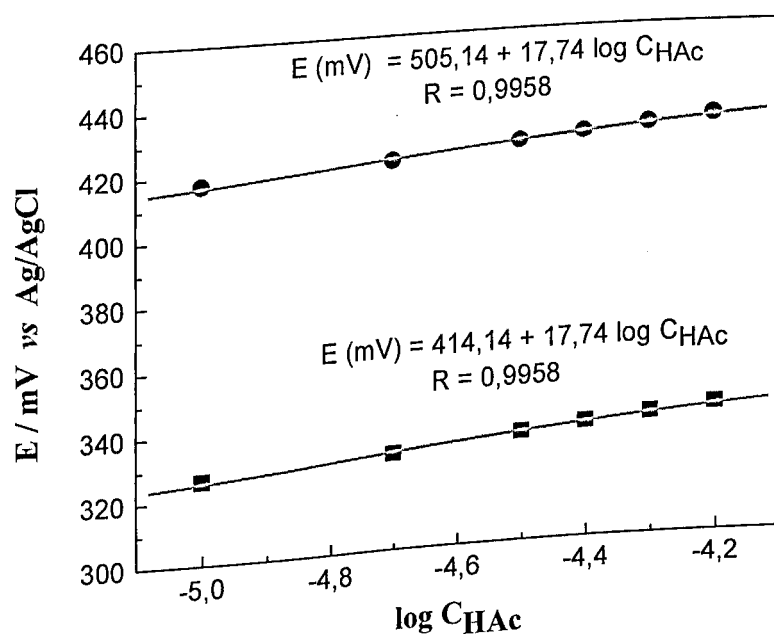
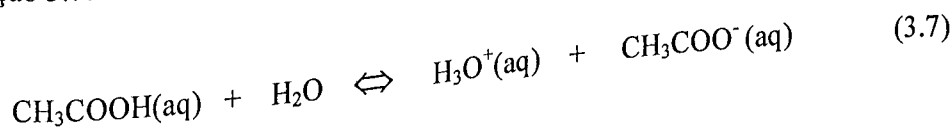


Figura 19: Resposta dos eletrodos de (●) RuO₂ 100 % e (■) RuO₂ 30 % em função da concentração decrescente de ácido acético. Eletrólito suporte: KNO₃ 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

As curvas apresentadas na Figura 18 mostram a variação do potencial dos eletrodos RuO₂ 100% e 30% com a concentração crescente de ácido acético. Observa-se que o potencial de ambos eletrodos varia linearmente com a concentração de ácido acético na solução, indicando que pequenas variações na concentração de H⁺ no meio afetam a transição redox do par Ru^(III)/Ru^(IV). Estudos da resposta dos eletrodos em função da concentração decrescente de ácido acético forneceram os resultados apresentados na Figura 19.

Em solução aquosa, o ácido acético sofre ionização parcial de acordo com a equação 3.7:



O equilíbrio que se estabelece na solução de ácido acético é determinado pela constante de ionização, K_a . À 25°C, considerando-se a força iônica zero, o valor de K_a é de $1,78 \times 10^{-5}$, cuja expressão em função da concentração pode ser escrita segundo a equação 3.8:

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} \Rightarrow [H^+] = \sqrt{K_a[HAc]} \quad (3.8)$$

Substituindo a $[H_3O^+]$ na equação 3.4 obtém-se a expressão para o potencial do eletrodo de RuO_2 , que relaciona o potencial do eletrodo com a concentração de ácido acético na solução, conforme ilustra a equação 3.9.

$$E_{RuO_2} = E^{o''} + \frac{0,059}{2} \log [HAc] \quad (3.9)$$

sendo que $E^{o''}$ inclui o potencial padrão formal do par $Ru^{(III)}/Ru^{(II)}$ na camada de óxido superficial e a constante de ionização do ácido acético.

A equação 3.9 relaciona o potencial do eletrodo com a concentração de ácido acético na solução. A dependência do potencial do eletrodo de RuO_2 com a concentração de ácido acético está ilustrado no esquema da Figura 20.

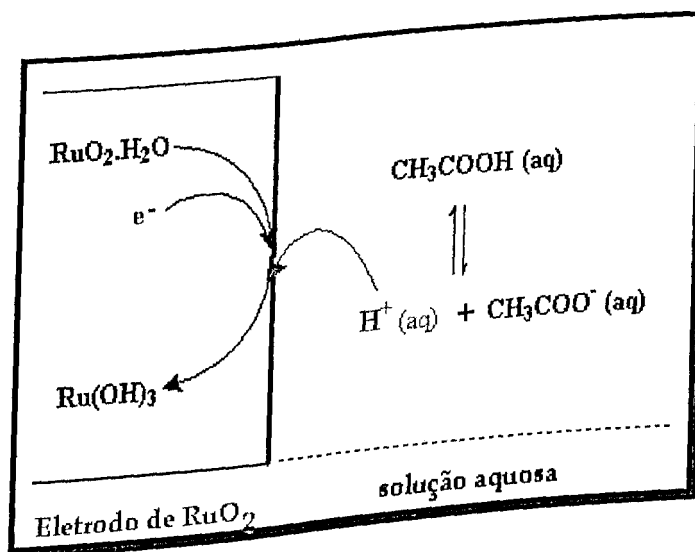


Figura 20: Resposta do eletrodo $Ru_xTi_{1-x}O_2$ para CH_3COOH presente na solução aquosa.

A resposta do eletrodo de RuO_2 em função da concentração crescente de HAc (Figura 18) mostra alta sensibilidade deste eletrodo para H_3O^+ , o que pode ser explicado pela facilidade de adsorção dos íons H^+ na superfície do eletrodo. Em concentrações decrescentes, tem-se uma menor sensibilidade da resposta, ao redor de 17 mV, o que justifica a dificuldade da dessorção dos íons H^+ na superfície do eletrodo. Considerando-se esse fato, investigou-se o tempo necessário para o completo restabelecimento do potencial do eletrodo, numa solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, após o mesmo ter estado em contato com a solução de ácido acético mais concentrada. Observou-se que um período de tempo de 12 h era necessário para o restabelecimento do potencial de equilíbrio na solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esse fato mostra claramente que os eletrodos apresentam menor sensibilidade para responder às variações decrescentes de ácido acético na solução, indicando que a desprotonação dos sítios ativos da camada de óxido é um processo demorado.

3.3.2 – Em tampão fosfato como eletrólito suporte

Considerando-se que o ácido acético será produzido pela hidrólise enzimática do cloreto de acetilcolina, numa solução tampão fosfato, foi investigado se o eletrodo de RuO_2 100% é capaz de responder às variações da concentração de ácido acético quando este se encontra numa solução tamponada. Tal estudo é muito importante, pois, dependendo das concentrações dos componentes da solução tampão, o ácido acético produzido na reação enzimática pode ser completamente consumido pelo sistema tampão e o pH da solução pode manter-se praticamente inalterado. Nessas condições, o eletrodo não responderá às variações na quantidade de ácido acético produzido.

A Figura 21 mostra a resposta do eletrodo de RuO_2 100% para o ácido acético, em solução tampão fosfato $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com o gráfico da Figura 21, o eletrodo de RuO_2 responde linearmente às variações da concentração de ácido acético, embora as variações de potencial sejam menores, quando comparadas com as variações observadas em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, devido ao efeito do sistema tampão na mudança do pH da solução.

Os resultados mostram que o eletrodo apresenta elevada sensibilidade para detectar pequenas modificações no pH da solução, provocadas pela presença de ácido acético. Tal fato indica que a interface óxido/solução torna-se polarizada devido a pequenas alterações

no pH da solução provocadas pelo HAc, afetando as transições de estado sólido do par redox $\text{Ru}^{(\text{III})}/\text{Ru}^{(\text{IV})}$, o que explica a pequena variação no potencial do eletrodo.

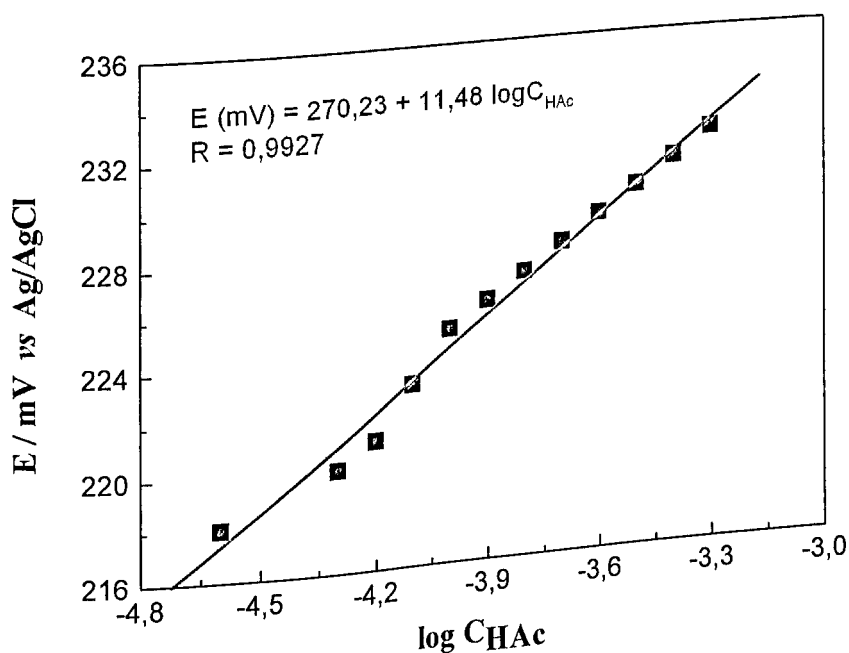


Figura 21: Resposta do eletrodo de RuO_2 100% em função da concentração de ácido acético, em solução tampão fosfato $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

3.4 – Avaliação do biossensor potenciométrico

3.4.1 – Otimização da resposta do biossensor potenciométrico

A resposta do biossensor para o substrato é definido como o deslocamento do potencial deste biossensor causado pela formação de ácido acético na hidrólise enzimática da acetilcolina. No presente caso, os parâmetros que afetam essa resposta estão relacionados com a atividade catalítica da enzima para o substrato e com a sensibilidade do sensor potenciométrico para detectar o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina.

De modo geral, a atividade catalítica da enzima depende da interação enzima-substrato, que ocorre numa região bem definida da enzima. Essa região, na qual o substrato

se liga, é chamada de centro ativo (ou sítio ativo) da enzima. O sítio ativo é formado por resíduos de aminoácidos, trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos da cadeia polipeptídica, os quais definem a estrutura terciária da proteína. O centro ativo assim organizado adquire uma determinada forma espacial que permite a enzima “reconhecer” seu substrato, como mostra a Figura 22 [7]. Assim, o grau de seletividade das enzimas para um determinado substrato é definido pela estrutura e forma espacial do centro ativo envolvido, que são governados pela estrutura tridimensional da enzima. A estrutura tridimensional da enzima, também conhecida como conformação da enzima, depende fortemente das condições experimentais presentes no meio reacional, pois agentes químicos e/ou físicos, como o pH e a temperatura, podem ser capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína e afetar a atividade enzimática.

Considerando-se tal fato, foi investigada a resposta do biossensor potenciométrico em função das diferentes condições experimentais, buscando-se otimizar a resposta do biossensor para o ácido acético produzido na hidrólise enzimática do cloreto de acetilcolina (substrato). Os seguintes parâmetros experimentais foram investigados: pH da solução tampão e concentração da solução tampão.

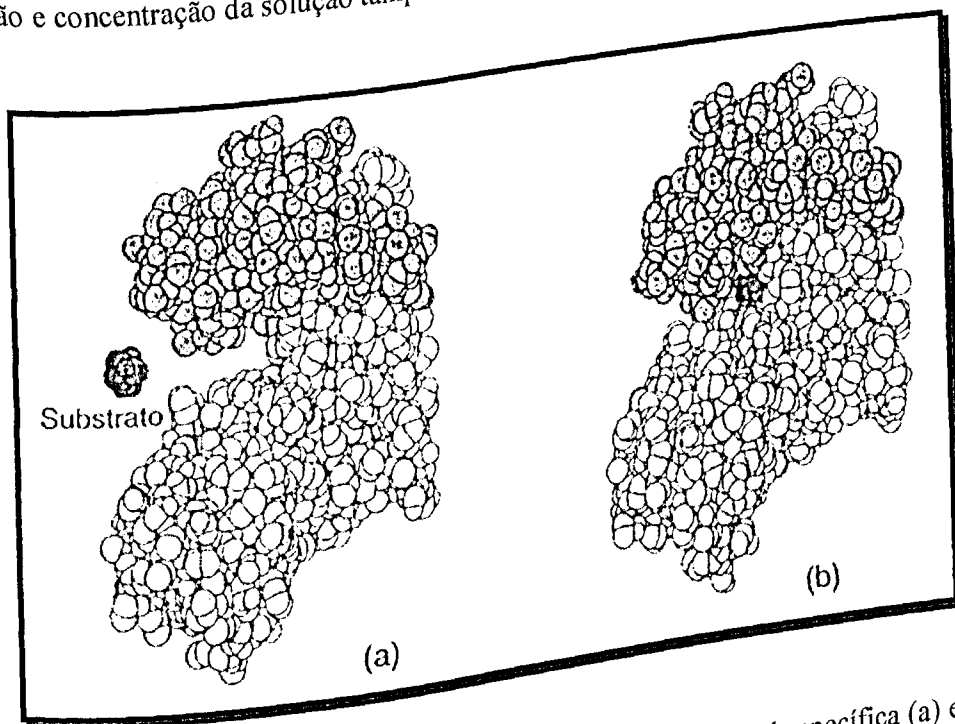


Figura 22: Centro ativo de uma enzima com estrutura espacial específica (a) e ligação do substrato ao centro ativo (b). (Reproduzida de Lehninger, 1982).

O pH da solução tampão é um parâmetro importante a ser investigado, pois a maioria das enzimas apresenta atividade catalítica dependente do pH da solução. Assim, a atividade enzimática atinge um valor máximo num determinado pH; à medida que o pH da solução afasta desse valor, a atividade pode diminuir acentuadamente [7].

No presente estudo, a atividade está diretamente relacionada com a quantidade de ácido acético, produzida pela hidrólise enzimática de uma quantidade definida de cloreto de acetilcolina, que por sua vez provoca um rápido desvio no potencial do biossensor potenciométrico. O esquema de funcionamento do biossensor potenciométrico proposto no presente trabalho está ilustrado na Figura 23.

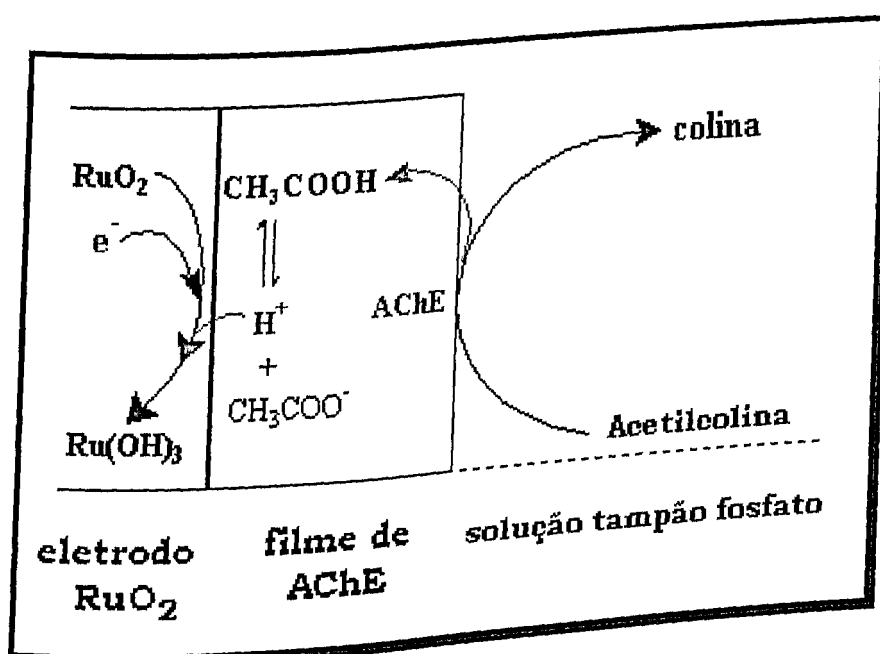


Figura 23: Resposta do biossensor potenciométrico para ácido acético produzido pela hidrólise das acetilcolina.

As investigações conduzidas para otimizar a resposta do biossensor para o cloreto de acetilcolina foram realizadas utilizando-se soluções tampão fosfato $1,0 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , preparadas em KCl 0,1 mol L^{-1} . A função do KCl nas soluções tampão deve-se ao fato desse eletrólito controlar o potencial do eletrodo de referência, que é usado para as medidas potenciométricas do biossensor. Considerando-se tal fato, todas as medidas da resposta do biossensor estão em relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 0,1 mol L^{-1}).

Na Figura 24 encontra-se a resposta do biossensor potenciométrico para cloreto de acetilcolina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em função do pH, mantidas por soluções tampão fosfato $1,0 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

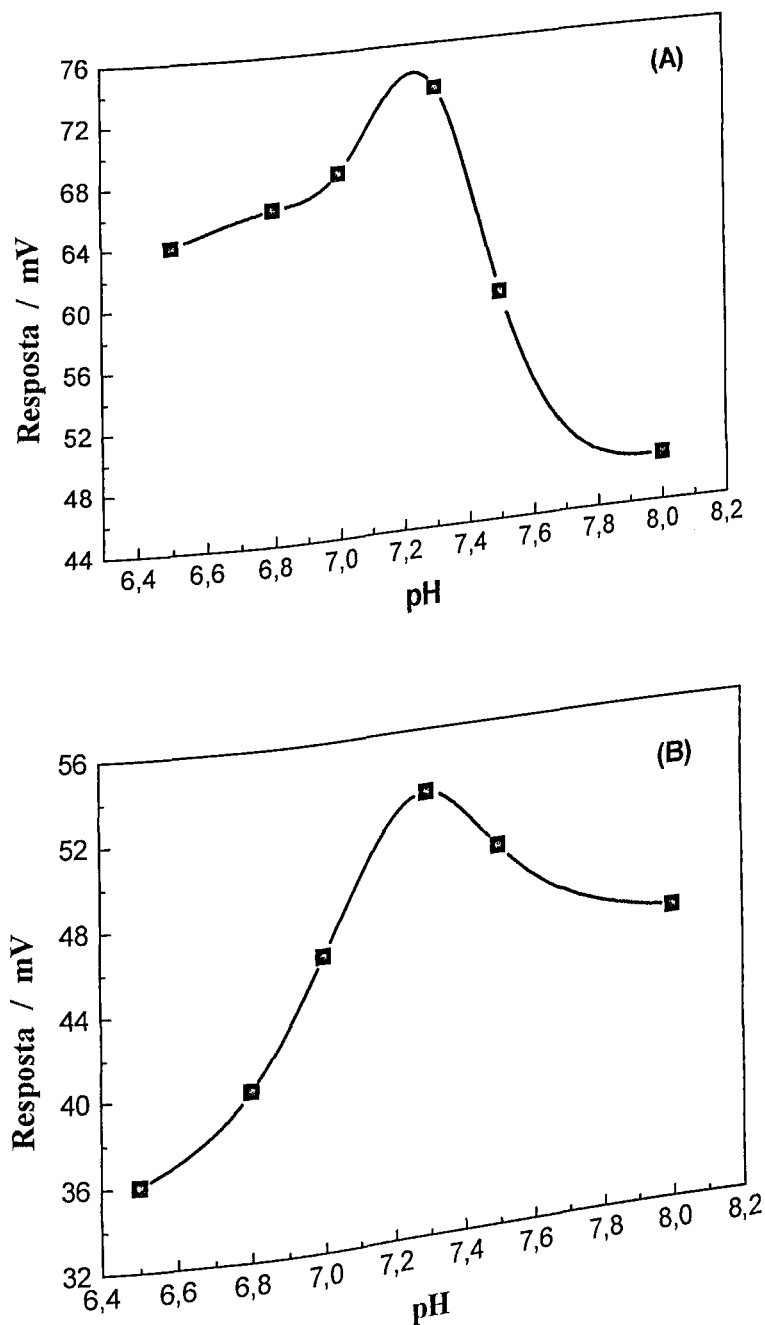


Figura 24: Resposta do biossensor potenciométrico em função do pH da solução tampão fosfato (A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Concentração de cloreto de acetilcolina: $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Observa-se pelas curvas da Figura 24 que o aumento do pH provoca um aumento do potencial do biossensor potenciométrico. Um valor máximo foi obtido, em ambas as soluções tampão, em pH 7,3. Deve ser ressaltado que em solução tampão $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ o biossensor apresentava uma resposta com acentuada oscilação, em torno de um valor médio. Devido a esse fato, os potenciais medidos apresentaram desvios padrão bem superiores que aqueles obtidos em soluções tampão $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em todos os valores de pH investigados.

A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando-se que as enzimas apresentam grupos protonáveis/desprotonáveis em seus resíduos. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo da enzima ou serem importantes para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima.

Assim, dependendo do pH da solução, alguns grupos da enzima podem ser protonados ou desprotonados. Nesse sentido, existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a enzima a uma conformação ideal para exercer sua atividade catalítica.

Este pH ótimo depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da sequência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos protonáveis, as variações de pH também poderão afetar a carga do substrato. A eficiência da catálise dependerá, então, de como se encontram, a enzima e o substrato, para permitir uma interação eficiente entre ambos [7].

Um outro parâmetro investigado foi o efeito da concentração da solução tampão, mantida em pH 7,3 na resposta do biossensor potenciométrico. Os resultados estão apresentados na Figura 25. Pode-se observar pela Figura 25, que a resposta do biossensor diminui a medida que a concentração da solução tampão aumenta.

Este fato pode ser explicado pelo aumento da capacidade tamponante do meio, que diminui a sensibilidade do biossensor para responder às variações na quantidade de íons H_3O^+ produzidos pela ionização do ácido acético, resultante da hidrólise enzimática do cloreto de acetilcolina, são consumidos pelo HPO_4^{2-} do sistema tampão e, como consequência, a variação do pH será menor. Em decorrência, a variação do potencial torna-se mínima, pois as transições $\text{Ru}^{(\text{III})}/\text{Ru}^{(\text{IV})}$ na superfície do eletrodo são dependentes da variação do pH da solução.

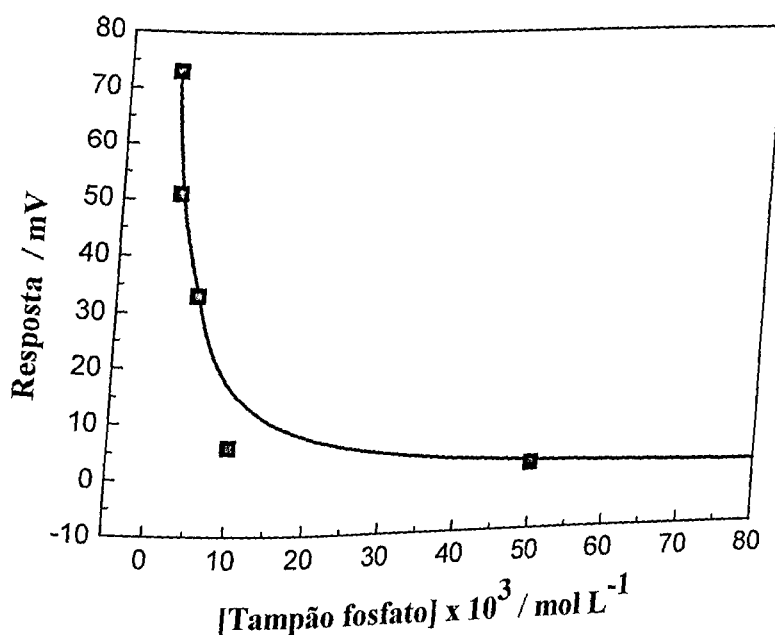


Figura 25: Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração da solução tampão fosfato, pH 7,0. Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 0,1 mol L⁻¹). Concentração de cloreto de acetilcolina: $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Outro fator que pode explicar a diminuição da resposta do biossensor na Figura 25 é a mudança na atividade catalítica da enzima AChE provocada pelo aumento da concentração de H_2PO_4^- e de HPO_4^{2-} na solução. Esses íons podem interagir com grupos que fazem parte do sítio ativo da enzima ou com grupos que podem afetar a conformação da enzima e, conseqüentemente, a atividade catalítica da enzima [7,9].

3.4.2 – Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de cloreto de acetilcolina

Esse estudo foi realizado utilizando-se solução tampão fosfato, pH 7,3 em concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. As curvas de calibração obtidas em função da concentração do substrato, nas respectivas soluções tampão, estão apresentadas na Figura 26.

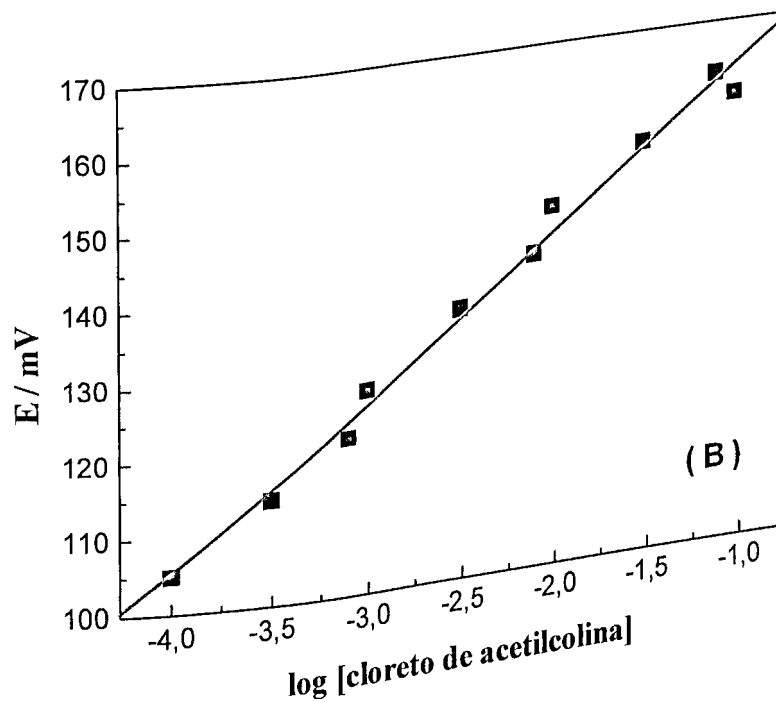
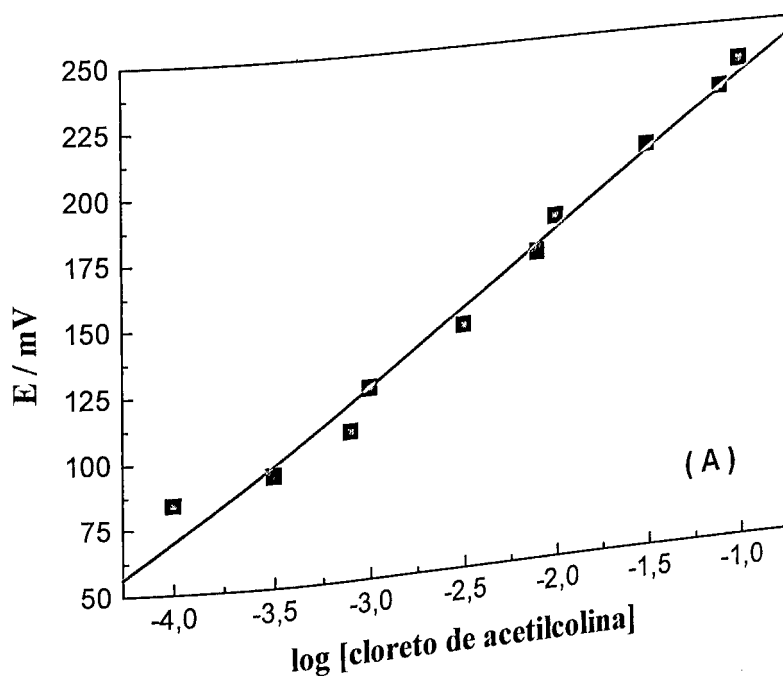


Figura 26: Resposta do biossensor potenciométrico em função da concentração de cloreto de acetilcolina, em solução tampão fosfato de concentração (A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de referência: $\text{Ag/AgCl (KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1})$.

Observa-se pela Figura 26, que o biossensor apresenta uma resposta linear para o ácido acético produzido da hidrólise do substrato, na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de acetilcolina, em ambas as soluções tamponadas. O aumento linear do potencial ao aumentar a concentração de substrato pode ser explicado pelo aumento do número de interações enzima-substrato, pois o número de moléculas de substrato aumenta. Conseqüentemente, a taxa de hidrólise do substrato torna-se mais pronunciada, aumentando a quantidade de ácido acético produzida, que afeta o potencial do biossensor.

Nas reações enzimáticas, a concentração da enzima é, via de regra, muito menor que a de substrato, dada a diferença entre suas massas moleculares. Na prática, soluções equimolares de enzima e substrato não são usadas e nem sequer obtidas. O que se usa são enzimas imobilizadas ou soluções de enzima muito mais diluídas do que as de seus substratos. Dessa forma, nas reações enzimáticas, o número de moléculas de enzima é muito inferior ao número de moléculas do substrato.

O biossensor proposto no presente trabalho apresentou boa estabilidade durante o período de uso do mesmo, ao redor de três meses. A Figura 27, mostra que a resposta do eletrodo para o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina, em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, após o período de dois meses de uso contínuo, é da ordem de 80% da resposta original, permitindo a realização de aproximadamente 205 medidas.

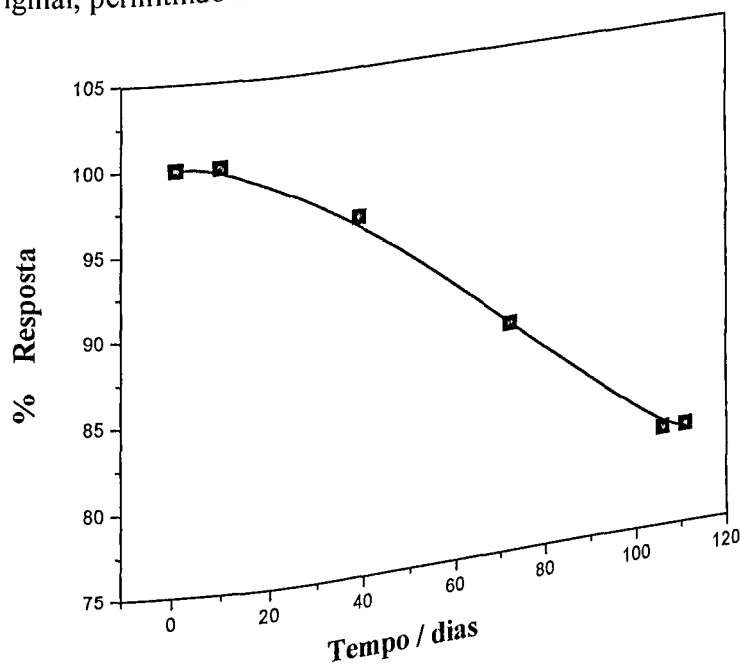


Figura 27: Resposta do biossensor para o ácido acético produzido na hidrólise da acetilcolina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo de uso. Concentração da solução tampão: $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Média da resposta de 03 biossensores.

3.5 – Avaliação da inibição da enzima AChE pelo Metil Paration

Considerando-se os resultados do biossensor potenciométrico, observou-se que o mesmo apresenta características muito promissoras para ser usado para a determinação de inibidores da enzima AChE. Essa investigação foi realizada empregando-se o Metil Paration (MP) como pesticida organofosforado.

As medidas da resposta de inibição da enzima pelo MP foram realizadas mantendo-se o biossensor em contato com a solução desse pesticida, durante 10 min, conforme procedimento descrito no item 2.8. Esse tempo foi escolhido com base nos tempos de incubação investigados e utilizados por outros autores [77,98,99]. Com esse tempo de pré incubação, o biossensor apresentou uma menor resposta para a acetilcolina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, comparada com a obtida para esse substrato, antes da inibição. Tal fato é atribuído à fosforilação irreversível da enzima AChE. A resposta inicial do biossensor foi restaurada pelo tratamento do biossensor com a solução do reagente de reativação.

O gráfico da inibição da resposta (I) do biossensor em função da concentração de MP está apresentado na Figura 28.

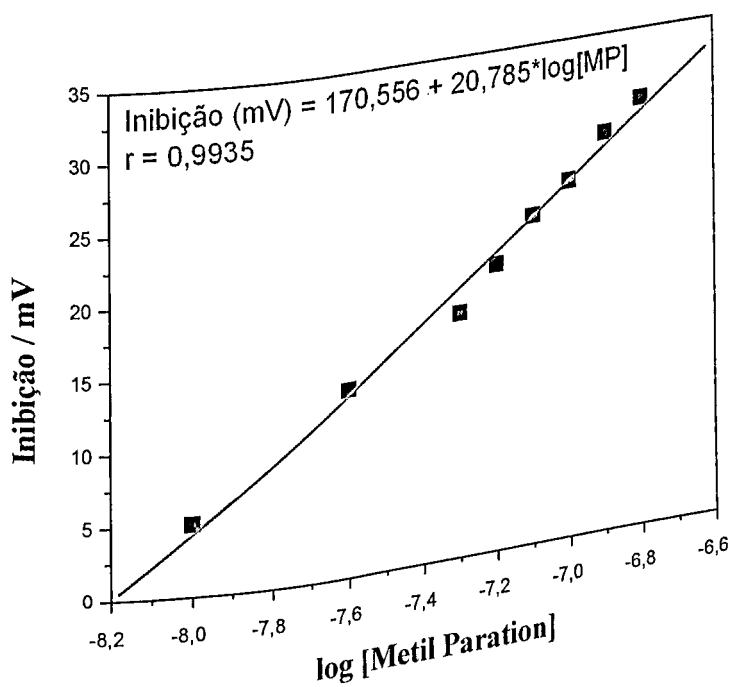


Figura 28: Inibição da resposta do biossensor potenciométrico em função do log da concentração de Metil Paration, obtida em tampão fosfato $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Cloreto de acetilcolina: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A curva da Figura 28 foi linear na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ a $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, que correspondeu a 10 % e 25% de inibição, respectivamente. O gráfico apresentado na Figura 28 mostra um grau de inibição máxima de 25%, para uma faixa linear de concentração de MP relativamente pequena. Incubações do biossensor em soluções de MP em concentrações superiores a $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foram realizadas para verificar se a inibição poderia ocorrer em maior extensão.

Os resultados mostraram que o grau de inibição não era superior a 30%, para concentrações de MP superiores a $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Tais resultados sugerem que somente uma parcela de sítios ativos foram inibidos pelo MP.

Assim sendo, é provável que somente os sítios ativos presentes na superfície da camada de enzimas AChE foram inibidos pelo pesticida. Tal fato pode ser explicado considerando-se que a camada de enzimas não se encontra na forma de um filme fino imobilizado na superfície do eletrodo de RuO₂ e que a difusão do pesticida MP e a do substrato através dessa camada de enzimas não ocorrem na mesma extensão.

No presente caso, é provável que a presença dos grupos OH superficiais presentes no eletrodo de RuO₂, associada à porosidade do eletrodo e à presença de "rachaduras" ao longo do filme de óxido metálico, contribuam para reduzir o acesso e a difusão das moléculas de MP para o interior da camada de enzimas e alcançarem os sítios mais internos.

Investigações do grau de inibição em tempos de incubação de 20 min mostraram que esse período de tempo também não era suficiente para aumentar o grau de inibição. Considerando-se a possibilidade de contaminar o biossensor potenciométrico ou desativar de forma irreversível a enzima AChE, não foram investigados tempos superiores a 20 min [78].

Os resultados obtidos sugerem que se os biossensores forem preparados com o uso de eletrodos de RuO₂ de maior área e menores volumes de solução de enzima/BSA os mesmos deverão fornecer respostas de inibição para MP numa faixa de concentração mais ampla. Investigações nesse sentido deverão ser realizadas, buscando-se melhorar as características analíticas do biossensor para a determinação de inibidores da enzima AChE.

Os resultados obtidos nas investigações realizadas mostraram que o biossensor proposto apresenta características muito promissoras para as aplicações analíticas de interesse. No caso do uso do biossensor para a determinação de pesticidas OF, as medidas de inibição realizadas com MP mostraram, como esperado, que o tempo de vida do

biossensor torna-se muito limitado, para um número de 12 a 15 medidas, mesmo utilizando-se a reativação da enzima como o reagente cloreto de 2-aldoxina-N-metilpirodônio.

Capítulo 4:

CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE CONTINUIDADE

4.1- Conclusões do Trabalho Desenvolvido

Estudos realizados com os eletrodos de filme de óxido de rutênio (IV), de composição nominal $\text{Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$ (RuO_2 30%) e $\text{Ru}_1\text{Ti}_{10}\text{O}_2$ (RuO_2 100%), imobilizados sobre titânio metálico, mostraram que esses eletrodos apresentam resposta rápida e linear sobre titânio metálico, mostraram que esses eletrodos apresentam resposta rápida e linear com o pH da solução. Uma inclinação próxima de 60 mV, conforme esperado pela equação de Nernst, foi encontrada. O potencial de circuito aberto (E_{ca}) dos eletrodos de RuO_2 30% e RuO_2 100%, em solução aquosa de KNO_3 0,1 mol L^{-1} , como eletrólito suporte, empregando-se como eletrodo de referência o Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}), forneceram valores de 345 e 278 mV vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}), respectivamente. Esses valores estão em concordância com os valores esperados para a transição de estado sólido do par $\text{Ru}^{(\text{IV})}/\text{Ru}^{(\text{III})}$, que ocorre com a participação de H^+ .

A resposta do eletrodo de RuO_2 100% em função da concentração crescente de ácido acético, em KNO_3 0,1 mol L^{-1} e em tampão fosfato $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , mostraram que esse eletrodo apresenta resposta rápida e nernstiana para o ácido acético na solução.

Investigações do uso do eletrodo de RuO_2 100% como transdutor eletroquímico de um biossensor potenciométrico à base de enzima AChE foram realizadas. A resposta desse biossensor para o ácido acético produzido na hidrólise enzimática do cloreto de acetilcolina (substrato) foi otimizada em função do pH e da concentração da solução tampão. Uma resposta rápida e estável do biossensor foi encontrada em solução tampão $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , pH 7,3 contendo KCl 0,1 mol L^{-1} . Nessas condições, o biossensor apresentou uma resposta linear para o ácido acético produzido da hidrólise do cloreto de acetilcolina, na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a 0,1 mol L^{-1} .

Investigações do uso do biossensor potenciométrico para a determinação de pesticidas inibidores da enzima AChE foram realizadas empregando-se o Metil Paration como pesticida organofosforado. Os resultados mostraram que a resposta do biossensor para a acetilcolina sofre inibição proporcional à concentração de MP, na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ a $1,8 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} . Nessa faixa, um grau de inibição de 10 % a 25% foi observado.

Os resultados das investigações conduzidas nesse trabalho mostraram que o biossensor potenciométrico apresenta características promissoras para aplicações de interesse seja na área de análises clínicas, de alimentos ou de controle da contaminação ambiental.

4.2– Propostas de Continuidade do Trabalho

Pretende-se melhorar as características analíticas do biossensor potenciométrico com a finalidade de estender a faixa de concentração de inibidores a ser determinada. Para tanto, será investigado o uso de eletrodos de filmes de RuO_2 mais finos e de maior área com a finalidade de produzir uma camada de enzima mais fina, que se distribua ao longo da superfície do filme de óxido. Dessa forma, é possível que os centros ativos da enzima tornem-se mais acessíveis para os pesticidas inibidores da enzima AChE, possibilitando estender a taxa de inibição para além de 25%. As investigações serão realizadas utilizando-se o Metil Paration como modelo e, posteriormente, serão estendidas para outros pesticidas OF e CB buscando-se utilizar esse biossensor na determinação de pesticidas OF e CB totais em amostras reais.

A validação do biossensor potenciométrico para a determinação de pesticidas OF e CB totais em amostras de água ou nos extratos orgânicos obtidos de amostras de alimentos será também investigada utilizando-se a cromatografia líquida de alta performance (CLAE), com detecção UV.

Capítulo 5:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- 1 - **Agrotóxicos**, Capítulo informativo sobre os uso do agrotóxicos relacionado ao meio-ambiente, saúde e trabalho. Disponível em: <http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/11agrototoxicos.htm>, acesso em 23/04/2004.
- 2 - Caldas, L. Q. A.; **Manual sobre Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides**, disponível em www.cepis-ops-oms.org/tutorial2/fulltex/intoxicacoes.pdf, acesso em 05/04/2004.
- 3 - **Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos**, in Guia de Vigilância Epidemiológica. Cap 5. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/GVE0515G.htm>, acesso em 12/02/2004.
- 4 - Baird, C.; **Química Ambiental**, 2ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622.
- 5 - Alloway, B. J.; and Ayres, D. C.; **Chemical Principles of Environmental Pollution**, 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.
- 6 - Guyton, A. C.; **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Interamericana Ltda, 1984.
- 7 - Kandell, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M.; **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.
- 8 - Vanloon, G. W.; Duffy, J.; **Environmental Chemistry: A global Perspective**. Oxford: University Press, 2001.
- 9 - **Toxicologia de Praguicidas**, disponível em http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap15tox.pdf, acesso em 13/03/2004.
- 10 - Stryer, L., **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1990.
- 11 - Kramer, R.; *Coord. Chem. Rev.*, 182, 1999, 243-261.

-
- 12 - Campbell, M. K.; *Biochemistry*, 2nd Edition. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1995.
 - 13 - Lehninger, A. L.; *Bioquímica*. 2^a edição. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.
 - 14 - *Resolução Conama Nº 20, de 18 de junho de 1986*. Classifica as águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes. Publicado no DOU de 30/07/86, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>, acesso em 20/02/2004.
 - 15 - Leon-Gonzalez, M. E.; and Townshend, A.; *Journal of Chromatography A*, 1991, 539, 47-54.
 - 16 - Martinez, R. C.; Gonzalo, E. R.; Garcia, F. G.; Méndez, H.; *Journal of Chromatography*, 1993, 644, 49-58.
 - 17 - Niessner, G. N.; Buchberger, W.; Bonn, G. K.; *Journal of Chromatography A*, 1996, 737, 215-222.
 - 18 - Barceló, D.; Hennion, M. C.; *Analytica Chimica Acta*, 1995, 318, 1-41.
 - 19 - Nunes, G. S.; Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18, 99-107.
 - 20 - Nunes, G. S.; Ribeiro, M. L.; Polese, L.; Barceló, D.; *Journal of Chromatography*. 1998, 795, 43-51.
 - 21 - Tones, C. M.; Picó, Y.; Mafies, J.; *Chromatographia*, 1995, 41, 685.
 - 22 - Dreyfuss, M. F.; Lotfi, H.; Marquet, P.; Debord, J.; Daguet, J. L.; Lachatre, G. *Analysis*, 1994, 22, 273.

-
- 23 - Tse, H.; Comba, M.; Alace, M.; *Chemosphere*, **2004**, 54, 41.
 - 24 - Jauregue, O.; Gauceran, M. T.; *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 340, 191.
 - 25 - Driss, M. R.; Hennion, M.C.; Bouguerra, M. L.; *Journal of Chromatography*, **1993**, 39, 352.
 - 26 - Brouwer, E. R.; Lingeman, H.; Brinkman, U. A. T.; *Chromatographia*, **1990**, 29, 415.
 - 27 - Lee, H. S.; Kim, Y. A.; Cho, Y. A.; Lee, Y. T.; *Chemosphere*, **2002**, 46, 571.
 - 28 - Trojanowicz, M.; Hitchman, M. L.; *Trends in Analytical Chemistry*, **1996**, 15, 38.
 - 29 - Skládal, P.; *Anal. Chim. Acta*. **1992**, 269, 281.
 - 30 - Sharma, A.; Roger, K. R.; *Biosensors, Meas. Sci. Technol.* **1994**, 5, 461.
 - 31 - Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S.; *Biosensors Fundamentals and Applications*, Ed. Oxford: Oxford Science Publications, **1986**.
 - 32 - Fatibello-Filho, O.; Capelato, M. D.; *Química Nova*, **1992**, 15, 28.
 - 33 - Guilbault, G. G.; *Analytical Applications of Enzymes*, Washington: American Chemical Society, Education Division, **1987**.
 - 34 - Karube, I.; Yokoyama, K.; Tamiya, E.; *Biosens. Bioelectron*, **1993**, 8, 219.
 - 35 - Oliveira Neto, G.; Yamanaka, H.; *Química Nova*, **1988**, 11, 432.
 - 36 - Stoytchera, M.; *Electroanalysis*, **1995**, 7, 560.

-
- 37 - Lenigk, R.; Lam, E.; Lai, A.; Wang, H.; Han, Y.; Cartier, P.; Rennberg, R.; *Biosens. Bioelectron*, **2000**, 15, 541.
- 38 - Zhou, Y. K.; Yvan, X. D.; Zhao, Q. L.; Ren, S.; *Sens. Actuators B*. **1993**, 12, 37.
- 39 - Guilbault, G. G.; and Montalvo, J. G.; *Anal. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 2164.
- 40 - Kumaran, S.; and Tran-Minh, C.; *Electroanalysis*, **1992**, 4, 949.
- 41 - Imato, T.; and Ishibashi, N.; *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, 10, 435-441.
- 42 - Tran-Minh, C.; Pandey, P. C.; Kumaran, S.; *Biosens. Bioelectr.*, **1990**, 5, 461.
- 43 - Vlasov, Y.; Bratov, A.; Levichev, S.; Tarantov, Y. *Sensors and Actuators*, **1991**, B4, 283.
- 44 - Dumschat, C.; Müller, H.; Stein, K.; Schwedt, G.; *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 252, 7-9.
- 45 - Clark, L.; Lyons, C.; Ann, N. Y.; *Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29.
- 46 - Updike, S. J.; and Hicks, G. P.; *Nature*, **1967**, 214, 986.
- 47 - Kok, F. N.; Hasirci, V.; *Biosens. Bioelectron*, **2004**, 19, 661.
- 48 - Koyama, M.; Sato, Y.; Aizawa, M.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 116, 307.
- 49 - Guilbault, G. G.; and Lubrano, G. J.; *Anal. Chim. Acta*, **1973**, 64, 439.
- 50 - Harrison, D. J.; Turner, R. F. B.; Baltes, H. D.; *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2002.
- 51 - Palleschi, G.; Bernabei, M.; Cremisini, C.; Mascini, M.; *Sensors and Actuators B*, **1992**, 7, 513.

-
- 52 - Campanella, L.; Achili, M.; Sammartino, M. P.; Tomasetti, M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1991**, 26, 237.
- 53 - Gruss, R.; Sheller, F.; Shao, M. J.; Liu, C. C.; *Anal. Lett.*, **1989**, 22, 1159.
- 54 - Trojanowicz, M.; and Krawczyk, T. K.; *Mikrochimica Acta*, **1995**, 121, 167.
- 55 - Rodrigues, T. C.; Tubino, M.; Godinho, O. E. S.; Neto, G. O.; *Anal. Sci.*, **1997**, 13, 423.
- 56 - Palleshi, G.; Bernabei, M.; Cremisini, C.; Mascini, M.; *Sensors and Actuators B*, **1992**, 7, 513.
- 57 - Palleshi, G.; Bernabei, M.; Cremisini, C.; Mascini, M.; Paleshi, G.; *Anal. Lett.*, **1991**, 24, 117.
- 58 - Nunes, G. S.; Barceló, D.; Grabaric, B. S.; Cruz, J. M. D.; Ribeiro, M. L.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 399, 37-49.
- 59 - Skládal, P.; and Mascini, M.; *Biosens. Bioelectron.*, **1992**, 7, 335.
- 60 - Marty, J. L.; Mionetto, N.; Noguer, T.; Ortega, F.; Roux, C.; *Biosens. Bioelectron.*, **1993**, 8, 273.
- 61 - Kumaran, S.; and Morita, M.; *Talanta*, **1995**, 42, 649.
- 62 - Besombes, J.; Cosnier, S.; Labbe, P.; Reverdy, G.; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 311, 255.
- 63 - Wang, J.; Nascimento, V. B.; Kane, S. A.; Rogers, K.; Smyth, M.; Angnes, L.; *Talanta*, **1996**, 43, 1903.

- 64 - Budnikov, H. C.; and Evtugyn, H. G.; *Electroanalysis*, **1996**, 8, 817.
- 65 - La Rosa, C.; Pariente, F.; Hernández, L.; Lorenzo, E.; *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 295, 273.
- 66 - La Rosa, C.; Pariente, F.; Hernández, L.; Lorenzo, E.; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 308, 129.
- 67 - Wilkins, E.; Carte, M.; Voss, J.; Ivnitski, D.; *Electrochemistry Communications* 2, **2000**, 786-790.
- 68 - Ciucu, A. A.; Negulescu, C.; Baldwin, R. P.; *Biosensors and Bioelectronics*; **2003**, 18, 303-310.
- 69 - Marques, P. R. B. O.; Nunes, G. S.; Santos, T. C. R.; Andreescu, S.; Marty, J. L.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 20, 825-832.
- 70 - Cho, Y. A.; Lee, H. S.; Cha, G. S.; Lee, Y. T.; *Biosensors and Bioelectronics*, **1999**, 14, 435.
- 71 - Kumaran, S.; and Tran-Minh, C.; *Electroanalysis*, **1992**, 4, 949.
- 72 - Stein, K.; and Schwedt, G.; *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 272, 73.
- 73 - Dzyadevich, S. V.; Soldatkin, A. P.; Shul'ga, A. A.; Strikha, V. I.; El'skaya, A. V.; *J. Anal. Chem.*, **1994**, 49, 874.
- 74 - Fennouh, S.; Casimiri, V.; Burstein, C.; *Biosens. Bioelectron.*, **1997**, 12, 97.
- 75 - Skládal, P.; Nunes, G. S.; Yamanaka, H.; Ribeiro, M. L.; *Electroanalysis*, **1997**, 9, 1083.

-
- 76 - Nunes, G. S.; Skládal, P.; Yamanaka, H.; Barceló, D.; *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 362, 59.
- 77 - Ivanov, A. N.; Evtugyn, G. A.; Gyuresányi, R. E.; Tóth, K.; Budnikov, H. C.; *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 404, 55.
- 78 - Ghindlis, A. L.; Morzonova, T. G.; Barmin, A. V.; Kurochkain, I. N., *Biosens. Bioelectron.*, **1996**, 11, 837.
- 79 - Alfaya, A. A. S.; and Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, **2002**, 25, 835.
- 80 - Wang, J.; and Chen, Q.; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 312, 39.
- 81 - Gorton, L.; *Electroanalysis*, **1995**, 7, 23-45.
- 82 - Deng, Q.; Guo, Y.; Dong, S.; *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 319, 71.
- 83 - Coche-Guerente, I.; Cosnier, S.; Innocent, C. *Anal. Lett.*, **1995**, 28, 1005.
- 84 - Cosnier, S.; Lepellec, A.; Guidetti, B.; Rico-Lattes, I.; *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 449, 165.
- 85 - Wang, B.; Li, B.; Deng, Q.; Dong, S.; *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3170.
- 86 - Wang, B.; and Dong, S.; *J. Electroanal. Chem.*, **2000**, 487, 45.
- 87 - Chibata, I.; *Immobilized Enzymes, Research and Development*, New York: John Willy & Sons, **1978**.
- 88 - Skládal, P.; Pavlík, M.; Fiala, M.; *Anal. Lett.*, **1994**, 27, 29.
- 89 - Skládal, P.; Fiala, M.; Krejci, J.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **1996**, 65, 139.

-
- 90 - Palchetti, I.; Cagnini, A.; Del Carlo, M.; Coppi, C.; Mascini, M.; Turner, A. P. F. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 337, 315.
- 91 - *Handbook of chemistry and Physics*, 55th edition, CRC Press, INC, Cleveland Ohio, **1975**.
- 92 - De Faria, L. A.; Boodts, J. F. C.; Trasatti, S.; *Electrochim. Acta*. **1992**, 37, 2511.
- 93 - Martins, D. E. A.; *Desenvolvimento de uma Metodologia de Determinação Eletroquímica de SO₂ utilizando Eletrodos a base de Óxido de Rutênio. Dissertação de Mestrado*. Uberlândia: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, **2002**.
- 94 - Zoubov, N.; and Pourbaix, M.; in Pourbaix, M. (ed.). *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solution*, Oxford: Pergamon, **1966**, 343-349.
- 95 - Trasatti, S.; Lodi, G., in Trasatti, S. (ed.). *Electrodes of Conducting Metal Oxides, Part A*. Amsterdam: Elsevier, **1980**, 305-358.
- 96 - Grazioli, D.; Tantardini, F.; Trasatti, S. J.; *Appl. Electrochem.*, **1974**, 4, 57.
- 97 - Santana, M. H. P.; *Estudo das Propriedades Superficiais e Eletrocatalíticas dos Eletrodos de Óxido de Ru + Ti + Ce + Nb. Dissertação de Mestrado*. Uberlândia: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, **2001**.
- 98 - Reybier, K.; Zairi, S.; Jaffrezic-Renault; Fahys, B.; *Talanta*, **2002**, 56, 1015-1020.
- 99 - Li, Y. G.; Zhou, Y. X.; Feng, J. L.; Jiang, Z. H.; Ma, L. R.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 382, 277-282.