



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-
INSTITUCIONAL EM QUÍMICA(UFG-UFMS-UFU)



**"Desenvolvimento de biossensor
potenciométrico em eletrodos de grafite
modificado com aminofenóis para determinação
de diclorvós em alimentos de origem
vegetal"**

Orientando: Edmar Isaias de Melo

Orientadora: Prof. Dra. Nívia Maria Melo Coelho

Co-orientador: João Marcos Madurro

Uberlândia

Junho -2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-
INSTITUCIONAL EM QUÍMICA(UFG-UFMS-UFU)



**"Desenvolvimento de biossensor
potenciométrico em eletrodos de grafite
modificado com aminofenóis para determinação
de diclorvós em alimentos de origem
vegetal"**

Edmar Isaias de Melo

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Química UFG-UFMS-UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientando: Edmar Isaias de Melo

Orientadora: Prof. Dra. Nívia Maria Melo Coelho

Co-orientador: João Marcos Madurro

Uberlândia

Junho-2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- M528d Melo, Edmar Isaías de, 1970-
 Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorvós em alimentos de origem vegetal / Edmar Isaías de Melo. - 2009.
 169 f. : il.
 Orientadora: Nívia Maria Melo Coelho
 Co-orientador: João Marcos Madurro.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Química UFG-UFMS-UFU.
 Inclui bibliografia.
- I. Química analítica - Teses. 2. Defensivos vegetais - Teses. 3. Alimentos - Análise - Teses. 4. Análise instrumental - Teses. 5. Biossensores - Teses. I. Coelho, Nívia Maria Melo. II. Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Química UFG-UFMS-UFU. III. Título.

CDU: 543

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



ALUNO(A): EDMAR ISAÍAS DE MELO

NÚMERO DE MATRÍCULA: 86142

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL DOUTORADO

TÍTULO DA TESE:

"Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorvos em alimentos de origem vegetal"

ORIENTADOR(A):

PROFª DRA. NÍVIA MARIA MELO COELHO

A Tese foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco 1X, no Campus Santa Mônica, no dia 24 de junho de 2009, às 9:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

PROFª DRA. NÍVIA MARIA MELO COELHO

(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. ARNALDO CÉSAR PEREIRA

(Universidade Federal de São João Del Rei)

PROF. DR. FÁBIO RODRIGO PIOVEZANI ROCHA

(Universidade de São Paulo)

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

(Instituto de Química / UFU)

ASSINATURA:

Uberlândia, 24 de junho de 2009.

Dedico este trabalho,

A minha esposa e companheira Marta, pelo apoio, amor e principalmente pela compreensão de conviver com minhas ausências.

Aos meus Pais: Eunice e Lázaro (in memoriam) pelo carinho dedicação e incentivo.

A minha irmã Fernanda por se preocupar comigo.

Aos meus filhos: Augusto, Bárbara e Otávio pelo carinho e compreensão nas horas ausentes.

Ninguém acende uma lâmpada e a coloca num lugar onde ficará escondida, ou sob uma tigela. Ao invés disso, coloca-se ela de pé, assim aquele que entrar pode enxergar a luz.

(Lucas 8, 16-17)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS que tem iluminado meus caminhos, para atingir meus ideais e que me tem concedido o dom divino de perdoar e esquecer o mal que fazem, estando comigo todos os instantes da minha vida.

A minha orientadora Nívia Maria Melo Coelho pelo apoio, conselhos, orientações e acima de tudo pela paciência e amizade, além de respeitar as idéias e opiniões originadas de seus orientandos.

Aos professores, João Marcos Madurro e Ana Graci Brito Madurro pelas orientações e apoio na realização de ensaios e discussões, em específico pela colaboração estabelecida e uso das instalações e equipamentos do LAFIP-Laboratório de Filmes Poliméricos.

Aos colegas discentes e amigos do LEA-Laboratório de Espectroscopia Aplicada, Cleide, Helen, Vanessa, Celso, Odilon e Ioni pelo companheirismo e amizade estabelecidos.

Aos colegas discentes do LAFIP, Lucas, Sabrina, Diego e em particular ao André Afonso, pela ajuda, idéias e comprometimento.

A CAPES, ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, à PROPP/UFU pelo suporte técnico e financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

***Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos
acompanha. (Autor desconhecido)***

SUMÁRIO

<i>Lista de Figuras</i>	<i>I</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>VII</i>
<i>Lista de Abreviaturas e Siglas</i>	<i>VIII</i>
<i>Resumo</i>	<i>IX</i>
<i>Abstract</i>	<i>X</i>
<i>1 Introdução</i>	<i>1</i>
<i>2 Objetivos</i>	<i>8</i>
<i>3 Revisão bibliográfica</i>	<i>10</i>
3.1 Agrotóxicos.....	10
3.1.1 Organofosforados	15
3.2 Metodologias usadas na determinação de agrotóxicos	17
3.3 Enzimas.....	25
3.3.1 Cinética Enzimática.....	25
3.3.2 Acetilcolinesterase	33
3.4 Biossensores	36
3.4.1 Tipos de biossensores	38
3.4.2 Transdutores	46
3.5 Filmes poliméricos usados no desenvolvimento de biossensores.	49
3.6 Técnicas eletroanalíticas	58
3.6.1 Voltametria cíclica.....	58
3.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	59
<i>4 Parte experimental</i>	<i>63</i>
4.1 Reagentes	63
4.2 Materiais e equipamentos utilizados.....	64

4.3	Soluções.....	69
4.4	Preparação de eletrodos	71
4.4.1	<i>Eletrodo de referência</i>	71
4.4.2	<i>Eletrodo de trabalho e formação de filmes poliméricos</i>	72
4.5	Cálculo da atividade enzimática	72
4.6	Preparação do biossensor.....	73
4.7	Caracterização dos eletrodos modificados.....	74
4.8	Resposta do sensor de grafite e grafite modificado com poliaminofenóis ..	75
4.9	Avaliação da resposta do biossensor potenciométrico	76
4.9.1	<i>Em função da concentração de cloreto de acetilcolina</i>	76
4.9.2	<i>Em função do pH</i>	76
4.9.3	<i>Em função da concentração de tampão fosfato</i>	77
4.9.4	<i>Em função dos parâmetros hidrodinâmicos</i>	77
4.9.5	<i>Em função do tempo de armazenamento</i>	77
4.9.6	<i>Em função da concentração de Diclorvós</i>	78
4.10	Ensaios de recuperação e comparação.....	78
5	<i>Resultados e Discussões</i>	82
5.1	Formação de filmes poliméricos.....	82
5.2	Resposta do sensor de grafite e grafite modificado com poliaminofenóis ..	86
5.3	Cálculo da atividade enzimática em solução	88
5.4	Biossensor potenciométrico.....	92
5.4.1	<i>Otimização da resposta do biossensor</i>	97
5.5	Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados.....	104
5.6	Análises de microscopia de força atômica.....	108
5.7	Avaliação da inibição da enzima AChE pelo Diclorvós	109
5.8	Avaliação do tempo de vida do biossensor potenciométrico.....	115
5.9	Confirmação do Diclorvós no CG-MS	116

5.10	Avaliação da exatidão, precisão e comparação de métodos	117
6	<i>Conclusões</i>	124
7	<i>Propostas de continuidade do trabalho</i>	127
8	<i>Produção científica</i>	128
8.1	Artigos Científicos	128
8.2	Participação e trabalhos apresentados em congressos, simpósios e reuniões científicas	129
9	<i>Referências Bibliográficas</i>	131

Lista de Figuras

<i>Figura 1 – Vendas de defensivos agrícola no Brasil safra de 1990 a 2007. (Fonte: ABIQUIM (http://www.abiquim.org.br- acessado dia 07/10/2008)</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 – Porcentagem de amostras em que foi detectada a presença de resíduos de agrotóxicos em algumas culturas. (Fonte: IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária-Laboratório de Análise de Resíduos-2007)</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3 – Porcentagem de amostras que apresentaram resíduos acima do permitido não autorizado para a cultura. (Fonte: IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária-Laboratório de Análise de Resíduos - 2003)</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4 – Exemplos de compostos organofosforados empregados como inseticidas.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5 – Esquema da reação envolvida na inibição da enzima AChE pelo 2,2-diclorovinil dimetil fosfato.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6 – Modelo Chave-fechadura. A interação entre a enzima (estrutura rígida) e seu substrato.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 7 – Modelo de encaixe induzido. A ligação inicial do substrato a enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 8 – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reações catalisadas por enzimas (concentração de enzima constante).</i>	<i>28</i>
<i>Figura 9 – Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-burk, usado para determinar o valor de K_m e $V_{máx}$.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10 – Esquema de transmissão de impulsos nervosos entre neurônios. A) fenda sináptica.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 11 – Junções neuromusculares ou placas motoras-sinapse entre terminações do axônio e os músculos.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 12 – Reação catalítica da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....</i>	<i>35</i>

<i>Figura 13 - Representação esquemática de um biossensor.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 14 – Esquemas de tipos de biossensores. 1-primeira geração; 2-segunda geração; 3-terceira geração M - mediador reduzido; M⁺⁺ - mediador oxidado. 41</i>	<i>41</i>
<i>Figura 15 – Esquemas dos principais métodos de imobilização enzimática.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 16 – Esquema proposto para a imobilização de enzima pelo método de ligação covalente cruzada utilizando o glutaraldeído.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 17 – Esquema geral de uma reação eletroquímica-química-química (ECC).</i>	<i>53</i>
<i>Figura 18 – Estrutura dos aminofenóis.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 19 – Estruturas do processo de oxidação eletroquímico e processo químico do o-aminofenol.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 20 – Proposta para acoplamento 1-4 via nitrogênio.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 21 – Variação linear do potencial no tempo, com inversões periódicas(1): varredura direta(a), potencial de inflexão(b), varredura inversa(c); Resposta de corrente-potencial na voltametria cíclica(2).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 22 – (A) Comportamento do potencial aplicado e da corrente resultante relativo a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 23 –Interface eletrodo-solução(A): IHP-plano interior de Helmholtz; OHP-plano exterior de Helmholtz; circuito elétrico equivalente(B).....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 24 – Equipamentos utilizados para o fornecimento de água(A), medidas de pH(B) e limpeza dos eletrodos por ultra-som(C).....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 25 – Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 26 – Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 27 – Equipamentos utilizados nas análises morfológicas dos eletrodos modificados.</i>	<i>66</i>

- Figura 28 – Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. R_1 , solução transportadora; P, bomba peristáltica (figura 29 A); W, resíduo; L, alça de amostragem; I, válvula injetora (figura 29 B); A, soluções padrões de pesticida ou cloreto de acetilcolina preparados em solução transportadora; D, detector potenciométrico..... 67*
- Figura 29 – Equipamentos do sistema em fluxo: A- Bomba peristáltica; B-Injetor comutador de geometria circular..... 67*
- Figura 30 – Célula eletroquímica usada como sistema de detecção potenciométrica. a-suporte de Teflon; b-pino de contato;c-Revestimento de teflon; d-Peça de latão; e-disco de grafite; f- anel de vedação; g-Peça de acrílico; h- eletrodo de referência Ag/AgCl. 68*
- Figura 31 – Procedimento para imobilização da enzima acetilcolinesterase..... 74*
- Figura 32 – Procedimento de extração líquido-líquido utilizado 79*
- Figura 33 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KNO_3 , 100 mV s^{-1} 82*
- Figura 34 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 2-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico (B). 83*
- Figura 35 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 3-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico(B). . 84*
- Figura 36 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 4-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico (B). 85*

Figura 37 – Resposta potenciométrica de eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (a), poli(3-aminofenol) (b), poli(4-aminofenol) (c) e eletrodo de grafite (d) em relação à solução de ácido acético 5mmol L⁻¹..... 87

Figura 38 – Equilíbrio ácido-base para indicador púrpura de bromocresol. 89

Figura 39 – Espectro de absorção do Púrpura de Bromocresol em diferentes valores de pH. [Indicador]=0,1 mmol L⁻¹; (a) pH= 3,20; (b) pH = 4,70; (c) pH = 5,97; (d) pH = 6,66; (e) pH = 7,40; (f) pH = 8,70. 90

Figura 40 – Intensidade de absorção do indicador púrpura de bromocresol a 430 nm em função do pH 91

Figura 41 – Absorvância do púrpura de bromocresol a 430 nm em função do tempo de reação enzimática; Inserção A: região linear da curvas. Condições: pH inicial 7,90; tampão fosfato 1mmol L⁻¹; púrpura de bromocresol 1mmol L⁻¹; cloreto de acetilcolina 1mmol L⁻¹; AChE (1U)..... 91

Figura 42 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função da concentração do substrato. Condições experimentais: Solução de cloreto de acetilcolina 0,5 a 100 mmol L⁻¹, preparadas em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Atividade enzimática teórica imobilizada: 30U. 94

Figura 43 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/AChE) em função da concentração do substrato. Condições experimentais: Solução de cloreto de acetilcolina 0,5 a 100 mmol L⁻¹, preparadas em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Atividade enzimática teórica imobilizada: 30U..... 95

Figura 44 – Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk; (A) biossensor potenciométrico (grafite/AChE); (B) biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE). 96

Figura 45 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função do pH do meio reacional. Condições experimentais: 150 μ L de cloreto de acetilcolina 5,0 mmol L⁻¹ preparado em

solução transportadora contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e tampão fosfato 1 mmol L^{-1} no pH em estudo; vazão: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ 99

Figura 46 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/ poli(4-aminofenol)/AChE) em função da concentração do tampão fosfato ($1,0$ a 100 mmol L^{-1}) na solução transportadora pH $7,40$. Condições experimentais: $150 \text{ } \mu\text{L}$ de cloreto de acetilcolina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, contendo tampão fosfato na concentração em estudo; vazão: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ 101

Figura 47 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função da vazão para diferentes volumes de injeção: ($\bullet$) 100 ; ($\blacksquare$) 150 ; ($\blacktriangle$) 200 e ($\circ$) $250 \text{ } \mu\text{L}$. Condições experimentais: $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de acetilcolina preparado em solução transportadora contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão fosfato e $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pH $7,40$ 102

Figura 48 – Tempo de restabelecimento da linha base (TRL) em função da vazão para diferentes volumes de injeção: ($\bullet$) 100 ; ($\blacksquare$) 150 ; ($\blacktriangle$) 200 e ($\circ$) $250 \text{ } \mu\text{L}$. Condições experimentais: $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de acetilcolina preparado em solução transportadora contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão fosfato e $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pH $7,40$ 103

Figura 49 – Voltametria cíclica em $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, 100 mV s^{-1} . (a) grafite/poli(4-aminofenol)/AChE; (b) grafite/poli(4-aminofenol). 104

Figura 50 – Gráfico de Nyquist(A) e Bode (B) obtidos em $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, frequência: 100 KHz e $0,02 \text{ Hz}$; amplitude 10 mV . (Δ) grafite/poli(4-aminofenol); ($\circ$) grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. 105

Figura 51 – Modelo de circuito equivalente usado para simular os espectros de impedância para as superfícies de grafite/poli(4-aminofenol) e grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. Q_1 : capacitância da dupla camada elétrica; Q_2 : capacitância da camada de modificação: grafite/poli(4-aminofenol) e biossensor de grafite/poli(4-aminofenol)/AChE; Z_W : resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica. 107

Figura 52 – Imagens de MFA para eletrodos modificados. (A) grafite/poli(4-aminofenol); (B) grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. 109

Figura 53 – Efeito da inibição da AChE pelo Diclorvós e posterior reativação da enzima com TMB-4. (A), cloreto de acetilcolina $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B), (C), (D) diclorvós $0,01 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente; (E), (F), (H) e (K) reativação da enzima imobilizada com TMB-4 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (G), (I) e (J) diclorvós $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com tempo de incubação crescente. Solução Transportadora: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e Tampão fosfato $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH = 7,40.; Vazão = $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem $150 \text{ } \mu\text{L}$. Atividade enzimática imobilizada 10 U. 111

Figura 54 – Inibição da resposta potenciométrica em função da concentração de Diclorvós, sem parada de fluxo. (A), resposta potenciométrica na presença de 20 mmol L^{-1} de substrato; (B), (C), (D), (E), (F) e (G), injeção de diclorvós, 10, 20, 40, 50, 70 e $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente; (H) reativação da enzima com TMB-4 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; Condições experimentais: Solução transportadora: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e tampão fosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 7,40.; Vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem $150 \text{ } \mu\text{L}$. Atividade da enzima imobilizada: 10 U. 113

Figura 55 – Efeito do tempo de estocagem na resposta potenciométrica do biossensor grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. Condições experimentais: Solução Transportadora: KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e Tampão fosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 7,40.; Vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem $150 \text{ } \mu\text{L}$. Atividade enzimática imobilizada 10U, solução de cloreto de acetilcolina 20 mmol L^{-1} 116

Figura 56 – Cromatograma (A), espectro dos íons moleculares (B) do Diclorvós no modo SIM(“Single ion monitoring”). 117

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Produtividade brasileira para algumas culturas nas safras de 1990 e 2007.....</i>	<i>2</i>
<i>Tabela 2 - Porcentagem de amostras que apresentaram resíduos acima do permitido e não autorizado para a cultura.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 3 – Resultados consolidados do PARA 2007</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 4 – Classificação de agrotóxicos quanto ao grupo e classe química</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 5 - Classificação de agrotóxicos quanto à toxicidade.</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 6 – Comparação entre as diferentes formas de imobilização.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 7 – Espécies analíticas determinados utilizando biossensores com transdução potenciométrica.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 8 – Biossensores eletroquímicos empregando eletrodos modificados.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 9 – Figuras de mérito para o sensor de grafite e sensores de grafite modificados com filmes de poliaminofenóis em função da concentração de ácido acético.</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 10 – Figuras de mérito para o biossensor de grafite/AChE e biossensor Grafite/poli(4-aminofenol)/AChE em função da concentração de cloreto de acetilcolina.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 11 – Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist.</i>	<i>107</i>
<i>Tabela 12 – Recuperações para extratos de amostras de batata fortificadas com Diclorvós em três níveis de concentração obtidas com método proposto (biossensor grafite/poli(4-AMP)/AChE).</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 13 – Recuperações para amostras de batata fortificadas com Diclorvós em três níveis de concentração obtidas com método proposto, CG-DCE e CG-MS.</i>	

Lista de Abreviaturas e Siglas

AChE, Acetilcolinesterase;

ΔE , variação de potencial;

AMP, aminofenol;

ASB, albumina de soro bovino;

CAC, cloreto de acetilcolina;

CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência;

ECS, eletrodo de calomelano saturado;

EIE, espectroscopia de impedância eletroquímica;

E_{pa} , potencial anódico;

E_{pc} , potencial catódico;

EQM, eletrodo quimicamente modificado;

I, Inibição da atividade enzimática;

K_M^{app} , constante aparente de Michaelis-Menten;

LD, limite de detecção;

LMR, limite máximo de resíduo;

LQ, limite de quantificação;

LR, faixa linear de resposta;

MFA, microscopia de força atômica;

PARA, Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico

R_{cm} , resistência da camada de modificação;

TMB-4, 1,1'- Trimetileno- bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima;

TRL, tempo de restabelecimento de linha base;

U, atividade enzimática;

V_{max} , velocidade máxima;

VR, velocidade de resposta;

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor potenciométrico a base de enzima acetilcolinesterase (AChE) usando como transdutor, eletrodos de grafite e grafite modificado com filmes de poli(2-aminofenol), poli(3-aminofenol) e poli(4-aminofenol). A capacidade de transdução destes eletrodos em relação ao ácido acético foi avaliada em fluxo e os eletrodos de grafite e grafite modificado com poli(4-AMP) apresentaram características analíticas promissoras para detecção potenciométrica. A enzima AChE foi imobilizada por ligação covalente cruzada, nas superfícies de grafite e grafite/poli(4-AMP). Figuras de mérito (LD, LQ, faixa linear de resposta, sensibilidade, tempo de restabelecimento de linha base, velocidade de resposta) para os dois biossensores foram avaliadas em função da concentração do substrato. A resposta do biossensor (grafite/poli(4-AMP)/AChE) foi otimizada em relação a diferentes condições experimentais (pH, concentração de tampão fosfato, concentração de substrato, vazão e volume de amostra). Medidas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e imagens de Microscopia de Força Atômica(MFA) dos eletrodos de grafite com poli(4-AMP) e do biossensor (grafite/poli(4-AMP)/AChE) foram realizadas para confirmar modificações provocadas pela imobilização da enzima AChE.

A porcentagem de inibição foi avaliada usando o diclorvós em diferentes concentrações e tempo de incubação. A relação atividade enzimática imobilizada vs concentração do substrato foi otimizada para propor um método sem parada de fluxo. Os LD e LQ foram $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,18 \text{ mg L}^{-1}$) e $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,53 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. Recuperações em amostra de batata mostraram para um intervalo de confiança de 95%, que o método foi suficientemente exato para os níveis de concentração de diclorvós avaliados. Resultados de coeficientes de variação relativo, e de variação global, validam a precisão do método, além de serem comparáveis a valores de precisão obtidos por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons e espectrométrica de massa.

Os resultados mostraram que o eletrodo de grafite/poli(4-AMP) apresentou biocompatibilidade para imobilização de AChE e o biossensor pode ser usado como sistema de detecção em fluxo para determinação de resíduos de agrotóxicos inibidores da AChE em amostras de alimentos de origem vegetal.

Abstract

In this work a potentiometric biosensor based of enzyme acetylcholinesterase (AChE) was developed. As transducer, graphite electrodes, and graphite modified with film of poly (2-aminophenol), poly (3- aminophenol) and poly(4-aminophenol) were used. The ability of these electrodes in the transduction in function of the acetic acid concentration was evaluated in a flow system, and the electrodes of graphite and graphite modified with poly(4-AMP) showed promising analytical characteristics for potentiometric detection. The enzyme AChE was immobilized by cross-linking on the surfaces of graphite and graphite / poly(4-AMP). Figures of merit (detection limit, quantification limit, linear response range, linearity, sensitivity, washing time, velocity of response) for the two biosensors were measured in function of the substrate concentration. The response of the biosensor (graphite/poly(4-AMP)/AChE) was optimized for different experimental conditions (pH, phosphate buffer concentration, substrate concentration, flow rate and injection volume). Studies by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry and AFM analysis for graphite electrodes, with poly (4-AMP) and graphite / poly (4-AMP) / AChE changes were made to confirm the modifications in the electrodes.

The percentage of inhibition of AChE enzyme inhibitor has been evaluated using the dichlorvos in different concentrations and time of incubation. The enzyme activity immobilized vs. concentration of the substrate was optimized to propose a method without stopped flow to a maximum of inhibition. The detection and quantification limits of $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.18 mgL^{-1}) and $2.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.53 mg L^{-1}) for dichlorvos, respectively, were obtained without stopped flow. Recoveries in potato sample showed that the method was sufficiently accurate for the levels of dichlorvos evaluated at a confidence interval of 95%. Coefficient of variation and coefficient of variation global validated the precision of the method. These results were comparable to values of precision obtained by gas chromatography with electron-capture detection and mass spectrometry.

The results showed that the graphite electrode/poly(4-AMP) was biocompatible for imobilization of the enzyme AChE and the biosensor can be used as detector coupled with flow injection analysis for determination of waste pesticides inhibitors of AChE in foods of vegetal origin.

1 Introdução

O crescente aumento da produtividade agrícola está associado à incorporação de várias tecnologias ao processo de modernização da agricultura, dentre elas, o uso de produtos químicos agressivos ao meio ambiente e a qualidade de vida do ser humano. Dentre estes diferentes produtos químicos destacam-se os agrotóxicos, utilizados em abundância para prevenir a queda na produtividade agrícola devido à ocorrência de pragas. (CAMPANHOLA *et. al.*, 1997). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA e de acordo com o decreto federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, agrotóxicos e afins são: *“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”*.

Os agrotóxicos têm sido usados por mais de sessenta anos devido à sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que infestam as diferentes culturas, garantindo assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, o retorno econômico da atividade agrícola. Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA, a produtividade para algumas culturas tem aumentado consideravelmente (Tabela 1).

Tabela 1 - Produtividade brasileira para algumas culturas nas safras de 1990 e 2007.

Cultura	1990/ kg hec ⁻¹	2007/ kg hec ⁻¹	Aumento na produtividade / %
Côco-da-bahia	3.433	7.126	107,6
Laranja	15.352	22.270	45,1
Maçã	18.249	26.285	44,0
Mamão	32.105	48.337	50,6
Melancia	13.033	19.160	47,0
Melão	10.522	22.073	109,8
Pêra	8.714	11.226	28,8
Pêssego	6.672	9.896	48,3
Soja (em grão)	1.732	2.230	28,8
Tangerina	14.716	20.207	37,3
Tomate	37.147	58.627	57,8
Trigo (em grão)	1.154	1.975	71,1

Fonte: MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (www.mapa.gov.br) acesso em fevereiro/2008.

Este aumento de produtividade se deve ao uso cada vez maior de agrotóxicos, o que pode ser confirmado pelos dados do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas-SINDAG (SINDAG, 2006). Em 2001, o Brasil consumiu 328.413 toneladas de produtos formulados, correspondendo a 151.523 toneladas de ingredientes ativos. Em 2005, movimentou cerca de 4 bilhões de dólares com a venda de agrotóxicos, totalizando um aumento de 390% no volume de recursos movimentados com a venda de agrotóxicos entre as safras de 1990 a 2007 (Figura 1). Desta forma, considerando-se o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos, o Brasil aparece em 7º lugar no “ranking”. O emprego de agrotóxicos nos Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais representa atualmente 50% do total utilizado no País. A maior utilização dessas substâncias é na agricultura, mas também em saúde pública, para a eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. São utilizados também no tratamento da madeira para construção, no armazenamento

de grãos a sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária, entre outras aplicações (GAZETA MERCANTIL, 2006).

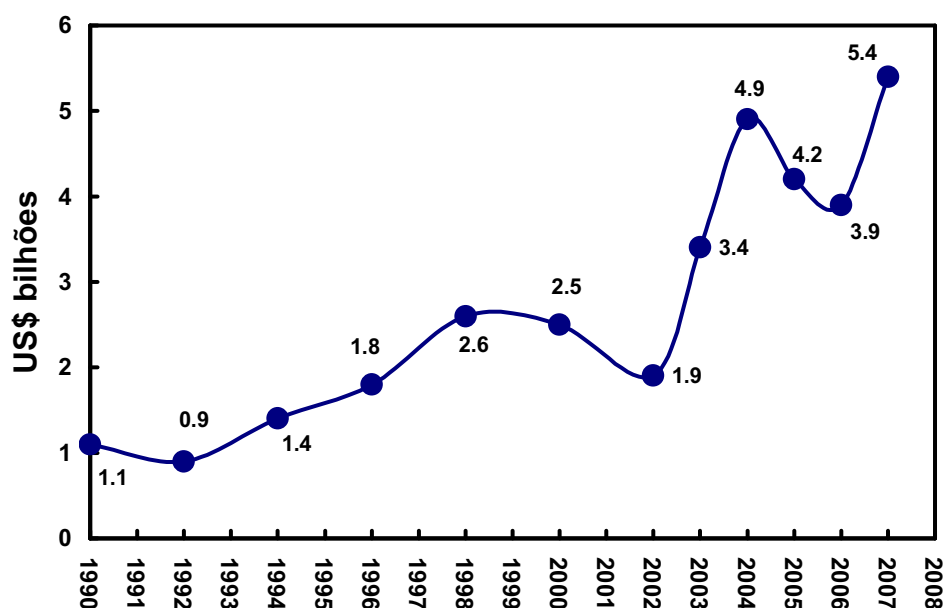


Figura 1 – Vendas de defensivos agrícola no Brasil safra de 1990 a 2007. (Fonte:

ABIQUIM (<http://www.abiquim.org.br>- acessado dia 07/10/2008)

Em decorrência do uso intensivo e do tempo de meia vida no ambiente, os agrotóxicos persistem na forma de “resíduos”. De acordo com o DECRETO N° 98.816 de janeiro de 1990, resíduos de agrotóxicos são definidos como: “*substância ou mistura de substâncias remanescentes, existentes em alimentos ou no meio ambiente, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como, produtos de conversão, degradação e metabólitos, considerados toxicológica e ambientalmente importantes*”. Estes resíduos podem persistir gerando diversos problemas relacionados à saúde pública e ao desequilíbrio ambiental, incluindo: intoxicações de agricultores, contaminações de alimentos, água e solos, resistência à espécies combatidas em relação as substâncias empregadas e danos em espécies não visadas (KAMRIN, 1997).

O uso de agrotóxicos no processo de produção agrícola e a conseqüente contaminação dos alimentos (Figura 2 e Figura 3) têm sido alvos de constante preocupação no âmbito da saúde pública. Isso torna necessária, a realização da avaliação toxicológica e o estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à sua utilização, bem como de programas e ações de controle, cientificamente embasados e tecnicamente aplicáveis.

Existe um grande número de registros de agrotóxicos por cultura e também muitos produtos comerciais no mercado. Geralmente, os agricultores aplicam vários tipos de agrotóxicos em uma mesma cultura, assim os resíduos são encontrados em limites acima do permitido e não são autorizados para determinada cultura (Figura 2, Figura 3, Tabela 2, Tabela 3).

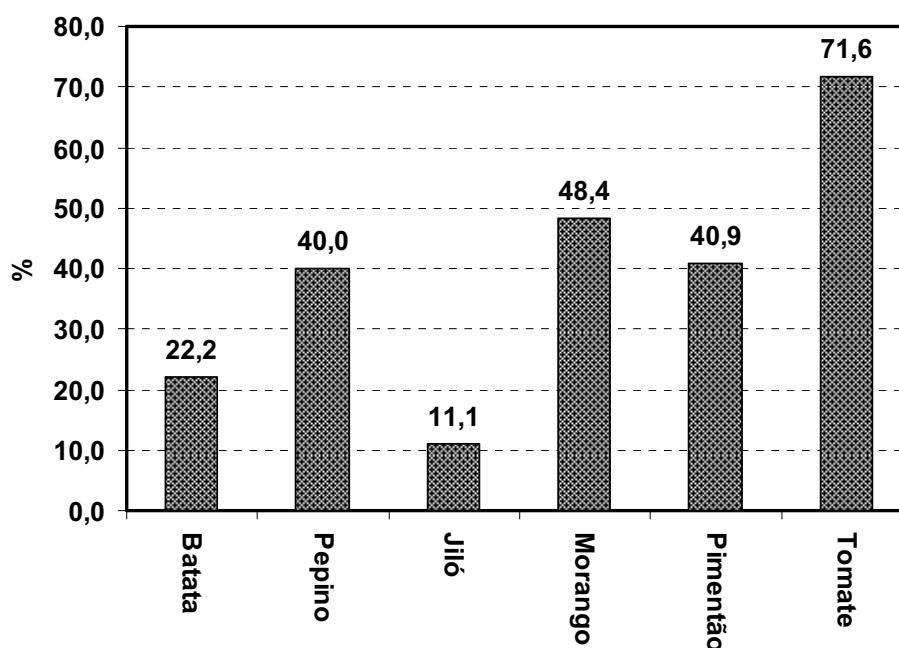


Figura 2 – Porcentagem de amostras em que foi detectada a presença de resíduos de agrotóxicos em algumas culturas. (Fonte: IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária-Laboratório de Análise de Resíduos-2007)

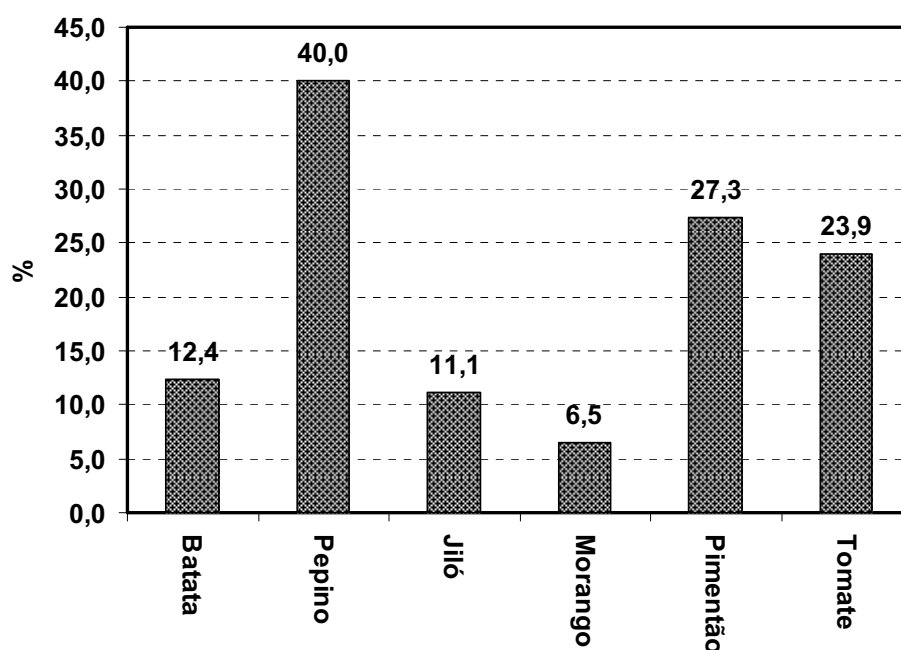


Figura 3 – Porcentagem de amostras que apresentaram resíduos acima do permitido não autorizado para a cultura. (Fonte: IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária-Laboratório de Análise de Resíduos - 2003)

Tabela 2 - Porcentagem de amostras que apresentaram resíduos acima do permitido e não autorizado para a cultura

Amostras insatisfatórias* / %						
Cultura	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Alface	8,64	6,67	14,0	46,45	28,68	40,00
Banana	6,53	2,22	3,59	3,65	N	4,32
Batata	22,2	8,65	1,79	0	0	1,36
Cenoura	0	0	19,54	11,3	N	9,93
Laranja	1,41	0	4,91	4,70	0	6,04
Mamão	19,5	37,56	2,50	0	N	17,21
Maçã	4,04	3,67	4,96	3,07	5,33	2,9
Morango	46,03	54,55	39,07	N	37,68	43,62
Tomate	26,1	0	7,36	4,38	2,01	44,72

N - análises não realizadas. *Resíduo de agrotóxico não autorizado para cultura ou níveis de resíduos acima do Limite Máximo de Resíduo. Fonte: ANVISA/ Programa Nacional da Análise de Resíduos – PARA;

Tabela 3 – Resultados consolidados do PARA 2007

Cultura	Total de Amostras Analisadas	Amostras insatisfatórias		Princípios ativos encontrados nas amostras insatisfatórias
		Total	%	
Alface	135	54	40,0	NA - ditiocarbamatos, metamidofós, acefato, clorpirifós
Batata	147	2	1,36	NA - Endossulfan
Morango	94	41	43,62	NA - metamidofós, clorotalonil, folpete, tetradiófona, procloraz, endossulfan, acefato, captana, Tetradiófona, pirimifós-etílico, cirpoconazol, dimetoato, clorpirifós, profenofós. Acima do LMR- difenocanazol, ditiocarbamatos, iprodiona, azoxistrobina, procimidona.
Tomate	123	55	44,72	NA - metamidofós, clorpirifós, monocrotofós, endossulfan.
Maçã	138	4	2,90	NA - azinfós metílico, lambdacialotrina, diclorvós.
Banana	139	6	4,32	NA-procloraz, lambdacialotrina. Acima do LMR - tebuconazol, carbendazin
Mamão	122	21	17,21	NA- clorpirifós, bromopropilato, dimetoato, lambda-cialotrina, endosulfam, acefato. Acima do LMR- carbendazim, tetradiófona, clorotalonil
Cenoura	151	15	9,93	NA- fenitrotriona, procloraz, profenofós. Acima do LMR- triazofós

NA – não autorizado para cultura; LMR- Limite Máximo de Resíduo. Fonte: ANVISA/ Programa Nacional da Análise de Resíduos – PARA;

O uso indevido de agrotóxicos não permitidos para as culturas monitoradas, bem como de agrotóxicos autorizados, porém com resíduo encontrado acima do limite máximo permitido de resíduo (LMR), podem ser observados na tabela 3. O resultado mais grave foi à detecção de monocrotofós na cultura de tomate, ingrediente ativo que não tem mais uso autorizado no Brasil desde 30/11/2006, em virtude, principalmente, de sua elevada toxicidade e neurotoxicidade. O aumento nos resíduos de agrotóxicos encontrados em tomate,

alface e morango em 2007 pode ser correlacionável com o súbito acréscimo observado na importação de agrotóxicos por países da América do Sul, incluindo o Brasil, particularmente, os agrotóxicos organofosforados.

O setor agrícola no Brasil é forte principalmente no que se refere ao comércio internacional de alimentos, no entanto é imprescindível o atendimento às exigências de países importadores. Em geral, os produtores têm dificuldades em determinar o momento mais oportuno de se aplicar o agrotóxico e acabam por realizar pulverizações freqüentes. Com isso, as dificuldades para exportação aumentaram muito nos países em vias de desenvolvimento (*FELLENBERG, 1980*). Desta forma, tornou-se necessária a determinação de níveis de resíduos, além de um controle nos intervalos de segurança, para que produtos de origem vegetal sejam comercializados nacional e internacionalmente. Estas ações são importantes para referenciar os produtores quanto às boas práticas agrícolas e, caso estas não estejam sendo seguidas, permitir a tomada de medidas preventivas e de controle antes que resíduos desses contaminantes químicos afetem o meio ambiente e a saúde da população ou causem graves perdas econômicas.

Por serem muito diversificados, os agrotóxicos utilizados nos alimentos, e encontrados em concentrações muito baixas (da ordem de $\mu\text{g/kg}$), e também por poderem estar presentes em uma grande variedade de matrizes, cada uma com suas particularidades, a identificação e a quantificação destes compostos nos alimentos é uma análise extremamente complexa. Atualmente, o número de laboratórios capacitados para este fim no Brasil é ainda insuficiente, demonstrando a importância da concentração de esforços em atividades de pesquisa a fim de subsidiarem esses tipos de informações.

2 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi propor uma metodologia alternativa aos métodos clássicos, usando o acoplamento das técnicas, análise por injeção em fluxo e detecção potenciométrica para quantificar resíduos de diclorvós em alimentos de origem vegetal, abrangendo:

- Desenvolvimento de biossensor potenciométrico a base de acetilcolinesterase imobilizada em eletrodos de grafite recoberto com filmes de poliaminofenóis;
- Desenvolvimento de metodologias baseadas em extração, pré-concentração, separação e detecção de resíduos de pesticidas da classe organofosforado, aplicados a amostras de alimentos de origem vegetal;
- Caracterizar as figuras de mérito do método proposto tais como: curvas analíticas, linearidade, detectabilidade (limite de detecção e limite de quantificação);
- Avaliar a exatidão e precisão do método proposto através de ensaios de fortificação e recuperação em amostras de alimentos de origem vegetal, comparando os resultados obtidos à cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons e cromatografia gasosa com detecção espectrométrica de massa.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Agrotóxicos

As primeiras substâncias utilizadas como agrotóxicos, foram substâncias tóxicas de origem natural, tais como piretro, nicotina, além de substâncias inorgânicas como mercúrio e enxofre. O uso de agrotóxicos sintéticos se deu com a descoberta do poder inseticida do DDT [1,1,1-tricloro-2-bis(p-clorofenila)-etano], ocorrido por volta de 1940 (*YOKOMIZO, et al., 1985*). Desde então, inúmeros outros princípios ativos têm sido intensamente utilizados, e dependendo de sua finalidade ou forma de ação são classificados em grupos e classes químicas, conforme descrito na tabela 4. São utilizados com diversas funções, sendo algumas delas: herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas dentre outras. As funções básicas destes pesticidas na agricultura são: proporcionar alta produtividade, boa “qualidade” dos produtos e redução de gastos com mão-de-obra e energia.

Dentre os agrotóxicos, os inseticidas e herbicidas são os que representam as classes de compostos de maior preocupação para a sociedade. Considerando-se o uso intensivo na agricultura, destacam-se: os organofosforados, carbamatos e piretróides. As substâncias destas classes têm sido utilizadas em diversos tipos de plantações para combater pragas, nos domicílios contra moscas e mosquitos, além de empregadas por órgãos de saúde pública no combate a vetores de doenças (por exemplo, controle do *Aedes Aegypti*, mosquito da dengue). Em plantações, são aplicados nas partes aéreas de várias culturas como: alho, cebola, trigo, arroz, milho, frutos, hortaliças, feijão, batata, algodão, amendoim, soja, cacau, café e

centeio, além de serem usadas também no armazenamento de grãos e farelo de trigo (IPCS, 2001).

Tabela 4 – Classificação de agrotóxicos quanto ao grupo e classe química

Grupo e função	Classe
Inseticidas (controle de insetos)	Carbamatos
	Organofosforados
	Organoclorados
	Benzoiluréias substituídas
Acaricidas (controle de ácaros)	Organometálicos
	Ftalimidas
Fungicidas (controle de fungos)	Benzimidazóis
	Imidazóis
	Acilaminas
	Ditiocarbamatos
	Dicarbamatos
	Inorgânicos (Sulfato de cobre)
	Triazinas
Herbicidas (controle de plantas daninhas)	Uréias
	Uracilas
	Tiocarbamatos
	Dinitrofenóis
	Amidas substituídas
	Bipiridínicos
	Fenóis
	Ácidos Benzoicos
	Ácidos fenoxialifáticos
	Piridinas
Molusquicidas (controle de Moluscos)	Metaldeído
Rodenticidas (controle de roedores)	Fosfito de zinco
	Fósforo branco
	Cumarina

Fonte: EPA- Environmental protection Agency- Estados Unidos – www.epa.gov; acesso em 02/01/2007.

Teoricamente, os agrotóxicos devem exercer uma ação tóxica específica para um dado organismo alvo (BOLOGNESI, C. & MORASSO, G., 2000). Há casos onde a ação é específica, como por exemplo, os herbicidas sistêmicos que atuam através da seiva das plantas. Porém, na maioria das vezes, eles não apresentam a ação específica desejada e atingem todo o ecossistema.

Os agrotóxicos são substâncias xenobióticas, que como os fármacos, têm a característica de ação tóxica em pequenas quantidades, porém apresentam efeitos

tóxicos acima de uma determinada dose. Desta forma, todo trabalho realizado atualmente, com relação ao monitoramento de resíduos de agrotóxicos, leva em consideração esta característica, buscando definir limites (doses) de xenobióticos que não causem danos à saúde e ferramentas para investigar se estes limites estão sendo obedecidos.

Os agrotóxicos são em geral substâncias tóxicas, podendo sua utilização oferecer ou não perigo para o ser humano. A segurança que se pode ter em seu uso está diretamente relacionada com a toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo de exposição a ele durante a aplicação. Os principais problemas acarretados pelos agrotóxicos são resultados de sua utilização indiscriminada. Desta forma, produtos considerados pouco tóxicos, como os piretróides de uso doméstico, não são necessariamente inócuos quando utilizados de forma contínua e direta. (*SILVA & GULNAR, 1998; CLEMENTI et al., 2007*).

A contaminação por agrotóxicos pode ocorrer de forma direta ou indireta (*CLEMENTI et al, 2007*). A primeira é consequência da exposição excessiva das pessoas que trabalham com estas substâncias. A forma indireta resulta da exposição da população aos agrotóxicos, seja devido à ocorrência de acidentes, seja pela contaminação do ambiente por resíduos industriais, ou por consequência, de aplicações pouco criteriosas ou por contaminação de produtos de consumo.

A toxicidade dos agrotóxicos pode ser compreendida através das suas características físico-químicas. Os organofosforados, por exemplo, apresentam o mesmo comportamento dos organoclorados, que se acumulam em gorduras (*KAMRIN, 1997*). São primariamente transformados, em sistemas aquáticos, tendo baixo potencial de bioacumulação, no entanto seus metabólitos podem apresentar toxicidade maior que o próprio pesticida original (*BARCELÓ, 1993*). A OMS

(Organização Mundial de Saúde) recomenda a classificação por periculosidade dos agrotóxicos em classes, segundo os valores de DL₅₀ (dose letal mediana) em camundongos, ou seja, a dose a partir da qual se observa a morte de 50% dos animais de uma população exposta. A tabela 5 mostra a classificação dos agrotóxicos por periculosidade, segundo a recomendação da Organização Mundial de Saúde.

Tabela 5 - Classificação de agrotóxicos quanto à toxicidade.

Classe toxicológica	Categoria	Cor da faixa no rótulo	DL 50 /mg kg ⁻¹
I	Extremamente tóxico	Vermelha	< 5
II	Muito tóxico	Amarela	5 a 50
III	Moderadamente tóxico	Azul	50 a 500
IV	Pouco tóxico	Verde	500 a 5000

Fonte: GALLO *et al*, 1988.

A regulamentação quanto ao uso de agrotóxicos está baseada não só no controle das classes química e toxicológica dos princípios ativos autorizados. Também são estabelecidos níveis de referência, que correspondem à quantidade máxima de resíduo de determinado agrotóxico que pode ser aceita em cada alimento, quando destinado ao consumo humano (NUNES & RIBEIRO, 1999; CODEX, 2008). Teoricamente o estabelecimento e o cumprimento destes Limites Máximos de Resíduos (LMR), permitem preservar a saúde do consumidor da ação tóxica. Desta forma, vários organismos nacionais e internacionais estão encarregados de estabelecer tais limites. Em 1962 foi criada, a nível internacional, a Codex Alimentarius Commission, um órgão da ONU, subsidiado pela FAO (Food and Agriculture Organization) e pela OMS. A contribuição do Codex, neste

contexto, é de estabelecer valores de LMR que podem ser aceitos livremente pelos mais de 150 países membros da comissão.

De maneira geral, o acompanhamento e colaboração tecnológica e científica do Codex tem sido feito pelo JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues), que consiste em um grupo de peritos da OMS e de especialistas da FAO em resíduos de agrotóxicos em alimentos e no meio ambiente. Os peritos da FAO estimam os valores de LMR em diversos alimentos, para os agrotóxicos cujos valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA), já tenham sido fixados pelo grupo e especialistas da OMS. Os valores estabelecidos pela JMPR são baseados em dados toxicológicos, e os LMR têm como base os métodos de aplicação dos agrotóxicos, levando em consideração a concentração residual obtida nos estudos de degradação do composto. Os valores de IDA e de LMR são referendados por bases distintas de dados, mas estão convenientemente relacionados, de modo a assegurar que os agrotóxicos utilizados não apresentem nenhum risco à saúde dos consumidores.

Nos Estados Unidos, o órgão responsável pelo estabelecimento dos valores de LMR é a EPA (Environmental Protection Agency), e o responsável pelo cumprimento dos limites fixados é o FDA (Food and Drug Administration). Tais órgãos contam com legislação própria e os valores de referência estipulados têm sido freqüentemente revistos, uma vez que os métodos analíticos têm se tornado cada vez mais eficazes.

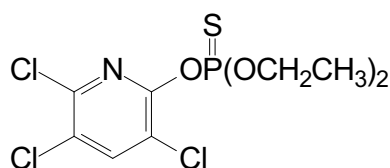
Na Comunidade Européia existem diretrizes que estabelecem os LMR, e estas devem ser adotadas por todos os países membros. Tais diretrizes variam conforme a classe do agrotóxico e os tipos de alimentos estudados. Cada país membro da Comunidade Européia é encarregado de executar programas de

inspeção para impedir que alimentos de origem vegetal ou animal que contenham resíduos superiores aos estabelecidos sejam colocados no mercado (NUNES & RIBEIRO, 1999; CODEX, 2008).

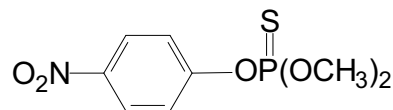
O Brasil, como membro da ONU, a princípio segue as orientações do CODEX. Casos específicos são estabelecidos através de portarias da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), publicadas no Diário Oficial da União.

3.1.1 Organofosforados

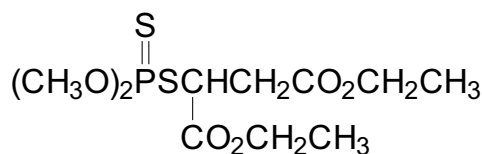
Os organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfórico ou do ácido ditiosfórico que contêm, sem exceção, um átomo central de fósforo pentavalente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação, como pode ser visto na figura 4.



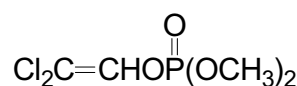
O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridilfosforotioato
Clorpirifós



O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato
Metil Paration



Dietil (dimetoxitiofosforiltio)succinato
Malation



2,2-diclorovinil dimetil fosfato
Diclorvós

Figura 4 – Exemplos de compostos organofosforados empregados como inseticidas

Apresentam efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os pesticidas organoclorados. Tal como os hidrocarbonetos clorados, os organofosforados concentram-se, nos tecidos gordurosos.

A atividade depende dos diversos radicais ligados ao átomo de fósforo e, às vezes, pequenas modificações nestes radicais podem afetar grandemente a toxicidade do composto. A substituição de radicais metil por radicais etil aumenta a toxicidade do composto. Por exemplo, o etil paration é mais tóxico que o metil paration, assim como clortion e malation. Quase todos os agrotóxicos organofosforados apresentam grupos metil, etil ou isopropil (BATISTA, 1974).

Os agrotóxicos organofosforados agem no sistema nervoso central do inseto, inibindo as enzimas colinesterases. A inibição da colinesterase ocorre principalmente por fosforilação da enzima, o que a deixa inativa. A inibição da atividade dessa enzima leva ao acúmulo de acetilcolina, provocando estimulação descontrolada do sistema nervoso e levando o inseto afetado à morte (CATÁLOGO, 2007). A presença destes compostos em água e alimentos levanta um perigo potencial à saúde humana, pois assim como nos insetos, estes compostos inibem a acetilcolinesterase que participa na transmissão de impulsos nervosos em seres humanos.

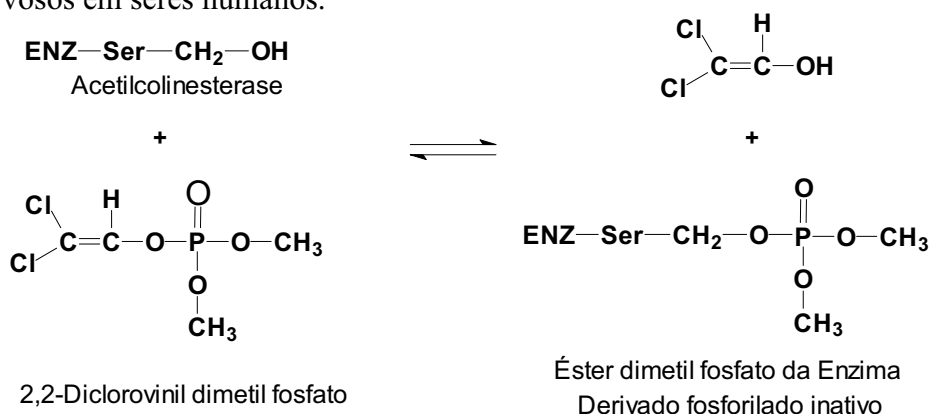


Figura 5 – Esquema da reação envolvida na inibição da enzima AChE pelo 2,2-diclorovinil dimetil fosfato.

3.2 Metodologias usadas na determinação de agrotóxicos

Desde a década de 1960, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal é recomendado. Atualmente vários agrotóxicos são analisados, muitas vezes para uma única cultura. (TORES & PICÓ & MAÑES, 1996). Os agrotóxicos apresentam ampla variedade de aplicações e propriedades físico-químicas. Mesmo dentro de cada grupo, os diferentes compostos apresentam diversidade com relação ao uso.

As principais técnicas para análise de agrotóxicos são: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (KHAN *et. al.*, 2009; GRANBY & ANDERSEN & CHRISTENSEN, 2004) e a Cromatografia Gasosa-CG (AMVRAZI & TSIROPOULOS, 2009; HAJOU & AFIFI & BATTAH, 2004; LARTIGES & GARRIGUES, 1995). Em geral, as duas técnicas se complementam; como a CG requer que as amostras tenham estabilidade térmica e alta volatilidade, ela é aplicada primordialmente às classes de agrotóxicos que apresentam estas características, como os organofosforados e organoclorados. A CLAE devido a sua versatilidade, é aplicada a um número maior de classes de agrotóxicos, especialmente os herbicidas e inseticidas carbamatos. No entanto, a maioria das metodologias existentes para determinar resíduos de agrotóxicos por CLAE, está baseada na análise unirresidual ou na determinação de alguns pesticidas da mesma classe.

Independentemente da técnica empregada, a análise de resíduos de agrotóxicos compreende as etapas de extração da espécie analítica da matriz, remoção de interferentes que são extraídos conjuntamente, separação, identificação e quantificação de espécies de interesse (LLASERA & REYES-REYES, 2009; KOVAI & PROSEN & ZUPANI-KRALJ, 2004).

Os métodos de análise cromatográfica para resíduos de pesticidas em frutas e vegetais reportados na literatura científica podem ser classificados em três categorias: determinação de resíduos isolados (ou métodos unirresiduais), incluindo ou não seus metabólitos; análise multirresíduo de pesticidas de uma mesma classe e análise multirresíduo de classes diferentes. Esta última categoria é denominada por alguns autores como análise multiclasse.

Os métodos de análise unirresiduais (*TREVISAN, 2002; NAVICKINE & RIBEIRO, 2000*) geralmente não exploram toda potencialidade que as técnicas cromatográficas oferecem. Por serem menos suscetíveis à interferência de outras espécies analíticas e mais fáceis de serem estabelecidos, são utilizados especialmente para o estudo de um determinado princípio ativo, como por exemplo, a sua degradação e metabolismo frente a diferentes condições.

Os procedimentos de análise de multirresíduos de uma mesma classe (*OBANA et. al., 2002; ZONG-MAO CHEN & YUN-HAO WANG, 1996*), necessitam de mais recursos que as técnicas cromatográficas dispõem (como, por exemplo, detecção simultânea em vários comprimentos de onda e eluição de modo gradiente). Tais procedimentos têm um enfoque mais voltado para o mapeamento toxicológico de uma determinada área, grupo de pessoas ou para inspeção sanitária de produtos de exportação. A cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos é bastante empregada nesse tipo de análise (*OBANA et. al., 2002; CHRISTENSEN & GRANBY, 2001; MILIADIS & TSIROPOULOS, 1999; NUNES et. al., 1998*).

Os métodos de análise de multirresíduos de pesticidas de classes diferentes exigem dos sistemas cromatográficos, detectores que forneçam resposta simultânea à espécie analítica com diferentes características físico-químicas. Para

atingir tal objetivo, a técnica mais desenvolvida e disponível atualmente é a cromatografia gasosa, devido à mesma apresentar a versatilidade de se acoplar a vários detectores. A maioria dos trabalhos em análise multiclasse de pesticidas em frutas e vegetais emprega a cromatografia gasosa com detectores de espectrometria de massa, captura de elétrons e nitrogênio-fósforo. (FRENICH *et. al.*, 2006; ARREBOLA *et. al.*, 2003; ŠTAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003; CASTRO & SÁNCHEZ-BRUNETE & TADEO, 2001; NAKAMURA *et. al.*, 1994). Esta técnica tem proporcionado resultados satisfatórios para análises de pesticidas em diferentes matrizes (VAN DER HOFF & VAN ZOONEN, 1999). DRESCHER e FIEDLER (1983) efetuaram determinações de metamidofós em néctar de alta e baixa viscosidade, injetando os extratos (alíquotas de 2 µL) em cromatógrafo a gás com detector seletivo de nitrogênio-fósforo. O índice de recuperação obtido foi em torno de 82%, com amostras fortificadas ao nível de 0,8mg L⁻¹. OBANA *et al.* (1997) determinaram, ao mesmo tempo, Acefato e Metamidofós, usando cromatografia a gás com detector fotométrico de chama. As recuperações para sete vegetais fortificados a 0,1 mg L⁻¹ foram superiores a 80%. Os mesmos autores usaram cromatografia gasosa para quantificar vários pesticidas organofosforados em alimentos. Ingredientes ativos como metamidofós, acefato e dimetoato foram eluídos em coluna de 0,25 µm DB-210 (5 m x 0,25mm d.i.) com detector fotométrico e temperatura do forno de 300°C. Os pesticidas metamidofós e acefato apresentaram recuperações variando entre 37 e 60%, apresentando coeficiente de variação entre 6,1 e 41,5% (n= 3). WYLIE e UCHYAMA (1996) efetuaram a determinação de seis organofosforados usando cromatografia em fase gasosa, dois detectores, um detector seletivo de nitrogênio-fósforo e outro por espectrometria de massas.

RASTRELLI et al. (2002), usando cromatografia gasosa e detector de NPD, avaliaram a ocorrência de 18 pesticidas resíduos de organofosforados em óleo de oliva. De 61 amostras analisadas, 31 apresentaram resíduos de azinfós, clorpirifós, diazinon, dimetoato, fentiona, formotiona, metidationa, paration e metil-paration, em concentrações variando de 0,030 a 0,120 mg/kg. Acefato, carbofenotion, clorpirifós, malaoxon, malation, metamidofós e dimetoato não foram detectados em nenhuma amostra. Foram realizadas fortificações em níveis de 0,5, 1,0 e 2,5 mg/kg. Após extração com n-hexano, foram obtidas recuperações de 82 a 110%.

MATTERN et al. (1990) determinaram vários pesticidas, entre os quais o metamidofós, em amostras de frutos e vegetais. A metodologia empregada (método multirresíduo) apresentou nova variação que consistiu na pré-concentração, como resultado da modificação do método de *LUKE et al. (1975)* e também a confirmação dos compostos por CG-MS.

CENGIZ et al. (2006), usando como solventes acetona, diclorometano e éter de petróleo, realizaram a extração de 2,2-diclorovinil dimetil fosfato (Diclorvós). As determinações foram feitas usando cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, obtendo recuperações da ordem de 81%.

Estudos de determinação de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal aplicando a cromatografia líquida não constavam da literatura até pouco tempo. Os avanços no desenvolvimento do espectrômetro de massas como detector para CLAE prometem dinamizar os estudos nesta área. Recentemente, têm sido reportadas pesquisas sobre análise de agrotóxicos de diferentes classes em frutas e vegetais, empregando CLAE-MS (*LEANDRO et al., 2006; FERRER et al., 2005; SOLER & MAÑES & PICÓ, 2004*).

ALLENDER et al. (1992) determinaram organofosforados por CLAE com recuperações em torno de 86,3% para metamidofós e 93,8% para acefato e limite de detecção na ordem de 0,1 mg/kg. *HANKS (1992)* trabalhou com CLAE, usando detector ultravioleta a 210 nm na determinação de metamidofós, após a utilização de cartuchos de fase reversa para a purificação dos extratos. *KIENTZ et al. (1991)* usaram detectores termiônico e UV na determinação de acefato, metamidofós e etil-p-nitrofenilfosforamidato. A faixa linear de trabalho do método empregado foi entre 5,0 e 20 mg/kg, com limites de detecção de 0,7; 0,4 e 0,2 mg/kg, para os três compostos, respectivamente. *DRESCHER e FIEDLER (1983)* determinaram quatro agrotóxicos organofosforados por CLAE, usando detector termiônico seletivo em néctar de frutas. Para o metamidofós, a recuperação foi de 82% e o limite de detecção de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. *NORBERG et al. (1995)* investigaram 19 pesticidas da classe organofosforados, em amostras de água, usando detector UV. Obtiveram índices de recuperação para metamidofós variando entre 95 e 121% e limites de detecção entre 0,01 e 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$.

VENKATESWARLU et al. (2007) desenvolveram método para análise de rotina para 10 pesticidas de classes diversas, dentre eles, os organofosforados, clorpirifós, dimetoato e monocrotofós, usando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa, aplicados a amostras de uva. Os pesticidas foram separados em fase reversa com eluição por gradiente. Medidas de recuperação de 78 a 104% foram obtidas, em níveis de fortificação de 0,010 a 0,100 mg kg⁻¹, para todos os compostos analisados, com desvio padrão relativo menor que 15%.

Apesar da cromatografia gasosa e cromatografia líquida serem técnicas eficientes e precisas para realização das análises, é necessário uma grande manipulação da amostra, levando a um maior tempo na realização das análises e a

um gasto elevado de reagente na etapa de preparação das amostras. Estas técnicas apresentam capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, com alta resolução, eficiência, versatilidade e sensibilidade. Apesar dessas vantagens, estas técnicas apresentam grande complexidade e custo, como na aplicação destas metodologias em matrizes de alimentos ou solos, que normalmente envolve uma rotina complexa de pré-tratamento da amostra. Esta rotina pode ser composta de algumas das seguintes etapas: modificações da matriz, extração (extração líquido-líquido, extração em fase sólida, micro-extração em fase sólida, dispersão da matriz em fase sólida, extração com fluido supercrítico, extração acelerada com solvente, extração assistida com micro-ondas), dentre outras (*MOTOHASHI et al., 1996; PEREZ, et al., 2000; ZHU et al., 2002; CHEN et al., 2002; KOVAI & PROSEN & ZUPANI-KRALJ, 2004; DERYABINA et al., 2005; XIAO et al., 2006*).

Essas metodologias de preparação das amostras para as técnicas cromatográficas exigem, muitas vezes, a manipulação de uma quantidade não desprezível de solventes tóxicos, o que implica nos riscos à saúde humana, decorrentes de seus possíveis efeitos nocivos, além de um maior tempo de preparo da amostra (*HO & TANG, 1992; WAN et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2000*). Assim, uma situação ideal seria evitar a aplicação de todo este procedimento para diminuir o tempo e custo das análises.

Desta forma, é importante o desenvolvimento de novas metodologias para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e ambientais. Outras técnicas analíticas também são aplicadas à análise de resíduo de agrotóxicos, tais como: cromatografia em camada delgada (*MORAES & REZENDE & NAKAGAWA, 2002*), eletroforese capilar (*NÚÑES & MOYANO & GALCERAN,*

2002), técnicas imunoquímicas (imunoensaios) e as que empregam os biossensores (BUCUR *et al.*, 2006; NUNES, 2004; SCHÖNING *et al.*, 2003; VAKUROV *et al.*, 2004).

As técnicas que usam como proposta de detecção, biossensores, enzimas podem ser aplicadas na determinação de compostos orgânicos como, por exemplo, os agrotóxicos pertencentes à classe dos organofosforados. Neste caso, na maioria das vezes, a enzima utilizada é a acetilcolinesterase que sofre inibição por esses agrotóxicos, sendo esta inibição usada como resposta associada à concentração da espécie analítica.

VAKUROV *et al.*(2004) desenvolveram um biossensor potenciométrico sobre eletrodos impressos a base de carbono, modificados com aldeídos e glutaraldeído, para a determinação de diclorvós, e conseguiram um limite de detecção de 10^{-10} mol L⁻¹ com um tempo de incubação de 2 dias. WILKINS *et al.*(2000) realizaram a determinação quantitativa de pesticidas organofosforados, entre eles o diclorvós, em solventes orgânicos, pela técnica amperométrica baseada na inibição da ação da acetilcolinesterase com um mediador de elétrons, o azul da Prússia. Os experimentos possibilitaram a determinação de pesticidas em faixas sub-micromolares de concentrações, com um tempo total de análise inferior a 10 min. KAROUSOS *et al.*(2002) desenvolveram um biossensor usando uma microbalança eletroquímica de cristal de quartzo onde, por meio da variação de massa na superfície do biossensor puderam determinar os pesticidas carbaril e diclorvós em concentrações até 1 mg L⁻¹. SCHÖNING *et al.*(2003) utilizaram um biossensor composto pelas enzimas organofosforadohidrolase e acetilcolinesterase num sistema em fluxo para a determinação dos pesticidas organofosforados, inclusive o diclorvós.

ANDREOU & CLONIS(2002) desenvolveram um biossensor de fibra ótica para detecção de pesticidas carbaril e diclorvós com imobilização de acetilcolinesterase sobre membrana hidrofílica. Curvas analíticas foram obtidas nas faixas de concentração 0,11–8,0 mg L⁻¹ para carbaril e 5,0–30 µg L⁻¹ para diclorvós. Os respectivos limites de detecção foram 108 µg L⁻¹ e 5,2 µg L⁻¹.

ANDREESCU et al.(2002) avaliaram o desempenho analítico de três biossensores impressos a base de AChE para detecção de pesticidas. Bioencapsulamento da enzima em compósito sol-gel e imobilização por afinidade com metal-quelante foram comparados com encapsulamento da enzima em um polímero fotopolimerizado. Uma quantidade muito baixa da enzima foi imobilizada (entre 0,8 e 1,2 mU) na superfície do eletrodo. O biossensor construído a partir do encapsulamento no filme polimérico exibiu estabilidade de 6 meses. As concentrações de pesticidas paraoxon, diclorvós e clorpirifós etil, na faixa de 10⁻⁸ a 10⁻⁹ mol L⁻¹, puderam ser detectadas com um tempo de incubação de 20 min. Recentemente, *VALDÉS-RAMÍREZ et al.(2008)* construíram um biossensor amperométrico com elevada sensibilidade para detecção de diclorvós, baseado na inibição de acetilcolinesterase. A sensibilidade de três AChEs foram avaliadas e comparadas: AChEs de enguia elétrica, uma geneticamente modificada denominada de B394 e outro tipo (B1) de *Drosófila melanogaster*. As enzimas foram imobilizadas por aprisionamento em polímero de álcool polivinílico com grupos estirilpiridínicos (PVA-SbQ) que foi acoplado sobre eletrodo impresso de grafite. A melhor sensibilidade foi alcançada com as enzimas de *Drosófila melanogaster* e geneticamente modificada (B394) que apresentaram limites de detecção de 7×10^{-11} mol L⁻¹ quando comparadas com 1×10^{-8} mol L⁻¹ para B1 e 6×10^{-7} mol L⁻¹ com a originária de enguia elétrica. O

biossensor com AChE geneticamente modificada (B394) foi usado para quantificar diclorvós em amostra de maçãs após extração com acetonitrila.

3.3 Enzimas

Enzimas são proteínas responsáveis por catalisar as reações, dentre outras, aquelas que ocorrem sob condições termodinamicamente não-favoráveis, proporcionando uma compatibilidade entre a velocidade da reação e o processo bioquímico essencial para a manutenção da célula. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, provenientes de sua natureza proteica, propiciando ao ambiente um mecanismo particular de reação com capacidade de reconhecer um grupo limitado de substrato. Por ser uma proteína, a enzima pode perder suas propriedades catalíticas se submetida a algumas condições como: calor, ácidos, bases fortes, solventes orgânicos ou outros materiais que possam causar desnaturação da proteína (LEHNINGER, 1995; CONN, 1980).

3.3.1 Cinética Enzimática

A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada como segue:



A molécula sobre a qual a enzima atua é o substrato (S) que se transforma em produto (P) da reação. Na ausência de enzima, pouco produto (ou nenhum) é formado, mas em presença da mesma, a reação se processa em alta velocidade. Como a maioria das reações é reversível, os produtos da reação numa direção tornam-se substratos para reação inversa.

As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato quanto para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada de “sítio ativo” é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligações não-covalentes (interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas). Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam os sítios ativos ficam em regiões distintas, na seqüência primária, mas próximos no sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária). Isso não implica, entretanto, que os aminoácidos no sítio ativo estejam um ao lado do outro na estrutura primária da proteína. Em consequência das dobras e enovelamento da enzima (estrutura secundária e terciária), certos resíduos de aminoácidos podem estar distantes um do outro na seqüência primária, ainda que juntos no sítio ativo da proteína completa.

A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo precisamente definido no sítio ativo. Uma das explicações para a elevada especificidade das enzimas é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade enzimática, o modelo chave-fechadura e o modelo do encaixe induzido.

O modelo chave-fechadura (Figura 6), parte do princípio que muitas enzimas contêm fendas com dimensões fixas que permitem a inserção somente de compostos com afinidade de configuração. O substrato se ajusta a esse sítio de ligação como uma chave se ajusta à sua fechadura. Substâncias que não se

encaixam na fenda para formar o complexo enzima-substrato (ES), não reagem, mesmo possuindo grupos funcionais idênticos ao do substrato verdadeiro. Esse conceito foi proposto por Fisher em 1890.

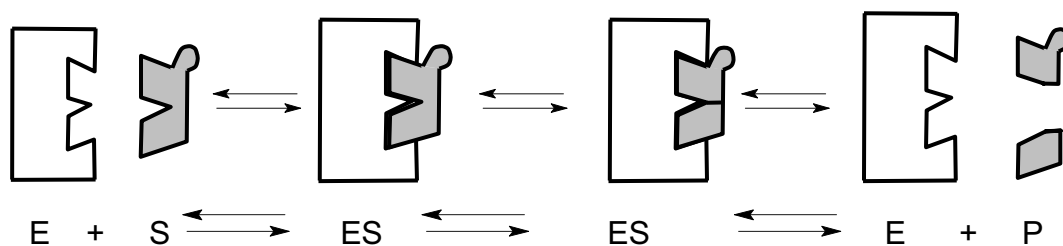


Figura 6 – Modelo Chave-fechadura. A interação entre a enzima (estrutura rígida) e seu substrato.

O modelo proposto por KOSHLAND em 1952 (Figura 7) estabelece uma interação enzima-substrato mais flexível denominado de encaixe induzido, onde o sítio ativo não está completamente pré-formado e a interação inicial do substrato com a enzima induz uma alteração conformacional na enzima. Isso promove o reposicionamento dos aminoácidos catalíticos para formar o sítio ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato.

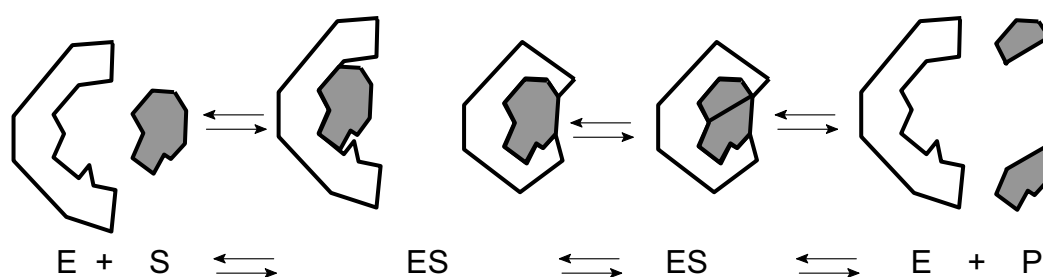


Figura 7 – Modelo de encaixe induzido. A ligação inicial do substrato a enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe.

Os princípios gerais de cinética das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas. Porém mostra-se também um aspecto distinto que não se

observa usualmente em reações não enzimáticas, a saturação com o substrato. Além da temperatura, o pH do meio, o tempo de reação e produto formado, a concentração do substrato apresenta um efeito diferenciado, conforme pode ser visto na figura 8. Observa-se que em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial da reação (v_0) é proporcional à concentração do substrato, desta forma, a reação é considerada de primeira ordem com relação ao substrato. Entretanto, com o aumento da concentração do substrato a velocidade inicial da reação se reduz, não sendo mais proporcional à concentração do substrato, desta forma, a reação é de ordem mista. Posteriormente, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato e aproxima-se de uma velocidade constante. Nesta faixa de concentração a reação é de ordem zero com relação ao substrato, e a enzima é considerada “saturada” com seu substrato.

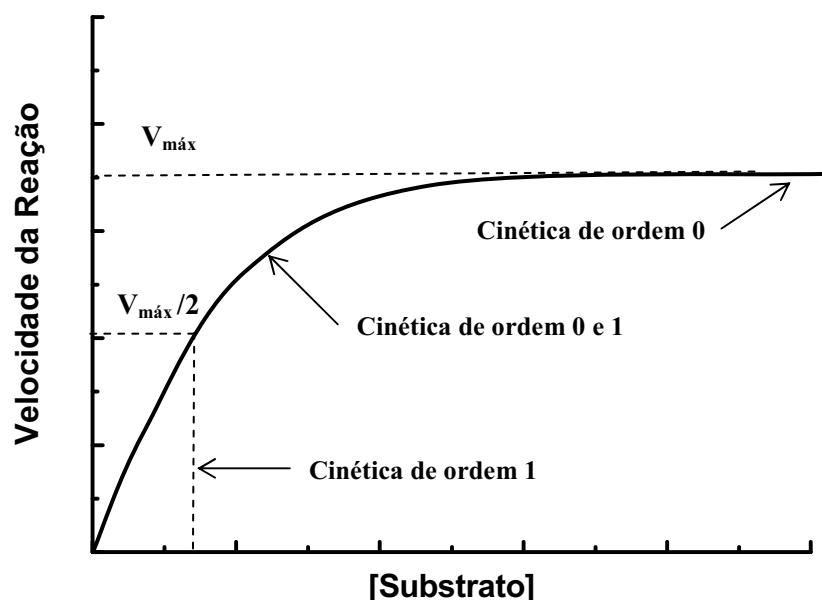
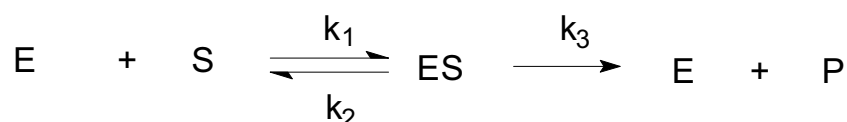


Figura 8 – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reações catalisadas por enzimas (concentração de enzima constante).

O estudo da velocidade das reações enzimáticas ou cinéticas enzimáticas envolve informações indiretas sobre o mecanismo de ação catalítica, especificidade das enzimas, alguns fatores que afetam a velocidade das reações e a determinação quantitativa de seus efeitos. Apesar de catalisarem uma grande variedade de reações por diferentes mecanismos, as enzimas podem ser analisadas quanto à velocidade das reações, para quantificar a sua eficiência.

Quando o substrato S se liga ao sítio ativo de uma enzima E, um complexo enzima-substrato (ES) é formado em processo rápido e reversível antes da formação do produto. Após um breve tempo, o produto se dissocia da enzima conforme a equação:



Onde:

$k_1 \rightarrow$ constante de velocidade para a formação do complexo ES

$k_2 \rightarrow$ constante de velocidade para a dissociação do complexo ES

$k_3 \rightarrow$ constante de velocidade para a formação do produto e liberação do sítio ativo

A relação quantitativa entre a velocidade de reação enzimática e a concentração do substrato é definida pela equação de Michaelis-Menten (*MICHAELIS & MENTEN, 1913*). No desenvolvimento da equação deve-se supor que o k_2 é negligenciável quando comparável com k_1 e que a velocidade de formação de ES é igual a velocidade de sua degradação não sofrendo alterações durante a medida da velocidade (Postulado do estado estacionário):

$$\text{Velocidade} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = k_3[ES]$$

Para ter utilidade, a velocidade de uma reação deve ser definida em termos de $[S]$ e $[E]$. A velocidade de formação de ES é igual a $k_1[E][S]$, enquanto a velocidade de dissociação de ES é igual a $(k_2 + k_3)[ES]$. O postulado do estado estacionário iguala as duas velocidades:

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

Michaelis e Menten introduziram uma nova constante, k_m $k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{k_m} \quad \text{Rearranjando temos,} \quad \frac{[E]}{[ES]} = \frac{k_m}{[S]}$$

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

$$\frac{[E]_t - [ES]}{[ES]} = \frac{k_m}{[S]} \quad \text{rearranjando,} \quad \frac{[E]_t}{[ES]} = \frac{k_m}{[S]} + 1$$

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

$$\frac{V_{\text{máx}}}{V} = \frac{[E]_t}{[ES]} \quad \text{e,} \quad \frac{V_{\text{máx}}}{V} = \frac{k_m}{[S]} + 1 \quad \text{isolando V obtem-se a}$$

equação de Michaelis-Menten,
$$V = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{k_m + [S]}$$

onde, V é a velocidade observada a uma dada concentração do substrato [S], k_m é a constante de Michaelis. Esta equação relaciona a velocidade de uma reação catalisada por enzima com a concentração do substrato. As duas constantes nessa equação, a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$, velocidade atingida sob condições de saturação da enzima em condições específicas de temperatura, pH e força iônica) e K_m são específicas para cada enzima sob condições especificadas de pH e temperatura. Para aquelas, onde $k_3 \ll k_2$, a k_m torna-se a recíproca da constante de ligação enzima-substrato:
$$k_m = \frac{1}{k_1}$$
 e $V_{\text{máx}}$ reflete a fase catalítica do mecanismo enzimático, ou seja a atividade enzimática ocorre inicialmente com a ligação do substrato seguida pela modificação química do mesmo.

Se for permitido à velocidade da reação V ser igual a metade da velocidade máxima ($V = \frac{1}{2} V_{\text{máx}}$) o K_m será igual a [S]:

$$\frac{1}{2} V_{\text{máx}} = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Dividindo por } V_{\text{máx}}, \text{ obtém-se } \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

reorganizando temos, $K_m + [S] = 2[S] \quad K_m = [S]$

O valor de K_m (constante de Michaelis) é numericamente igual a concentração do substrato (mol L^{-1}) na qual a velocidade da reação corresponde à metade da velocidade máxima. Ou seja, na concentração de substrato em que $[S] = K_m$, a equação de Michaelis-Menten torna-se $V = V_{\text{máx}} / 2$. A concentração da enzima não afeta o K_m , sendo que o seu valor é influenciado pela afinidade

substrato-Enzima. Valores pequenos de K_m refletem afinidade elevada da enzima pelo substrato e, portanto, a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substratos. Valores grandes de K_m refletem baixa afinidade da enzima pelo substrato.

Os valores de K_m e da $V_{m\acute{a}x}$ de uma enzima são determinados pela medida das velocidades iniciais para várias concentrações de substrato. Pela construção do gráfico mostrado na figura 8 só é possível calcular valores aproximados de K_m e da $V_{m\acute{a}x}$. A determinação mais acurada desses valores é possível pela modificação algébrica da equação de Michaelis-Menten, utilizando o inverso desta equação.

A representação gráfica da recíproca da velocidade, $1/V$, versus a recíproca da concentração do substrato, $1/[S]$ (Figura 9), fornece uma relação linear com inclinação $K_m/V_{m\acute{a}x}$ em um gráfico duplo-recíproco ou Lineweaver-Burk. O ponto onde essa linha intercepta a ordenada é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$, e o ponto de intersecção na abscissa é igual a $-1/K_m$ (Figura 9). O gráfico permite calcular $V_{m\acute{a}x}$ e K_m pela medida da inclinação e do intercepto.

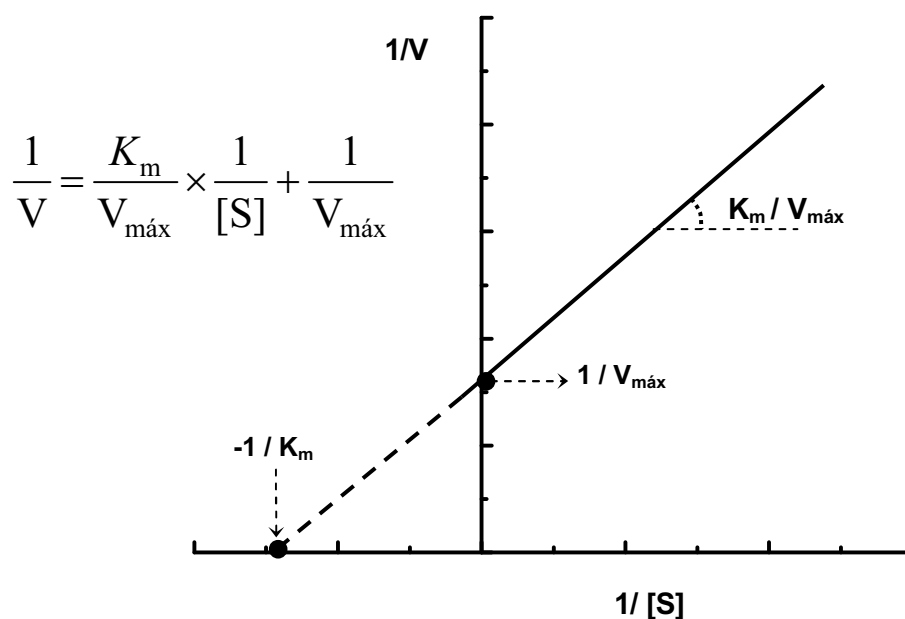


Figura 9 – Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-burk, usado para determinar o valor de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

3.3.2 *Acetilcolinesterase*

No sistema nervoso, os impulsos são transmitidos através de células nervosas denominadas neurônios (Figura 10). A comunicação entre os neurônios ocorre através dos axônios terminais de um neurônio e os dendritos de outro neurônio. Os dendritos recebem os sinais vindos de outra célula e são transmitidos do axônio da célula transmissora para o dendrito da célula receptora.

O contato entre os neurônios e entre estes e as células musculares ou células glandulares, é chamado de sinapse (Figura 10 A). Em uma típica sinapse, a membrana pré-sináptica (por exemplo, o axônio de um neurônio) é separada da membrana pós-sináptica (por exemplo, o dendrito de outra célula) por um espaço chamado de fenda sináptica (WASSER & KAVALLI, 2008; YANG *et al.*, 2007).

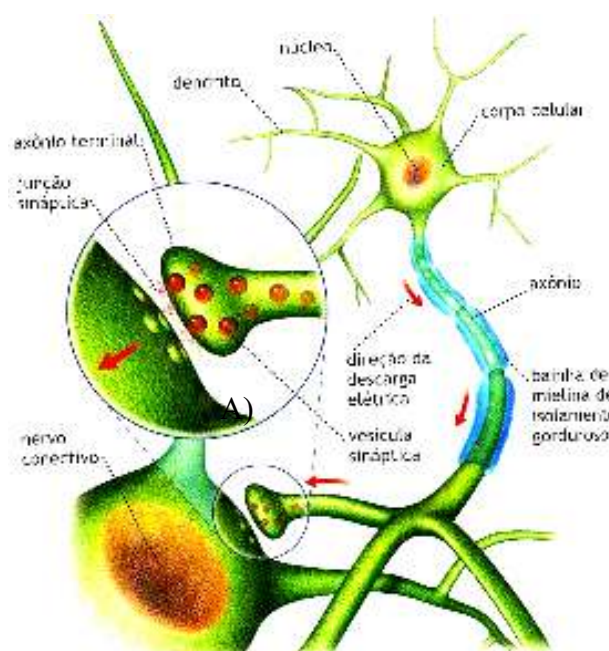


Figura 10 – Esquema de transmissão de impulsos nervosos entre neurônios. A) fenda sináptica. .

Para a transmissão de impulsos nervosos, o neurônio (pré-sináptico) libera substâncias químicas denominadas “neurotransmissoras” que agem como

verdadeiros mensageiros, transmitindo a mensagem para o neurônio subsequente (pós-sináptico), o qual recebe a informação através de sítios específicos denominados “receptores”. Alguns dos neurotransmissores mais conhecidos são: acetilcolina, dopamina, serotonina, ácido g-aminobutírico-GABA e glutamato. (CARLINI *et al.*, 2001). A acetilcolina é também um neurotransmissor nos terminais das placas motoras (conexões neuromusculares), que são uniões entre o nervo e o músculo estriado (Figura 11).

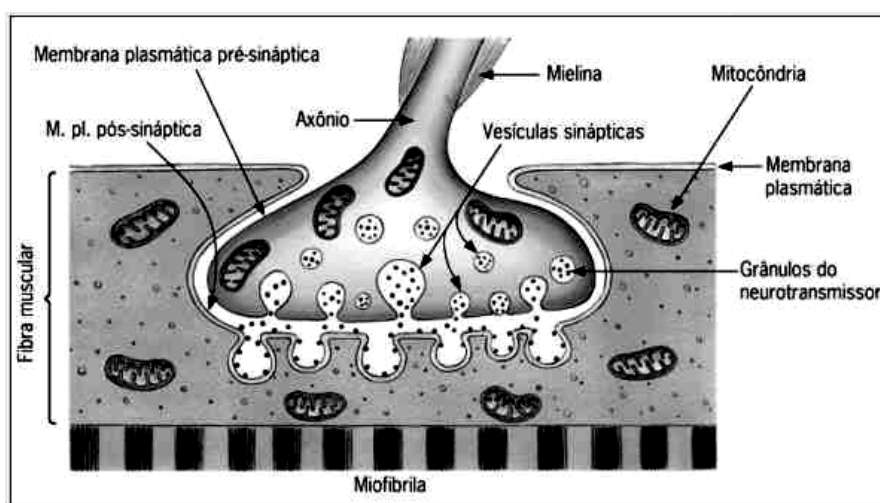


Figura 11 – Junções neuromusculares ou placas motoras-sinapse entre terminações do axônio e os músculos.

A chegada de um impulso nervoso dá lugar à liberação de acetilcolina na fenda sináptica. Então, a molécula de acetilcolina difunde até a membrana pós-sináptica, onde se combina com moléculas receptoras específicas abrindo poros na membrana, com diâmetros de aproximadamente 0,5 nm, suficientemente grandes para a passagem de cátions (Na^+ , Ca^{+2} , K^+) com bastante facilidade. Isto pode levar a uma despolarização da membrana pós-sináptica, que se propaga ao longo da membrana eletricamente excitável da segunda célula nervosa. Porém, a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase em milésimos de segundo em ácido acético e colina, e se restabelece a polarização da membrana pós-sináptica.

O período de tempo muito curto, cerca de 1×10^{-3} segundos, em que a acetilcolina permanece em contato com a membrana da fibra muscular é quase sempre suficiente para excitar a fibra muscular. A remoção rápida da acetilcolina evita uma nova excitação após a fibra muscular ter-se recuperado do primeiro potencial de ação.

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal, porém é rapidamente absorvida em várias pequenas vesículas sinápticas, cerca de 300.000, das quais existem normalmente em todos os terminais de uma única placa motora. Na matriz das fendas secundárias, há grande quantidade de enzima acetilcolinesterase (AChE). O sítio ativo da enzima AChE envolvido na catálise da reação de hidrólise da acetilcolina é um aminoácido serina. Esse aminoácido apresenta um grupo polar $-OH$, que é responsável pela interação com o neurotransmissor. A figura 12 mostra a reação catalítica entre a acetilcolina e a enzima colinesterase.

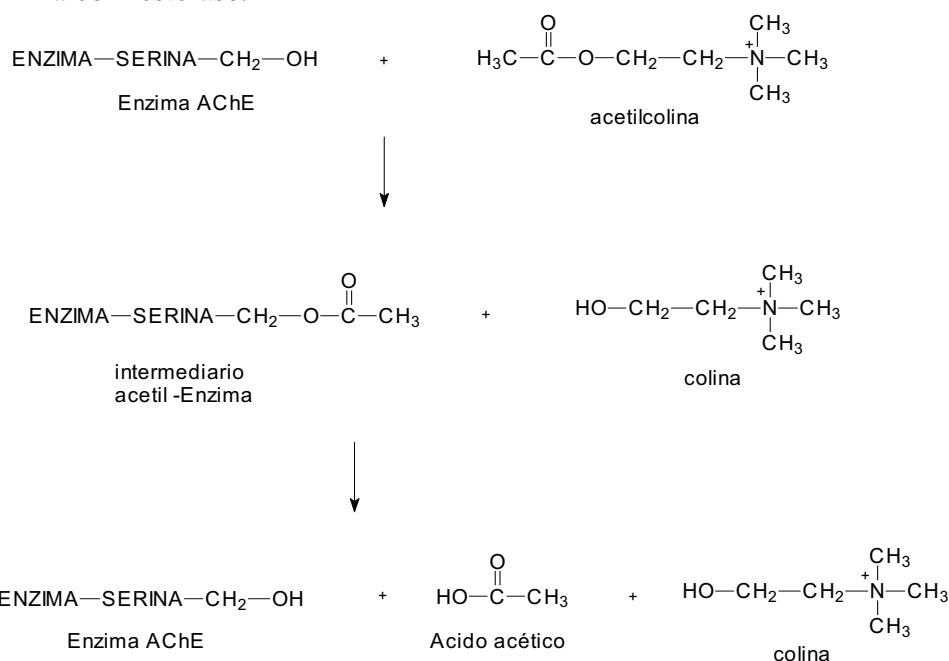


Figura 12 – Reação catalítica da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

Nessa reação um intermediário covalente acetil-enzima é formado, ocorrendo à formação e liberação de 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 impulsos nervosos (*KANDELL et al., 2000*).

3.4 Biossensores

Os objetivos de simplificação de métodos analíticos e portabilidade são comuns a todas as áreas da química analítica. Neste sentido, os biossensores são ferramentas analíticas bastante versáteis, pois proporcionam arranjos que apresentam, em geral, elevadas sensibilidade e seletividade, com tempo de resposta bastante curto, com mínimo de tratamento da amostra. Na maioria dos casos, dispensa a adição de reagentes durante as medidas e são usados continuamente acoplados em equipamentos ou são descartáveis (*FATIBELLO FILHO & CAPELATO, 1992; MARTY, GARCIA & ROUILLON, 1995; JANATA, JOSOWICZ e DEVANEY, 1994; MARTY, 2004*).

A possibilidade de miniaturização e o seu uso *in vivo* e em sistemas em fluxo viabilizam sua aplicação em diferentes áreas, tais como, no controle e monitoramento de processos industriais, na medicina, na área de alimentos e no monitoramento ambiental. No controle ambiental, principalmente para monitoramento de pesticidas, vários biossensores eletroquímicos à base de enzimas colinesterases foram desenvolvidos para a detecção de resíduos de carbamatos e organofosforados em diversas matrizes ambientais. Esses sistemas baseiam-se no princípio de inibição enzimática para determinação/quantificação desses inibidores de colinesterases (*BASSI et al., 1996; CHEMNITIUS et al., 1996; SCHEPER et al., 1996; MARQUES et al., 2004*).

Na medicina, os biossensores têm merecido considerável atenção, sendo muito empregados para detecção e controle de algumas doenças e no monitoramento *in vivo* de metabólitos, drogas e proteínas. Já foram desenvolvidos biossensores para aplicação em análises clínicas na determinação de ácido úrico, no diagnóstico e tratamento de desequilíbrios hematológicos, de creatinina e creatina em fluidos biológicos, para diagnóstico de funções renais, musculares e da tireóide. Biossensores também são muito utilizados em análises de colesterol, triglicerídeos, etanol, fosfato, fosfolipídeos, antígenos e anticorpos, (MERIC *et al.*, 2002; HSIEH *et al.*, 2004). Biossensores têm sido desenvolvidos para aplicação em análises clínicas, por exemplo, sensores usados para monitorar a glicose, objetivando o controle e o diagnóstico de portadores de diabetes e outros desequilíbrios de glicemia no sangue, além de outros biossensores aplicados na determinação de aminoácidos, bilirrubina, penicilina, oxalato e outras substâncias indicadoras de algumas doenças ou de toxicidade em diagnósticos clínicos, (STEFAN *et al.*, 1999; STEFAN *et al.*, 2003; RINKEN & RIIK, 2006; CARIDADE *et al.*, 2008; RAHMAN, *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2008; MILARDOVIC *et al.*, 2008).

O conceito básico de um biossensor passa pela integração de um material de origem biológica, tal como: enzimas, organelas, tecidos de animais ou vegetais, microorganismos, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos, lectina, entre outros, imobilizado em um suporte, conectado a um sensor base (transdutor) que converte o sinal biológico em um sinal elétrico (Figura 13). (ANDREOU & CLONIS, 2002; SCHÖNING *et al.*, 2003; GALLI *et al.*, 2006; JHA *et al.*, 2008).

A utilização de biocomponentes permite fazer uso da especificidade única das biomoléculas para as espécies alvo. O sinal traduzido no biossensor é

secundário e resultante da interação entre o material biológico e a espécie analítica de interesse.

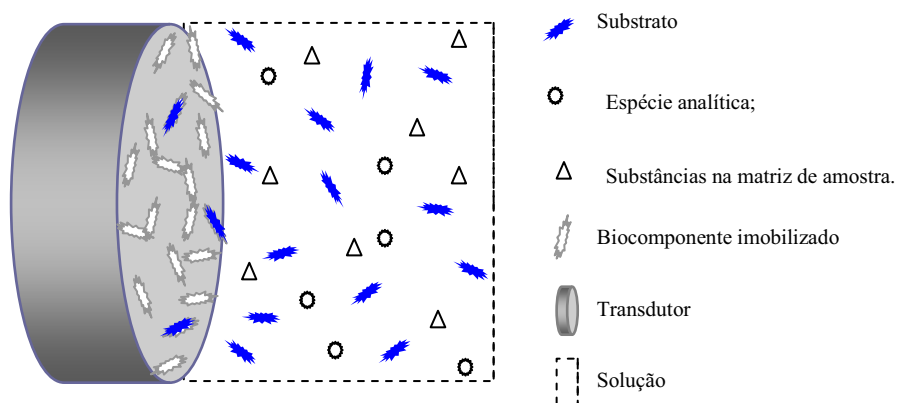


Figura 13 - Representação esquemática de um biossensor.

Para viabilizar o uso de um biossensor eficiente (aplicável) é necessário conseguir elevados níveis de especificidade, boa estabilidade nas condições de medição (temperatura, pH, força iônica, etc) e também nas condições de armazenamento, bem como a manutenção da atividade do biocomponente, resposta em tempo útil, e reprodutível.

3.4.1 Tipos de biossensores

Provavelmente, o mais correto é afirmar que a maioria dos sensores biológicos tradicionais se baseia em métodos espectrofotométricos, em que a resposta analítica dada pelo biocomponente está relacionada com a determinação de um indicador colorimétrico, fluorescente ou luminescente. Por outro lado, os sensores químicos têm freqüentemente recorrido à técnicas eletroanalíticas, por exemplo, o eletrodo de pH (potenciometria) e o eletrodo de oxigênio de Clark (amperometria) (THEVENOT *et al*, 2001).

Os biossensores não estão restritos às três categorias descritas anteriormente (espectrofotométricos, potenciométricos e amperométricos). Em

princípio, qualquer variável que esteja relacionada com a interação do biocomponente poderá ser usada para gerar um sinal analítico.

De fato, o campo dos biossensores vem se desenvolvendo em uma interface que combina várias áreas do conhecimento (física, química, biologia) com a eletrônica. Os avanços em várias áreas tais como: produção de polímeros, óptica, eletrônica, etc, revelaram novos materiais e métodos disponíveis para a exploração como biossensores. Pode-se, por isso, esperar que os parâmetros de medição relacionados com sistemas biossensores se tornem cada vez mais diversificados, bem como as técnicas de detecção empregadas.

Fundamentalmente existem dois tipos de biossensores, dependendo do modo de geração de sinal (*SCHELLER et al., 1989; THEVENOT et al., 2001*). Os primeiros são sensores de bioafinidade direta que utilizam o evento da ligação como resposta analítica. A ligação da espécie analítica ao biocomponente imobilizado resulta numa alteração conformacional da biomolécula ou alteração física no meio de imobilização (alteração de carga, temperatura ou cor, etc). O segundo tipo de sensor é o biossensor enzimático/metabólito. Aqui, o reconhecimento do substrato pelo receptor imobilizado (enzima ou outro componente biológico) é seguido imediatamente pela conversão no correspondente produto, o qual é detectado.

A imobilização do biocomponente de forma irreversível, na superfície do biossensor, apresenta dentre outras vantagens, a possibilidade de construir analisadores compactos e portáteis e que apresentam resposta analítica reproduzível (*ARMSTRONG, 2005*). Isto é positivo, desde que a biomolécula se mantenha ligada ao transdutor e o biossensor possa ser reutilizado. Quando imobilizada, as enzimas podem apresentar cinéticas consideravelmente diferentes

do que teriam em solução, o que não é uma vantagem em todos os casos. A imobilização de enzimas no sensor não é apenas dependente da natureza da biomolécula ou das características da interface do transdutor, devendo ser levado em consideração a eficiência do sinal de transdução e a interação com a espécie analítica. Por exemplo, se o pH vai ser monitorado, então a biomolécula deverá apresentar resposta a este analito na região de imobilização. Se por outro lado, é utilizada apenas uma enzima redox e o sinal a ser “traduzido” é a transferência de elétrons, então, as condições devidas, devem estar asseguradas, para que as transferências sejam eficazes para o transdutor.

Dependendo do método de reconhecimento e o tipo de imobilização do biocomponente, os biossensores podem ser classificados em primeira, segunda e terceira geração (Figura 14) (*SCHELLER et al., 1989; THEVENOT et al., 2001*).

A abordagem mais simples consiste em aprisionar a biomolécula de reconhecimento imobilizada no transdutor (primeira geração). A adsorção direta ou fixação covalente da biomolécula à superfície do transdutor permite eliminação de camadas inativas. As principais desvantagens destes sensores, quando da detecção amperométrica, são as aplicações de valores de potenciais altos, e a dependência enzimática do substrato (*D’ORAZIO, 2003*).

Na segunda geração, utilizam-se mediadores livremente difundidos na superfície do transdutor. Esta geração foi desenvolvida para minimizar os problemas dos biossensores da primeira geração, substituindo os mediadores naturais (co-substrato) por mediadores artificiais. Estes compostos podem ser moléculas inorgânicas ou organometálicos derivados do Fe^{2+} (ferrocenos), ou complexos de ósmio (Os^{2+}) ou rutênio (Ru^{2+}) (*BLAEDEL & JENKINS, 1976; D’ORAZIO, 2003; CASTILLO et al., 2004; BRETT et al., 2004*).

Em geral, alguns problemas são enfrentados como perda de sinal com os biossensores da segunda geração quando as análises são feitas em amostras complexas, onde a contaminação desta com o mediador artificial devem ser rigorosamente evitados.

Na terceira geração, o mediador é integrado junto com o biocomponente, transferindo os elétrons da biomolécula para o transdutor polarizado, em um processo reversível.

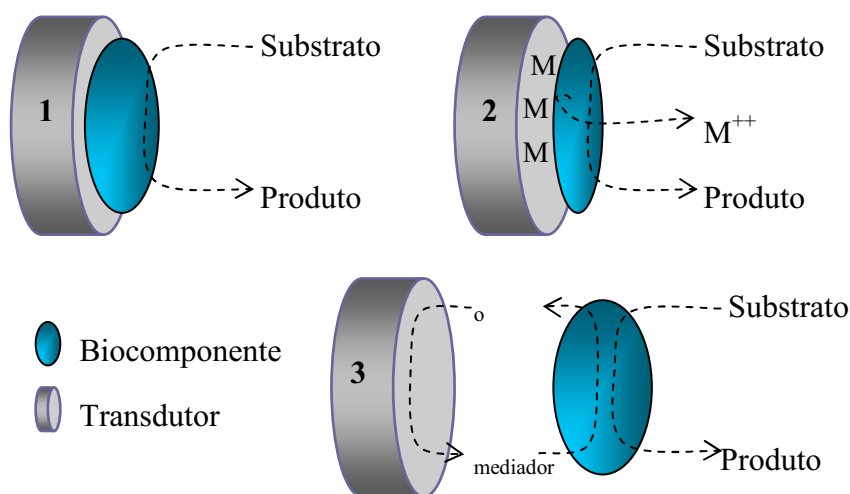


Figura 14 – Esquemas de tipos de biossensores. 1-primeira geração; 2-segunda geração; 3-terceira geração M - mediador reduzido; M^{++} - mediador oxidado.

A imobilização do biocomponente sobre a superfície do transdutor representa o fator determinante para o bom funcionamento do biossensor. Se o biocomponente for uma enzima, esta em solução normalmente é utilizada uma única vez. A utilização repetida, imposta pelos biossensores, conduziu à procura de metodologias que favoreçam uma reutilização da enzima. Fatores como a natureza da reação enzimática, das espécies a determinar, o tipo de transdutor utilizado, ou as condições de funcionamento do biossensor, conduzem à diversas técnicas de imobilização (BONNET *et al.*, 2003; BUCUR *et al.*, 2004; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2004; DU *et al.*, 2007; VAMVAKAKI &

CHANIOTAKIS, 2007; GABROVSKA *et al.*, 2008) (Tabela 6). A figura 15 apresenta um organograma que faz uma síntese das metodologias mais utilizadas.

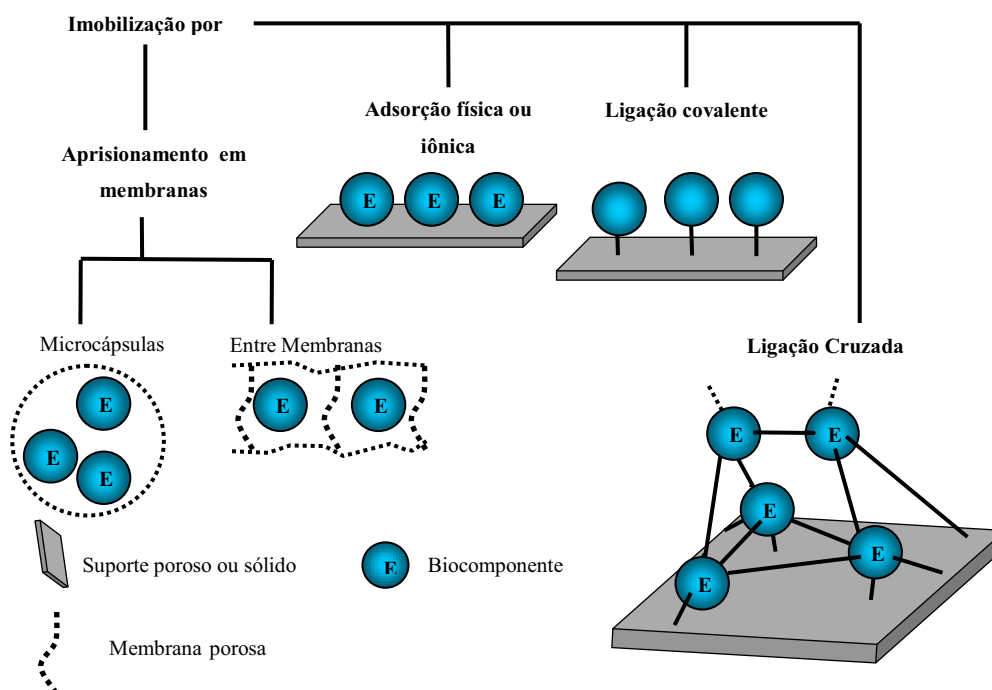


Figura 15 – Esquemas dos principais métodos de imobilização enzimática.

O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é manter ao máximo a atividade da biomolécula na superfície do transdutor. Contudo, existem três parâmetros que condicionam ou melhoram a imobilização: a cinética da reação, o pH e temperatura. Normalmente, os processos de imobilização conduzem a uma diminuição da velocidade da reação, o que conduz à necessidade de maiores concentrações de substrato para atingir o mesmo nível de resposta. A mesma situação é verificada quando se utilizam agentes funcionais, refletindo-se na diminuição ou aumento da K_M^{app} , constante de afinidade do substrato para com a matriz. A influência do pH traduz-se no deslocamento do pH ótimo da enzima para região alcalina em grupos carregados negativamente, enquanto que grupos carregados positivamente induzem valores de pH mais baixos. Quanto à

temperatura, enzimas aprisionadas e ligadas a grupos funcionais são, normalmente, termicamente mais estáveis.

Analisando os fatores que influenciam as biomoléculas, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a metodologia de imobilização mais adequada ao sistema em estudo. As técnicas de imobilização de maior utilização são as de ligação covalente e adsorção. A adsorção física da biomolécula baseia-se na formação de forças atrativas de *Van der Waals* entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo a enzima. Todavia, facilmente poderá ocorrer uma perda da enzima adsorvida se ocorrer alterações do meio durante as medições, como por exemplo, variações de pH, força iônica ou temperatura (MELLO & KUBOTA, 2002).

O procedimento de imobilização por ligação covalente baseia-se na reação entre grupos funcionais da enzima, não essenciais à atividade catalítica, e grupos reativos da superfície. Embora esta técnica possua a vantagem de dificilmente a enzima se desprender da matriz de suporte, durante a utilização, a eficiência relativa da ligação de uma quantidade de enzima no estado imobilizado deve ser sempre comparada com a atividade de uma quantidade idêntica de enzima em solução. Vários métodos são apontados para a formação da ligação covalente, por exemplo, a formação de ligações via grupos acila, diazônicos e tióis.

Tabela 6 – Comparação entre as diferentes formas de imobilização.

Tipo	Características	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	<i>A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e iônicas.</i>	<i>Simplicidade de execução</i>	<i>Falta de reprodutibilidade na forma de imobilização da enzima; Possibilidade de lixiviação da enzima; Possibilidade de perda acentuada da atividade enzimática durante o uso frente aos efeitos de pH, temperatura e força iônica do meio;</i>
Encapsulamento em membranas	<i>Consiste em “confinar” a enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula.</i>	<i>Não interação química com o polímero evitando desnaturação e perda da atividade enzimática.</i>	<i>A velocidade de difusão do substrato e produtos através da membrana é dificultada, necessitando altas concentrações de Substrato, ocasionando diminuição no tempo de resposta; Possibilidade de lixiviação devido a diferentes tamanhos de poros.</i>
Ligação Covalente	<i>Envolve ligações covalentes entre grupos ligantes do suporte e grupos funcionais específicos da enzima.</i>	<i>Minimização da lixiviação; Maior estabilidade do complexo Enzima-Suporte, em relação aos efeitos de pH, força iônica, do solvente.</i>	<i>Apresenta alta perda da atividade enzimática devido a reação de grupos funcionais de sítios ativos da enzima e pela deformação da estrutura tridimensional da enzima.</i>
Ligação covalente Cruzada “crosslinking”	<i>Nesse método tem-se a formação de ligações covalentes entre grupos funcionais da enzima e do suporte, utilizando reagentes multifuncionais, por exemplo, o Glutaraldeído.</i>	<i>Simplicidade de execução; Forte interação da enzima com o suporte diminuindo acentuadamente a lixiviação, proporcionando maior estabilidade ao biossensor.</i>	<i>Dificuldades em realizar imobilizações reprodutíveis; O uso de grandes quantidades de enzima; Baixa atividade enzimática; No entanto estes problemas podem ser amenizados com o uso de albumina de soro Bovino (proteína inerte para fornecer grupos amino para Ligações cross-linking)</i>

O tipo de imobilização por aprisionamento é a mais utilizada em enzimas de elevada massa molecular, sendo estas aprisionadas, por exemplo, em géis em contato direto com a superfície de um eletrodo de íon seletivo. Usualmente, esta camada é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma

a retardar a lixiviação da enzima. Todavia, para enzimas de baixa massa molecular, o comportamento não se encontra próximo do desejado. Ogawa e colaboradores descrevem, por exemplo, o aprisionamento de urease em um novo sistema de microgéis e a co-imobilização de duas enzimas (gluconolactonase e glucose oxidase) para a melhoria da cinética do processo enzimático de géis de polieletrólitos (OGAWA *et al.*, 2001; OGAWA *et al.*, 2002). Esta técnica é também apropriada para processos que envolvam substratos e produtos de baixa massa molecular apresentando problemas óbvios para substratos e produtos de maiores massas moleculares. Quantidades de até 1 g de enzima por grama de gel ou fibra podem ser aprisionadas. Este processo pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes.

A técnica de ligação cruzada (“crosslinking”) baseia-se na imobilização como resultado da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas presentes no suporte com reagentes bifuncionais. (Thermo Scientific, 2008). Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos específicos para grupos funcionais (por exemplo, aminas) que se encontram nas outras moléculas a serem imobilizadas. A escolha do agente de ligação cruzada (agente “crosslinking”) é feita, assim, de acordo com os grupos funcionais presentes na enzima, sendo, no entanto, a escolha final feita de uma maneira empírica. Para a maioria das aplicações é necessário manter a estrutura original da proteína, por isso o método de ligação covalente cruzada é feito em condições pouco agressivas, tanto de pH, quanto de concentração de tampão. É também importante obter um grau de conjugação entre o agente de ligação cruzada (agente “crosslinking”) e a proteína, pois em alguns casos (incluindo enzimas em particular) é conveniente que não seja muito elevado de modo a

permitir a manutenção da atividade biológica do material a ser imobilizado. A metodologia mais utilizada na aplicação é mergulhar a superfície do suporte (por exemplo, eletrodo) numa solução contendo a enzima ativa e o agente bifuncional (por exemplo, glutaraldeído, carbodiimida, etc) de forma a cobrir toda a superfície. Esperar a formação de uma película (períodos que variam entre poucos minutos e várias horas, dependendo do agente) seguindo-se de períodos de lavagem e secagem da superfície tratada. O glutaraldeído tem sido mais usado devido à baixa toxicidade e menor custo, quando comparado a outros reagentes bifuncionais. Além disto, as ligações entre a enzima e glutaraldeído são irreversíveis, conferindo boa estabilidade frente a variações de pH, força iônica, solvente e temperatura (LI *et al.*, 1999; IVANOV *et al.*, 2000; GADE *et al.*, 2006).

A reação mais provável, envolvendo o glutaraldeído ocorre entre os grupos aldeídos do reagente com os grupos amina livres da enzima, como pode ser observado na representação da figura 16.

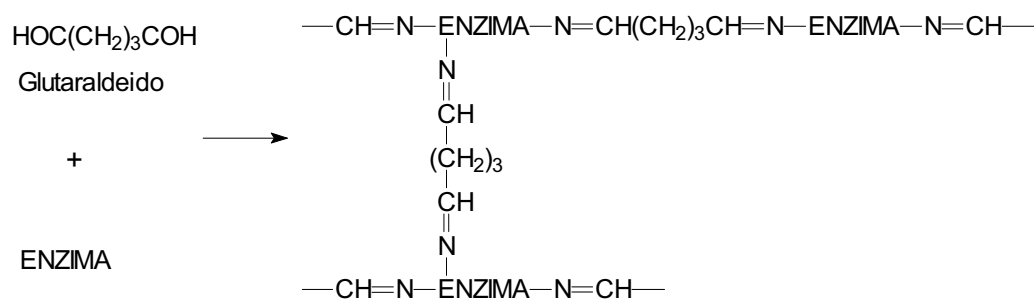


Figura 16 – Esquema proposto para a imobilização de enzima pelo método de ligação covalente cruzada utilizando o glutaraldeído.

3.4.2 Transdutores

Como já foi visto anteriormente (Figura 13), um biossensor é constituído de um componente biológico e um transdutor. Os transdutores são dispositivos os quais respondem aos produtos de uma reação ou de um processo enzimático e

convertem o sinal físico-químico a um sinal elétrico. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc.) e detector de massa (relaciona a oscilação de frequência dos cristais piezelétricos com a variação da massa). Devido a sua simplicidade, os transdutores eletroquímicos são muito empregados na construção de biossensores de baixo custo. Entre os sensores eletroquímicos, os amperométricos e potenciométricos tem sido os mais utilizados. (*THEVENOT et al., 2001; WANG et al., 2001; SCHULZE et al., 2002*).

Transdutores potenciométricos

O princípio básico das medidas potenciométricas é o desenvolvimento de potenciais sobre um eletrodo pelo acúmulo de cargas, aumentando assim a densidade de carga na superfície de um eletrodo. Este processo ocorre pela medida do potencial de célula eletroquímica na ausência de uma corrente apreciável. A diferença de potencial desenvolvido entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência é proporcional ao logaritmo da atividade, ou concentração da espécie analítica, como descrito pela equação de Nernst:

$$E = E^0 - (RT/nF)\ln([i])$$

Onde E é o potencial medido, E^0 é o potencial padrão característico para a superfície de transdução, R é a constante dos gases ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}). T é a temperatura em K ($298,2 \text{ K}$), n é o número de elétrons envolvidos na reação e [i] é a concentração da espécie analítica, com força iônica constante.

Nos biossensores, o funcionamento destes transdutores ocorre pelo aparecimento de um potencial na interface eletrodo-solução, que é dependente de uma das espécies envolvidas na reação enzimática. A magnitude do potencial desenvolvido é medida em decorrência da diferença de potencial entre o eletrodo indicador (biossensor) e um eletrodo de referência (e.g. Ag/AgCl ou Hg/Hg₂Cl₂) em solução de KCl sobre concentração definida. A diferença de potencial entre o eletrodo trabalho e o eletrodo de referência é proporcional ao logaritmo da atividade do íon ou da concentração da espécie analítica de interesse, quando há um controle da força iônica do meio.

Existem vários exemplos de biossensores utilizando transdutores potenciométricos, como pode ser visto na tabela 7. Este tipo de transdutor também tem sido bastante explorado no desenvolvimento de biossensores baseados na enzima acetilcolinesterase (REHER *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2005), com objetivo de determinar pesticidas das classes organofosforados e carbamatos.

Tabela 7 – Espécies analíticas determinados utilizando biossensores com transdução potenciométrica.

Espécie analítica	Autores
Uréia	WANG <i>et al.</i> , 2003; LAKARD <i>et al.</i> , 2004; RAJESH <i>et al.</i> , 2005; KURALAY <i>et al.</i> , 2005 JHA <i>et al.</i> , 2008.
Etanol	ROTARIU <i>et al.</i> , 2004.
Glicose	KORMOS <i>et al.</i> , 2000; ADELOJU & MOLINE, 2001; TINKILIC <i>et al.</i> , 2002; LIAO <i>et al.</i> , 2007 .
Ácido L-Ascórbico	FERNANDES <i>et al.</i> , 1999.
Lisina	SAURINA <i>et al.</i> , 1998; SAURINA <i>et al.</i> , 1999; VILLAR <i>et al.</i> , 2003.

Nestes biossensores, o transdutor converte o sinal físico-químico, o potencial na interface eletrodo-solução, que é dependente do ácido acético gerado na hidrólise do cloreto de acetilcolina, catalisada pela enzima acetilcolinesterase em um sinal elétrico. Os pesticidas organofosforados inibem a enzima, diminuindo a atividade enzimática, resultando em um decréscimo do sinal potenciométrico. A detecção eletroquímica é estudada pela medida na mudança da concentração de ácido acético, ou seja, a variação no potencial na interface eletrodo-solução é relacionada com a concentração do pesticida presente na amostra.

Biossensores para ésteres de colina, baseados na imobilização de uma esterase apropriada e na medida da mudança de pH (o qual diminui em função da formação de um ácido orgânico na hidrólise do éster) que utilizam eletrodo de vidro, (MULCHANDANI *et al.*, 1999), eletrodos de óxidos (TRAN-MINH *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 2002; SCHÖNING *et al.*, 2003) e transistores, com efeito de campo sensível a H^+ (WALLY *et al.*, 1999; ANH *et al.*, 2002; HAI *et al.*, 2006), em geral têm se mostrado de fácil aplicação, pois são compatíveis com sistemas de medidas convencionais, além de permitirem a utilização de vários métodos de imobilização de enzimas inibidas por organofosforados (IVANOV *et al.*, 2000).

3.5 Filmes poliméricos usados no desenvolvimento de biossensores.

Um eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizado na eletroquímica por Murray e colaboradores, na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos (MOSES *et al.*, 1975; PEREIRA *et al.*, 2002). O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a

reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações (*GENG et al., 2007; YANG et al., 2008; KAMYABI & AGHAJANLOO, 2008; XIANG et al., 2008*). Particularmente, para o desenvolvimento de biossensores, a modificação de superfície pode ser usada para garantir o sucesso na etapa de imobilização e estabilização de biocomponentes, tais como enzimas, sobre a superfície da matriz, no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais responsáveis pela transdução do sinal analítico.

Desta forma, materiais que possam permitir a imobilização de espécies mediadoras e moléculas biológicas são de grande potencial para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Dentre os materiais inorgânicos, a sílica-gel apresenta um grande potencial como material suporte para imobilização de biocomponente, além de ser passível de incorporações de outros materiais para aumentar a estabilidade e sensibilidade de biossensores produzidos com este suporte. Podemos destacar alguns biossensores eletroquímicos que empregam eletrodos modificados à base de sílica, utilizados na determinação de espécies analíticas, tais como etanol, lactato, frutose, glicose, peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos (*ROSATTO et al., 1999, SANTOS et al., 2003; WANG et al., 2004; DI et al., 2007; BAI et al., 2007; HUANG et al., 2008*).

Outra possibilidade de modificação de superfície é o recobrimento com filmes poliméricos. Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos, condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse. O recobrimento pode ocorrer em várias monocamadas da espécie ativa modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Desta forma, os filmes poliméricos têm sido empregados em eletrodos

quimicamente modificados e usados no desenvolvimento de sensores e biossensores com objetivo de proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (*PERSSON et al., 1993; GARGUILO et al., 1993; WALLACE et al., 1999*). A tabela 8 apresenta alguns exemplos de EQM utilizados na determinação de importantes espécies analíticas, usando biossensores.

A utilização de filmes poliméricos oferece, além das vantagens já citadas anteriormente, várias vantagens para a construção de sensores e biossensores. São materiais relativamente baratos, as técnicas de fabricação são simples, podem ser depositados em vários tipos de suporte e a possibilidade de escolha de diferentes estruturas moleculares proporciona a construção de filmes com diversas características (*HARSAÁNYI, 2000*).

Filmes poliméricos podem ser formados na superfície de eletrodos por oxidação eletroquímica de diversas estruturas eletroativas em meio aquoso ou em meio orgânico. A partir dessas diferentes estruturas podem-se criar filmes condutores e não-condutores (*LONG & MARX, 2001*).

Os polímeros não-condutores preparados por eletropolimerização apresentam grande resistência elétrica. O crescimento desses polímeros é auto-limitado e o filme formado é muito mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido à sua fina espessura, entre 10 e 100 nanômetros, os substratos e produtos difundem-se mais rapidamente (*NAKABAYASHI et al., 1998; NAKABAYASHI & YOSHIKAWA, 2000*). Também, os filmes não-condutores, por serem permeáveis e seletivos, podem ser úteis para prevenir a aproximação de espécies interferentes no eletrodo.

Tabela 8 – Biossensores eletroquímicos empregando eletrodos modificados.

Espécie Analítica	Enzima	Eletrodo Modificado	Referências
Glicose	--	Polímero de polipirrol eletropolimerizado	UMANA & WALLER, 1986
	<i>Glicose oxidase</i>	Polímero de polipirrol modificado com ferroceno	FOULDS <i>et al.</i> , 1988
	<i>Glicose oxidase</i>	Imobilização da enzima e Azul da Prússia através da eletropolimerização de pirrol sobre eletrodo de Pt.	GARJONYTE & MALINAUSKS, 2000;
Histamina	<i>Metilamina desidrogenase</i>	Imobilização da enzima e ferricianeto através da eletropolimerização de pirrol sobre microeletrodo de ouro	ZENG <i>et al.</i> , 2000
Organofosforados	<i>Acetilcolinesterase</i>	Grafite/epóxi/TCNQ ^a /ENZIMA imobilizada em APTES ^b	MARTORELL <i>et al.</i> , 1997;

^aTCNQ- 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano; ^bAPTES- 3-aminopropiltrietoxissilano.

Os polímeros condutores foram descobertos em 1977 por MacDiarmid, Heeger e Shirakawa. Estruturalmente, estes polímeros possuem uma cadeia orgânica alternada entre ligações simples e duplas (HARSANIY, 2000). Várias teorias predizem que os elétrons π são deslocalizados sobre toda a cadeia e que o intervalo entre bandas torna-se menor quanto maior for a extensão da conjugação. Além disso, SHIRAKAWA *et al.*, (1977) e DE PAOLI *et al.*(2000) demonstraram aumento na condutividade elétrica desses polímeros tratando-os com ácidos ou bases de Lewis, em um processo de adição e remoção de elétrons denominada dopagem, em analogia aos semicondutores inorgânicos. Este processo nada mais é do que reações de oxi-redução envolvendo transporte de íons para dentro e fora do polímero (DE PAOLI *et al.*, 2000).

Para formação do filme polimérico, podem ser utilizados polímeros pré-sintetizados, em solução ou, no caso da superfície a ser modificada apresentar

condutividade elétrica, pode-se recorrer à eletropolimerização *in situ*. Neste último caso, o polímero eletrogerado deve ser condutor ou permeável ao eletrólito de suporte.

Polímeros podem ser eletroquimicamente sintetizados por meio de reações anódicas ou catódicas de seus monômeros, no eletrodo de trabalho. Entretanto, a polimerização anódica é o processo mais usado. Esta consiste em uma oxidação eletroquímica de uma solução do monômero, resultando no recobrimento do cátodo pelo polímero sintetizado. Este procedimento requer em geral, uma célula de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho como ânodo, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência. A eletropolimerização envolve uma reação eletroquímica-química-eletroquímica (ECC, do inglês, electrochemical-chemical- chemical). O primeiro passo (eletroquímico) ocorre com a eletrooxidação do monômero utilizado ao seu correspondente cátion-radical (*INZELT et al, 2000*). A parte química envolve a polimerização na solução e, por último, a eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (Figura 17).

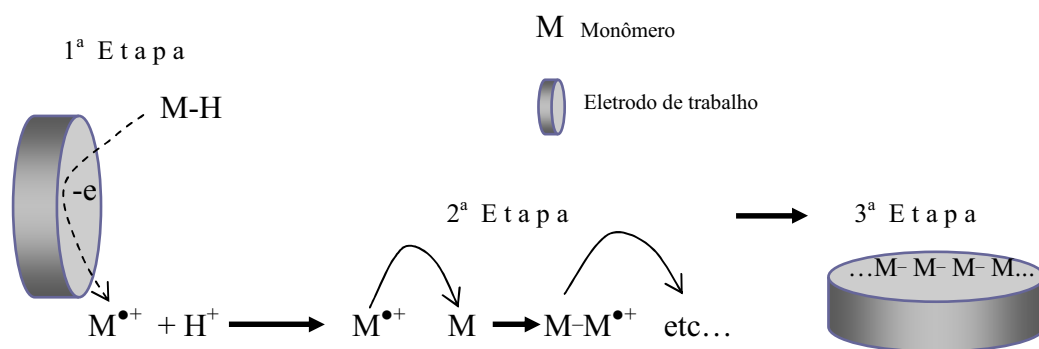


Figura 17 – Esquema geral de uma reação eletroquímica-química-química (ECC).

Os cátions-radicais formados eletroquimicamente no primeiro passo podem, também, de acordo com as condições experimentais e devido à sua alta instabilidade, promover outros tipos de reação. Nos casos favoráveis a uma ECC,

a dimerização é o primeiro passo da etapa química. O crescimento da cadeia e, conseqüentemente, formação do polímero, procede via reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Porém, reações de dimerizações paralelas podem ocorrer levando a formação de produtos diferentes ou a polímeros com estruturas distorcidas. Pode ocorrer, ainda, a reação de terminação entre dois cátions-radicais gerando um dímero neutro. Os íons inativos presentes na solução podem ainda participar na estabilização dos cátions radicais. Quantidades relativamente altas de cátions-radicais e dímeros devem estar próximos da vizinhança do eletrodo devido ao fato deles poderem difundir do eletrodo facilmente. A agitação da solução diminui a quantidade de polímero formado. Os cátions-radicais podem reagir com o eletrodo ou podem promover reações laterais com o solvente ou moléculas presentes na solução.

Na literatura são descritos vários trabalhos envolvendo a formação de filmes poliméricos construídos a partir de monômeros com átomos de oxigênio acoplados a anéis aromáticos (*EKINCI et al., 1996, MENEZES & MAIA, 2006, VIEIRA et al., 2006, FERREIRA et al., 2007, FERREIRA et al., 2008; BRITO-MADURRO et al., 2007, FRANCO et al., 2008*).

A anilina (*GENIÉS et al., 1990*) e o fenol (*LAPUENTE et al., 1998*) são monômeros que foram extensivamente estudados sobre a eletropolimerização. Anilinas substituídas normalmente são preferíveis devido a levarem a formação de polímeros com maior solubilidade e, assim, melhor processabilidade em solução. Os fenóis e seus derivados são conhecidos por formarem polímeros não-condutores. Estudos (*LOFRANO et al., 2000; LOFRANO et al., 2001; LOFRANO et al., 2004*) têm sido realizados e indicam que monômeros contendo grupamentos aromáticos ligados diretamente a oxigênio apresentam facilidade de

polimerização, além de alta resistência mecânica do filme obtido propiciando maior estabilidade para o eletrodo modificado formado.

Aminofenóis são estruturas que podem ser classificadas como derivados do fenol e da anilina por apresentarem os grupos -NH_2 e -OH ligados a um anel aromático, ambos podendo ser oxidados. Um importante fator é a relação da posição desses dois grupos no anel. As propriedades eletroquímicas dos três isômeros de posição (Figura 18) são extremamente diferentes (*SALAVAGIONE et al., 2004*).

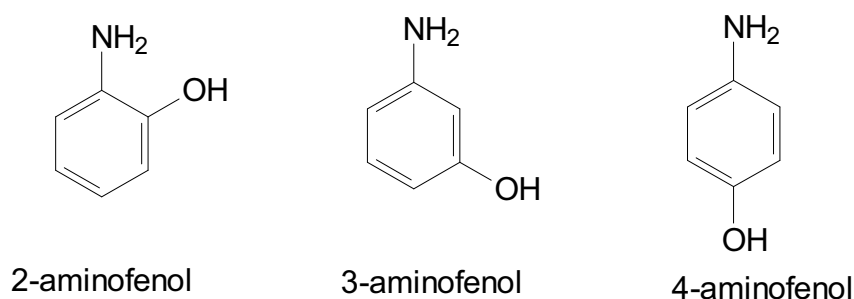


Figura 18 – Estrutura dos aminofenóis.

O estudo de aminofenóis é interessante do ponto de vista eletroquímico, pois apresenta dois grupos oxidáveis (-NH_2 e -OH), diferentemente da anilina e do fenol. A presença desses grupos funcionais é adequada para imobilização de biomoléculas. Além disso, apesar da diferença estrutural entre esses compostos 2-aminofenol(2-AMP), 3-aminofenol(3-AMP), 4-aminofenol (4-AMP), anilina quanto o fenol, apresentam um comportamento eletroquímico similar, pois tanto a anilina e o fenol são moléculas precursoras na formação de filmes com ampla aplicação em sensores e biossensores. (*SALAVAGIONE et al., 2004*).

O isômero mais estudado na literatura é o 2-aminofenol. Desde que sua polimerização eletroquímica foi realizada, por *BARBERO et al., 1987* e *KUNIMURA et al., 1988*, vários trabalhos (*BARBERO et al., 1989*; *BARBERO et*

al., 1990; BARBERO *et al.*, 2004; JACKOWSKA *et al.*, 1993; POSADAS *et al.*, 1997; ORTEGA, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2000; TUCCERI, 2001; MU, 2004; TUCCERI, 2004; TAO *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2005;) foram realizados ao longo dos anos estudando sua polimerização, co-polimerização com outros monômeros, suas propriedades eletroquímicas e espectroscópicas além de várias aplicações, incluindo biossensores. Do mesmo modo que os outros isômeros, seu mecanismo de polimerização ainda não foi definido (GUENBOURA *et al.*, 2000), embora o produto já tenha sido caracterizado como derivado de anéis de fenoxazina (Figura 19).

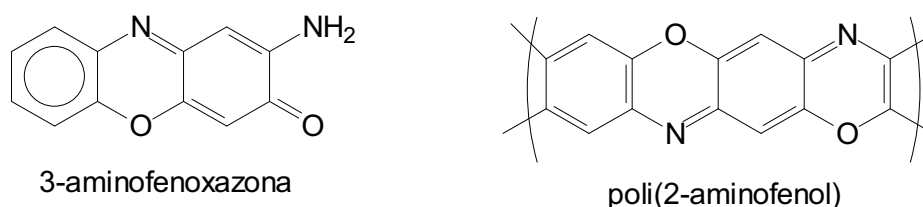


Figura 19 – Estruturas do processo de oxidação eletroquímica e processo químico do *o*-aminofenol.

Poucos estudos são encontrados na literatura com respeito à eletropolimerização de 3-aminofenol. Seu mecanismo de formação ainda é desconhecido devido ao fato de haver controvérsias sobre a formação do primeiro cátion-radical e, conseqüentemente, do início do mecanismo (TAJ, *et al.*, 1992; SANKARAPAPAVINASAM, 1993). O polímero formado é considerado não-condutor e foi estudado, co-polimerizado com a anilina (ZHANG *et al.*, 2006), utilizado para construção de sensores para detecção de bactérias (YING-SING *et al.*, 2000) e de peróxido de hidrogênio.

TAJ *et al.*, 1992, reportaram pela primeira vez a formação do primeiro filme de 4-AMP em eletrodo de platina, por voltametria cíclica. A partir daí,

outros grupos mostraram interesse na formação e na elucidação da estrutura desses filmes, bem como na sua aplicação (SALAVAGIONE *et al.*, 2004).

VIEIRA *et al.*, (2006) também demonstraram a formação de poli(4-AMP) sobre eletrodos de grafite em diferentes valores de pH. As análises indicaram que filmes preparados em meio ácido favorecem a transferência de carga. Por outro lado, filmes preparados em meio básico geraram filmes passivantes, os quais dificultam a transferência eletrônica.

BRITO-MADURRO *et al.*, (2007) modificaram eletrodos de grafite com poli(4-AMP), o qual indicou ser eficiente para imobilização das biomoléculas, adenosina trifosfato e guanosina trifosfato. A amplitude do sinal de detecção dessas bases foi vinte e quatro vezes maiores quando comparado ao eletrodo de grafite não modificado com poli(4-AMP).

Estudos (HAWLEY & ADAMS, 1965) sugeriram que a eletrooxidação do poli(4-AMP) envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo quinoneimina seguida por hidrólise, produzindo p-benzoquinona (Figura 20).

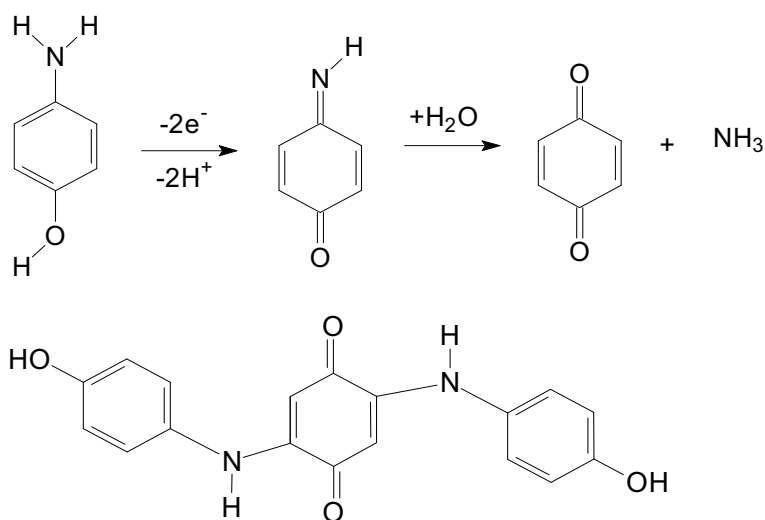


Figura 20 – Proposta para acoplamento 1-4 via nitrogênio.

Em maiores valores de pH, os autores sugerem reações de acoplamento 1-4 e, posteriormente, a formação do polímero. A mesma proposta mecanística foi descrita por MENEZES e MAIA (2006) em estudos de filmes derivados de 4-

aminofenol sobre superfície de platina, em diferentes valores de pH. Os polímeros produzidos indicaram diferentes valores de retenção de carga em função do pH que estão relacionados com grande número de ligações fenil-N-fenil (Figura 20).

3.6 Técnicas eletroanalíticas

3.6.1 *Voltametria cíclica*

Técnicas voltamétricas englobam um grupo de métodos eletroanalíticos em que as informações sobre a espécie analítica são obtidas através da medida de intensidade de corrente como função do potencial. Uma das técnicas mais versáteis e antiga é a voltametria cíclica (VC), onde uma rampa de potencial triangular variando continuamente com o tempo, é aplicada ao eletrodo de trabalho, o que pode conduzir a ocorrência de reações de oxidação e redução de espécies eletroativas. A varredura se inicia no potencial (a) seguindo até o potencial de inversão (b) e retornando, geralmente ao potencial inicial (c). Esta forma de variação de potencial é apresentada na figura 21, onde também é representada a curva de corrente-voltagem obtida, que é chamada de voltamograma.

Para este tipo de análise são geralmente utilizados geralmente podem ser usados três eletrodos. O eletrodo de trabalho onde são medidas as correntes geradas em processos redox de interesse. O eletrodo de referência, de potencial conhecido e constante, é a referência em relação a qual o potencial do eletrodo de trabalho é aplicado. E o eletrodo auxiliar (também chamado de contra-eletrodo) é onde ocorrem também processos redox e o fechamento do circuito elétrico.

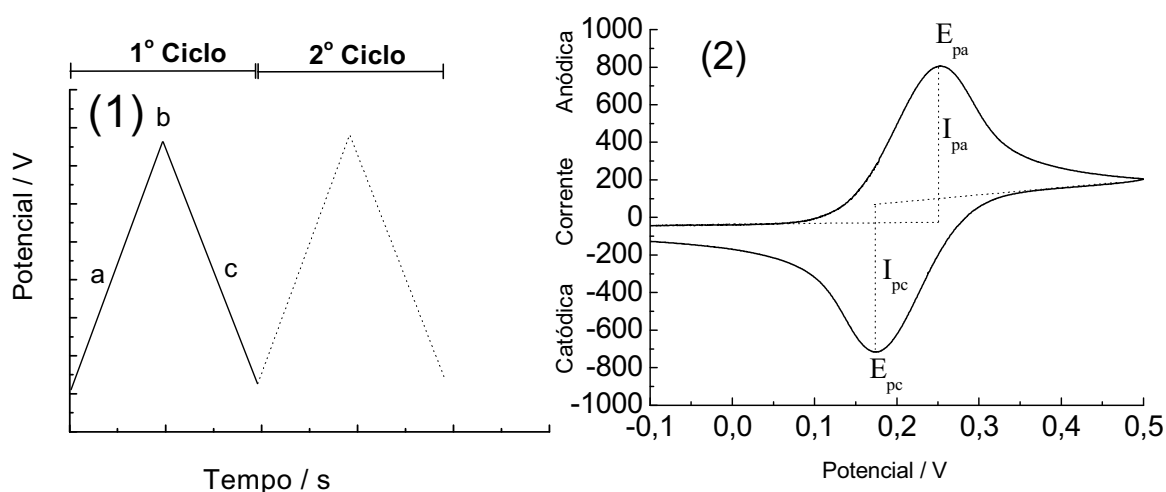


Figura 21 – Variação linear do potencial no tempo, com inversões periódicas(1): varredura direta(a), potencial de inflexão(b), varredura inversa(c); Resposta de corrente–potencial na voltametria cíclica(2).

3.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica que tem sido muito utilizada para caracterizar processos que envolvem transferência de carga elétrica (LASIA, 2001; BUENO *et al.*, 2006). O princípio básico desta técnica é a aplicação de uma perturbação a uma célula eletroquímica, por exemplo, por meio de uma tensão elétrica senoidal. O potencial elétrico $E(t)$, aplicado varia com o tempo t de acordo com a expressão, $E(t) = A \cos \omega t$, onde ω é a frequência angular correspondente a $2\pi f$, sendo f a frequência com que a corrente alternada oscila, normalmente medida em Hertz (Hz) e A é a amplitude máxima da função senoidal. O ω é expresso em radianos. A resposta a perturbação aplicada é uma corrente elétrica, também senoidal, com a mesma frequência da tensão aplicada, diferenciando apenas na amplitude da fase. A resposta de corrente $I(t)$ a esta oscilação do potencial pode ser expressa por: $I(t) =$

$B \sin(\omega t + \phi)$, onde ϕ é o deslocamento da corrente com relação ao potencial e é conhecido como ângulo de fase (Figura 22), B é amplitude máxima na função senoidal. O espectro de impedância é obtido pela variação da frequência ($f = \omega/2\pi$) para o potencial aplicado. Quando o potencial senoidal aplicado possui valor aproximadamente igual ao potencial de circuito aberto e pequena amplitude, a relação entre a corrente elétrica e potencial aplicado será aproximadamente linear, e pode ser expressa por uma expressão semelhante à da lei de Ohm, ou seja: $E(t) = ZI(t)$, onde Z é chamado de impedância. (GIROTTI & DE PAOLI, 1999).

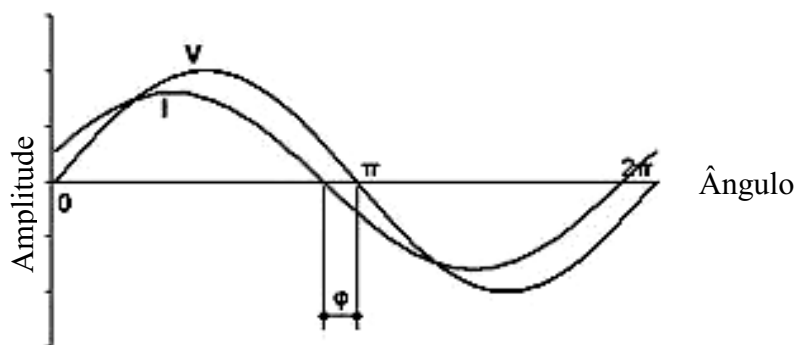


Figura 22 – (A) Comportamento do potencial aplicado e da corrente resultante relativo a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

Na espectroscopia de impedância eletroquímica são aplicados potenciais em faixas de frequência de aproximadamente 10^{-3} a 10^4 Hz, com a finalidade de avaliar propriedades dielétricas, reações de oxi-redução e transporte de massa que podem ocorrer na interface eletrodo-solução, as quais são governadas por características elétricas e químicas da solução e do eletrodo.

A análise dos resultados de impedância é freqüentemente realizada por meio de simulação com modelos de circuitos elétricos equivalentes. O modelo de

circuito elétrico mais utilizado para representar o que ocorre na superfície eletrodo solução é mostrado na figura 23.

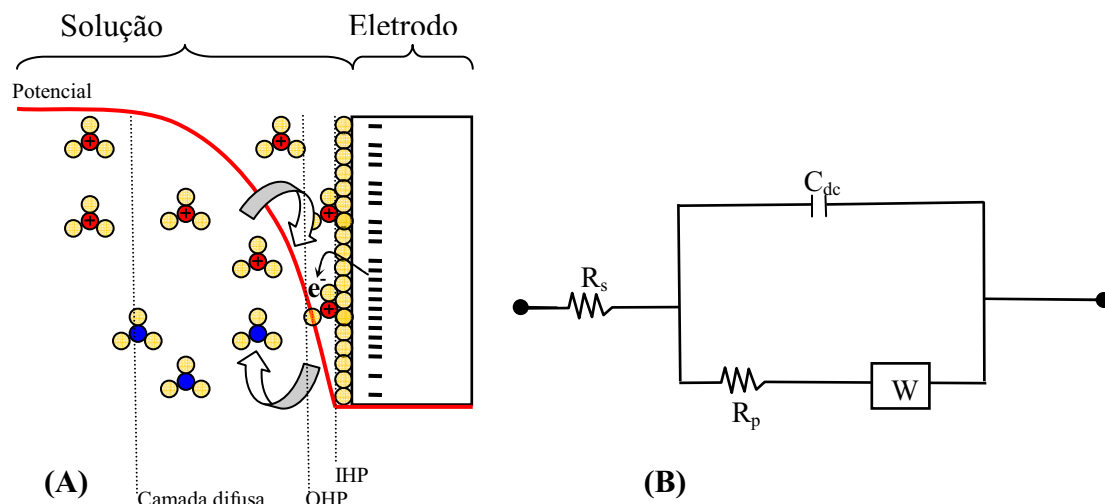


Figura 23 –Interface eletrodo-solução(A): IHP-plano interior de Helmholtz; OHP-plano exterior de Helmholtz; circuito elétrico equivalente(B).

No modelo de circuito elétrico apresentado na figura 23 B, C_{dc} , representa a capacitância da dupla camada elétrica (IHP e OHP), na interface eletrodo solução, enquanto que $R_p = R_{tc}$, corresponde à resistência a transferência de carga ou impedância faradaica. O $W = Z_w$ = impedância Warburg corresponde à impedância que mede a resistência ao transporte de massa de espécies eletroativas. Além destes parâmetros, a impedância também é função da resistência não compensada, ou seja, a resistência da solução entre os eletrodos de trabalho e de referência representado por R_s . O sistema mais simples (contendo, R_s , C_{dc} , R_p e Z_w) é conhecido como o circuito de Randles (BUENO *et al*, 2006).

Os resultados da técnica de impedância são normalmente apresentados na forma de gráficos que relacionam os parâmetros de frequência de excitação(f), em Hz, ângulo de fase, magnitude e componentes real e imaginário da impedância. A

representação utilizada, neste trabalho foi o diagrama de Nyquist e Bode. O diagrama de Nyquist é construído plotando-se nos eixos correspondentes, os valores das componentes real e imaginário (Z' e Z'' respectivamente) da impedância do sistema. O gráfico de Bode no entanto é construído plotando-se nos eixos correspondentes o ângulo de fase e o log da frequência de excitação.

4 Parte experimental

4.1 Reagentes

- 2-aminofenol (C_6H_7NO), 99%; ACROS ORGANICS; M.M.= $109,1 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 95-55-6.
- 3-aminofenol (C_6H_7NO), 98%; ALDRICH; M.M. = $109,13 \text{ g mol}^{-1}$; CAS: 591-27-5.
- 4-aminofenol (C_6H_7NO), 97,5%; ACROS ORGANICS; M.M. = $109,13 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 123-30-8.
- Acetilcolinesterase; SIGMA(EC-323-559-3); tipo VI-S; CAS: 9000-81-1; 403Unidades/ mg de proteína.
- Acetona (CH_3OCH_3), 99%; M.M. = $58,08 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 67-64-1.
- Ácido Acético glacial, (CH_3COOH), 99%; VETEC $d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$; M.M. = $60,05 \text{ g mol}^{-1}$; CAS: 64-19-7.
- Ácido perclórico ($HClO_4$), 70%, A.C.S, M.M. = $100,46 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 7601-90-3.
- Cloreto de Acetilcolina ($C_7H_{16}ClNO_2$), 99%; ACROS ORGANICS; CAS: 60-31-1.
- Cloreto de metileno (CH_2Cl_2), 99,5%; VETEC; M.M. = $84,93 \text{ g mol}^{-1}$; $d= 1,33 \text{ g mL}^{-1}$; CAS: 75-09-2.
- Cloreto de potássio (KCl), 99%; NUCLEAR; CAS:7447-40-7.
- Cloreto de sódio (NaCl), 100%, BIOTEC; M.M.= $58,44 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 20510-55-8.
- Diclorvós: 2,2-diclorovinil dimetil fosfato ($C_4H_7Cl_2O_4P$); PESTANAL; M.M. = $220,98 \text{ g mol}^{-1}$; grupo químico: organofosforado; classe: inseticida; CAS: 62-73-7.
- Éter de petróleo($C_{13}H_{12}O_2$), 100%; BIOTEC; M.M. = $236,45 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS: 101316-46-5.
- Ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$], 100%, REAGEN M.M.= $329,25 \text{ g.mol}^{-1}$. CAS: 13746-66-2.
- Ferrocianeto de potássio [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$], 100%, VETEC, M.M. = $422,39 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS:13943-58-3.
- Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), 99%; CINÉTICA; M.M.= $136,09$; CAS:7778-77-0.

- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 99%; CINÉTICA; M.M.= 268.07; CAS:7782-85-6.
- Hidróxido de sódio (NaOH), 100%, Vetec, M.M.= 40,00 g.mol^{-1} ; CAS: 1310-73-2.
- Nitrato de potássio(KNO_3), 99%; M.M.= 101,10 g.mol^{-1} ; CAS: 7757-79-1.
- Púrpura de Bromocresol: 5',5"-dibromo-o-cresolsulfoftaleína ($\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$), 90%; M.M.= 540.223 g mol^{-1} ; CAS: 115-40-2.
- Solução de glutaraldeído 50%; VETEC; $d=1,12 \text{ g mL}^{-1}$; M.M. = 100,12 g mol^{-1} ; CAS: 111-30-8.
- TMB-4: 1,1'- Trimetileno- bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima; SIGMA; pureza: 95%; M.M.= 446,1 g mol^{-1} ; CAS: 56-97-3.

4.2 Materiais e equipamentos utilizados

Toda a vidraria utilizada foi deixada em banho de ácido nítrico 10% por aproximadamente 24 horas e lavada com água deionizada.

Água deionizada foi obtida de ultrapurificador microprocessado Máster System Gehaka (Figura 24 A). Medidas de pH foram realizadas utilizando pHmetro Digital PG1800 (Figura 24 B). Foi utilizado ainda um ultra-som Ultrasonic Cleaner 1450 USC (Figura 24 C).

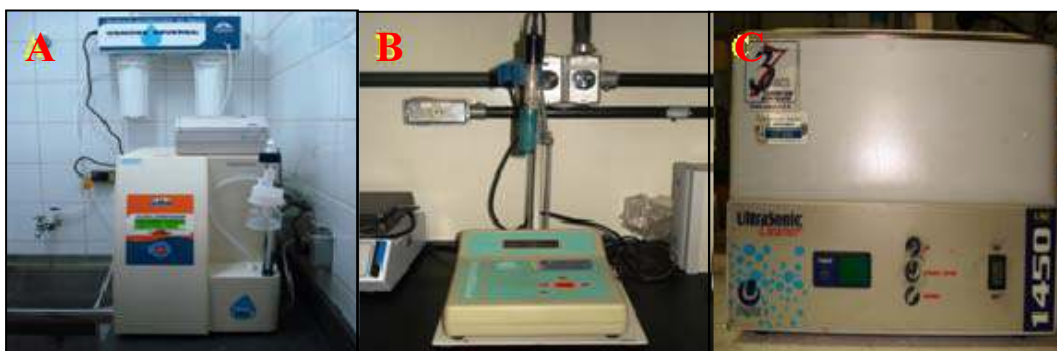


Figura 24 – Equipamentos utilizados para o fornecimento de água(A), medidas de pH(B) e limpeza dos eletrodos por ultra-som(C).

Para os estudos eletroquímicos (voltametria cíclica e Espectroscopia de impedância eletroquímica) e formação de filmes poliméricos foi utilizada uma cela eletroquímica de três compartimentos (Figura 25 A). Como eletrodo auxiliar foi utilizado uma placa de platina de 2cm² de área aparente (Figura 25 B). Todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Figura 25 C). O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de carbono grafite, com 6 mm de diâmetro, (Figura 25 D). Um sistema montado pode ser visto na figura 25 E.

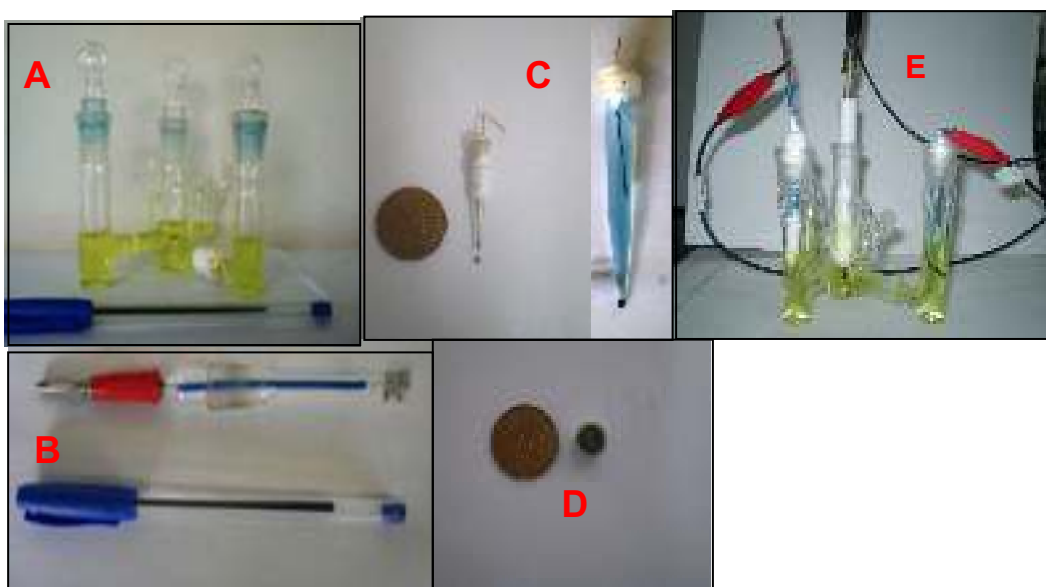


Figura 25 – *Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos.*

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato CH Instruments modelo 1120 A (Figura 26 A). Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab 302N (Figura 26 B). Uma politriz Aropol 2V da Arotec (Figura 26 C) foi utilizada para polimento mecânico dos eletrodos de trabalho.



Figura 26 – Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos.

As superfícies modificadas dos eletrodos foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 940A, marca ZEISS (Figura 27 A) e em microscópio de força atômica Nanoscope III da Digital Instruments (Figura 27 B).



Figura 27 – Equipamentos utilizados nas análises morfológicas dos eletrodos modificados.

A figura 28 mostra o sistema em fluxo utilizado neste trabalho. Tubos de polietileno (0,8 mm de diâmetro) foram usados para alças de injeção e linhas de transmissão. As soluções foram bombeadas usando uma Bomba peristáltica Minipuls 3 da Gilson (Figura 29) e tubos de Tygon[®].

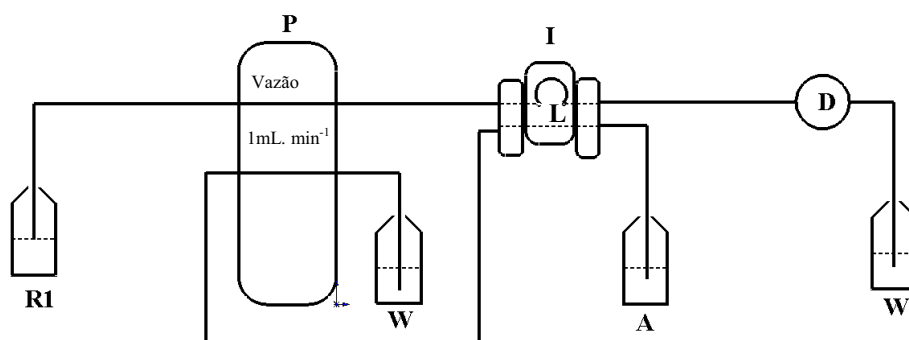


Figura 28 – Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. *R*₁, solução transportadora; *P*, bomba peristáltica (figura 29 A); *W*, resíduo; *L*, alça de amostragem; *I*, válvula injetora (figura 29 B); *A*, soluções padrões de pesticida ou cloreto de acetilcolina preparados em solução transportadora; *D*, detector potenciométrico.



Figura 29 – Equipamentos do sistema em fluxo: A- Bomba peristáltica; B-Injetor comutador de geometria circular.

O sistema de detecção proposto, ilustrado na figura 30, é uma célula eletroquímica, onde o eletrodo de referência é um fio de Ag com AgCl eletrodepositado (Figura 30 h) (SANTOS *et al.*, 2007; PEDROTTI *et al.*, 1996), e o eletrodo de trabalho constituído de um disco de grafite de 6 mm de diâmetro fixado com cola de prata sobre uma peça cilíndrica de latão (Figura 30 d ; Figura 30 e). A superfície deste eletrodo foi modificada com filmes de aminofenóis e enzima acetilcolinesterase (10U). O compartimento interno da célula possui capacidade para 460 μ L.

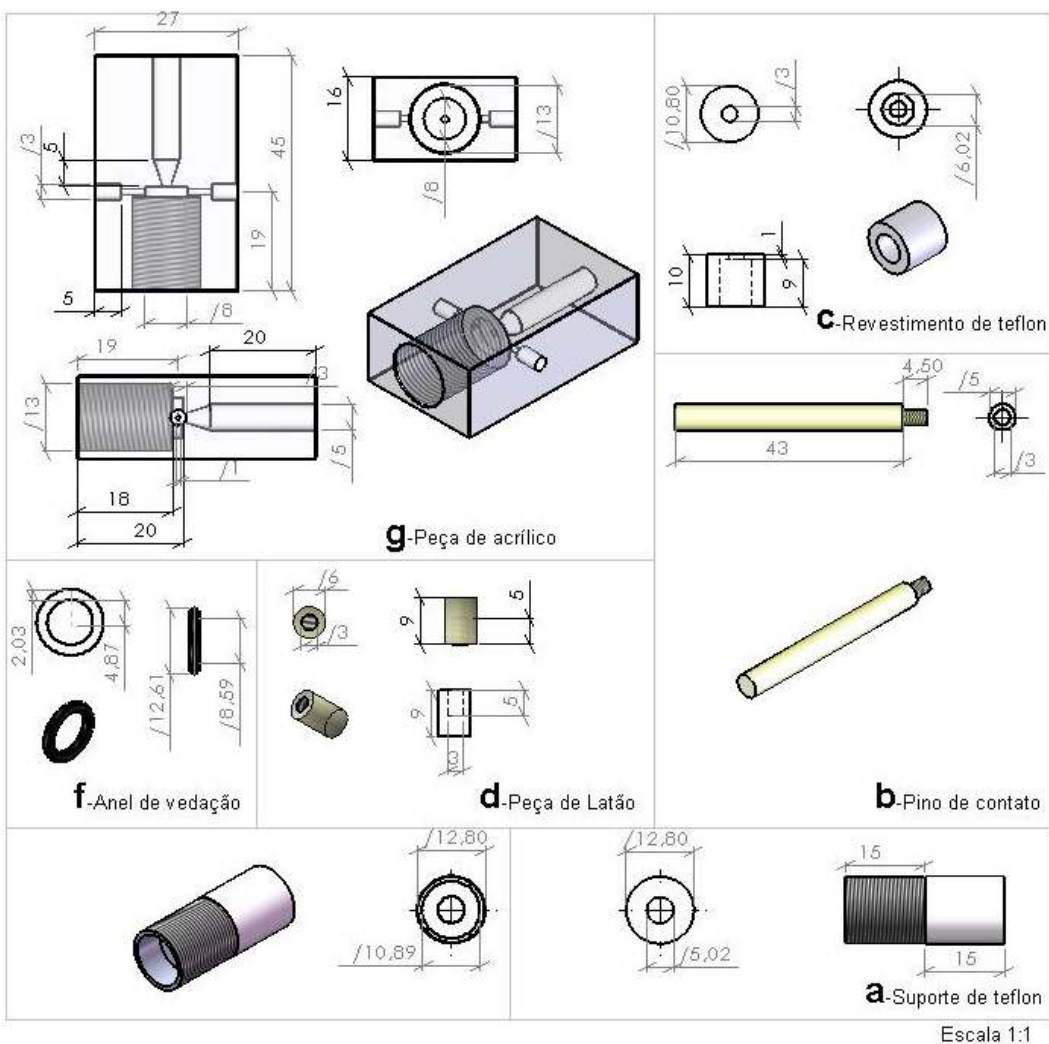


Figura 30 – Célula eletroquímica usada como sistema de detecção potenciométrica.

a-suporte de Teflon; **b**-pino de contato;**c**-Revestimento de teflon; **d**-Peça de latão; **e**-disco de grafite; **f**- anel de vedação; **g**-Peça de acrílico; **h**- eletrodo de referência Ag/AgCl.

4.3 Soluções

Foram preparadas soluções estoque a partir de quantidades adequadas de reagentes com grau analítico e água deionizada ($0,05\mu\text{S}$) obtida de um sistema Master System (Figura 24 A). A partir de soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho.

Solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e Monômeros de Aminofenóis

Soluções padrão contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram preparadas utilizando-se $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 . As soluções dos monômeros 2-aminofenol, 3-aminofenol e 4-aminofenol foram preparadas em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. As soluções foram deaeradas por 45 minutos com nitrogênio ultra-puro.

Solução Tampão Fosfato

Uma solução estoque de tampão fosfato ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), pH igual a 7,4, foi preparada pesando-se 2,7218 g de KH_2PO_4 e 2,8414 g de Na_2HPO_4 e transferindo para um balão de 100 mL que foi completado com água deionizada.

Solução Transportadora

A solução transportadora ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato 1 mmol L^{-1}) utilizada no sistema em fluxo, foi preparada pesando-se 14,9100 g de KCl , em seguida transferido para um balão volumétrico de 2L. A este balão foi adicionado 5 mL de uma solução estoque de tampão fosfato $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e completado o volume do balão com água deionizada. Se necessário, o pH da solução era

corrigido para 7,40 com solução de NaOH ou HCl. Esta solução foi usada no preparo das soluções de trabalho de cloreto de acetilcolina e ácido acético.

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

Esta solução foi preparada em tampão fosfato (1mmol L^{-1} ; pH 7,0) pesando-se 0,1000 g de albumina de soro bovino que foi transferida para um balão de 10 mL.

Solução de Cloreto de Acetilcolina

Transferiu-se 3,6300 g de cloreto de acetilcolina para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com solução transportadora ($\text{KCl } 0,1\text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato 1mmol L^{-1}) para obtenção de solução de cloreto de acetilcolina $0,2\text{ mol L}^{-1}$. O pH desta solução foi corrigido para 7,40 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. A partir desta solução estoque foram preparadas as soluções de trabalho.

Solução de Glutaraldeído 3% v/v

Transferiu-se 3,0 mL de solução de glutaraldeído 50% v/v para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada para obtenção do glutaraldeído a 3% v/v.

Solução de Diclorvós

Preparou-se a solução de diclorvós $0,113\text{ mol L}^{-1}$ em acetona, que foi mantida em refrigeração. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição desta solução.

Solução de Acetilcolinesterase

A enzima liofilizada (1,75 mg) foi dissolvida em 2 mL de solução tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 7,00 e mantida em refrigeração, numa temperatura de 4° C. Neste volume de solução (2 mL), a enzima possui uma atividade enzimática teórica de 705,25 U.

Solução de TMB-4

Transferiu-se 0,112 g de 1,1'- Trimetileno- bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetona, obtendo uma solução 5 mmol L⁻¹. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição desta solução.

4.4 Preparação de eletrodos

4.4.1 Eletrodo de referência

O eletrodo de Ag/AgCl foi obtido por eletrodeposição de AgCl na superfície de um fio de Ag como anodo, e como cátodo foi utilizado uma placa de platina de 2 cm² de área aparente, e solução de cloreto de potássio 0,10 mol L⁻¹. A eletrodeposição de AgCl no anodo foi realizada sob corrente constante de 1 mA, durante duas horas, utilizando um potenciostato CH Instruments modelo 1120 A (Figura 26 A). Terminada a eletrodeposição, o fio de prata foi colocado no interior de uma ponteira com extremidade inferior devidamente vedada, e preenchida com uma solução de cloreto de potássio 3,00 mol L⁻¹, saturada de AgCl (SANTOS *et al.*, 2007; PEDROTTI *et al.*, 1996).

4.4.2 Eletrodo de trabalho e formação de filmes poliméricos

O eletrodo de trabalho (carbono grafite) foi polido mecanicamente em feltro umedecido com uma suspensão de alumina 0,30 μm e água deionizada em politriz e manualmente. Após esse tratamento, os eletrodos foram levados a um ultra-som para remoção de partículas residuais de alumina.

Os eletrodos polidos foram transferidos para a célula eletroquímica (Figura 25 E), contendo a solução com o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ previamente desoxigenadas. Com objetivo de manter sempre o mesmo “padrão de superfície” para os eletrodos utilizados, foram feitos voltamogramas cíclicos variando-se o potencial entre -0,10 V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Após esse processo, os eletrodos pré-selecionados foram lavados, secos e transferidos para uma célula de três compartimentos (figura 25 E) contendo o eletrólito suporte na ausência do monômero. A seguir, os eletrodos foram lavados com água deionizada e recolocados na célula de três compartimentos contendo o monômero de aminofenol. A eletropolimerização dos monômeros foi realizada com sucessivas varreduras, variando-se o potencial limite entre -0,20 a +0,67 V, 0,20 a 1,10V e 0 a 0,64V *vs.* $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{Sat.})}$ para os monômeros de 2-aminofenol, 3-aminofenol e 4-aminofenol, respectivamente, à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Os eletrodos modificados, após eletropolimerização foram lavados com água deionizada para remoção do excesso de monômero não polimerizado.

4.5 Cálculo da atividade enzimática

O estudo da cinética enzimática para o cálculo da atividade enzimática na solução estoque de acetilcolinesterase foi realizado utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis, onde se colocou em uma cubeta 684,8 μL de tampão

fosfato 1,0 mmol L⁻¹ a pH 7,40 com 7,0 µL de Purpura de bromocresol (1mmol L⁻¹), 5,4 µL de cloreto de acetilcolina (1mmol L⁻¹) e 2,84µL de solução estoque de enzima. No momento da adição da solução estoque da enzima o espectrofotômetro foi acionado no modo cinético, monitorando a absorvância a 430nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a equação:

$$U(\mu mol_{\text{ácido acético}} / \text{min}) = \frac{\Delta Abs.V_2}{\varepsilon.V_1} . 2000$$

Onde ΔAbs corresponde a variação da absorvância a 430nm por minuto (coeficiente angular da faixa linear do gráfico de Absorvância vs. tempo); ε , absortividade molar do púrpura de bromocresol, V_1 é o volume de solução estoque(µL) e V_2 é o volume final na cubeta (µL).

4.6 Preparação do biossensor

A construção do biossensor potenciométrico foi realizada utilizando um eletrodo de trabalho contendo filme de poli(4-aminofenol), conforme descrito na figura 31. A superfície do eletrodo foi preparada conforme procedimento descrito no item 4.4.2 deste trabalho. Para a imobilização da enzima, misturou-se 85µL de solução de acetilcolinesterase (705,25U) e 10µL de solução ASB 1,0% m/v. Após homogeneização desta mistura, um volume correspondente à atividade enzimática de interesse foi espalhado uniformemente pela superfície do eletrodo (por exemplo, 31,7µL da solução da mistura corresponde a 10U de atividade enzimática imobilizada). O eletrodo foi colocado para secar à temperatura ambiente. Após seco, o eletrodo com a enzima imobilizada (biossensor) foi colocado numa atmosfera saturada com vapor de glutaraldeído 3%, à temperatura de 37° C, durante 5 minutos (*Ivanov et al., 2000*). Transcorrido este tempo,

retirou-se o biossensor e lavou-o com água deionizada e solução tampão fosfato 1 mmol L^{-1} , pH 7,0. O biossensor foi guardado no freezer, na temperatura de -12°C no estado seco, até o uso.

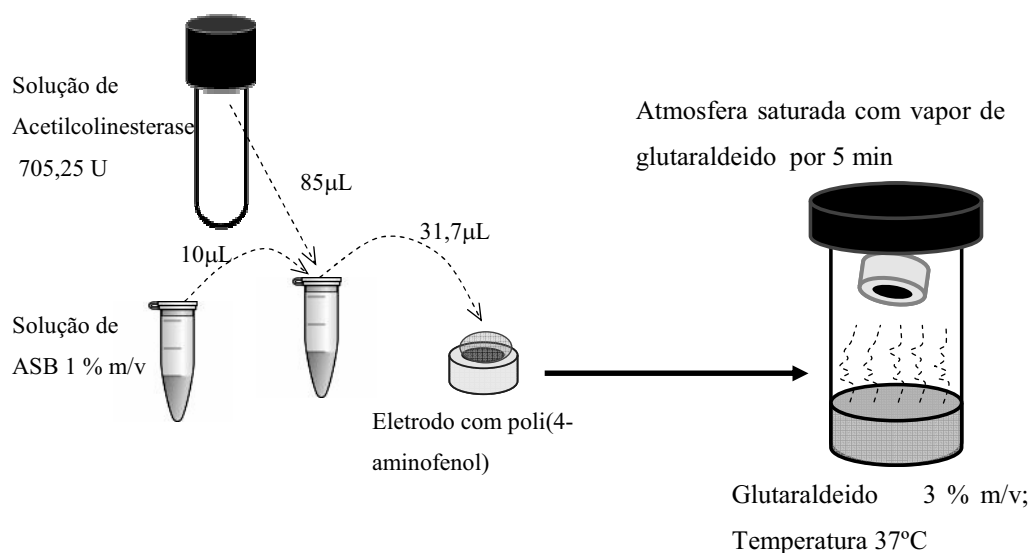


Figura 31 – Procedimento para imobilização da enzima acetilcolinesterase.

4.7 Caracterização dos eletrodos modificados.

Medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) dos eletrodos de grafite com poli(4-aminofenol) e do biossensor potenciométrico (10U) foram realizadas com objetivo de verificar as diferenças eletroquímicas provocadas pela eletropolimerização e pela imobilização da enzima.

Voltamogramas cíclicos dos eletrodos foram obtidos em cela de três compartimentos (Figura 25 E) contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$, variando-se o potencial entre $-0,10\text{V}$ a $+0,50 \text{ V}$ a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Os espectros de impedância foram realizados usando-se célula de três compartimentos (Figura 25 A) contendo 5 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆, 5 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆ e 0,1 mol L⁻¹ KCl como eletrólito suporte. As medidas para cada eletrodo foram feitas variando-se a faixa de frequência entre 100 KHz e 0,01 Hz usando um sinal de excitação senoidal com uma amplitude de excitação de 5 mV. Os espectros de impedância foram ajustados para um circuito elétrico equivalente usando-se um programa instalado em potenciostato Autolab 302N.

As microscopias de força atômica foram realizadas em eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) com e sem enzima imobilizada. A espessura e a rugosidade do filme foram determinadas seguindo procedimento proposto por *LOBO et al., 1999*.

4.8 Resposta do sensor de grafite e grafite modificado com poliaminofenóis

A resposta potenciométrica em relação ao ácido acético foi avaliada usando o sistema de fluxo mostrado na figura 28. Foram avaliadas as respostas dos eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol), poli(3-aminofenol) e poli(4-aminofenol). Para avaliação de cada sensor, foram injetados 150 µL de solução padrão de ácido acético nas concentrações de 0,050 a 100 mmol L⁻¹. Os parâmetros de fluxo foram: solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40), vazão 1,5 mL min⁻¹ e bobina de 35 cm.

4.9 Avaliação da resposta do biossensor potenciométrico

4.9.1 *Em função da concentração de cloreto de acetilcolina*

A resposta do biossensor potenciométrico (30U), na presença de cloreto de acetilcolina, foi monitorada em potencial de circuito aberto *vs.* Ag/AgCl (3 mol L⁻¹) em função do tempo, devido ao ácido acético produzido na reação enzimática (Figura 12), utilizando um potenciostato da CH Instruments modelo 760 C. Foram injetados 150 µL de solução padrão de cloreto de acetilcolina nas concentrações de 0,4 a 100 mmol L⁻¹ preparada em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Todas as medidas foram realizadas em fluxo (Figura 28), utilizando vazão de 1,5 mL min⁻¹ e bobina de 35 cm.

4.9.2 *Em função do pH*

Para avaliação da resposta do biossensor potenciométrico (10U), em função do pH do meio reacional, foram preparadas soluções de cloreto de acetilcolina (5mmol L⁻¹) em pH de 6,00 a 8,00 usando como solvente solução transportadora com valor de pH em estudo. Foram preparadas soluções transportadoras (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹) em pH de 6,00 a 8,00. Para cada avaliação de pH, o mesmo era corrigido de forma que o pH da solução transportadora fosse o mesmo da solução padrão de cloreto de acetilcolina injetada (150 µL). A vazão e a bobina utilizados foram de 1,5 mL min⁻¹ e 35 cm, respectivamente.

4.9.3 Em função da concentração de tampão fosfato

Neste estudo foram utilizadas soluções tampão fosfato nas concentrações de 0,001 to 0,10 mol L⁻¹, preparadas em KCl 0,1 mol L⁻¹ e pH corrigido para 7,40. A variação do potencial da célula foi monitorada em fluxo, após adição de 150 µL de solução de cloreto de acetilcolina (1mmol L⁻¹), vazão da solução transportadora, 1,5 mL min⁻¹ e bobina de 35 cm.

4.9.4 Em função dos parâmetros hidrodinâmicos

Foram otimizadas a vazão e volume de amostra de forma univariada. O efeito do comprimento da bobina não foi avaliado, pois a reação ocorre na superfície do biossensor potenciométrico (10U). Os valores de vazão da solução transportadora avaliados foram: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL min⁻¹, utilizando uma solução padrão de cloreto de acetilcolina 5 mmol L⁻¹ e solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Utilizando-se estas mesmas condições (solução transportadora e de cloreto de acetilcolina) foram avaliados volumes de substrato de 100, 150, 200 e 250µL.

4.9.5 Em função do tempo de armazenamento

O tempo de vida do biossensor foi avaliado para uma atividade enzimática de 10U, durante um período de quarenta dias. Neste período, utilizando o sistema em fluxo descrito na figura 28, foram injetados em triplicata solução de cloreto de acetilcolina 20 mmol L⁻¹, e a resposta do potencial da célula foi observada. Entre uma avaliação e outra, o eletrodo foi armazenado, no estado seco, no freezer até a próxima avaliação.

4.9.6 Em função da concentração de Diclorvós

Essa investigação foi realizada usando o biossensor proposto acoplado ao sistema de fluxo contínuo (Figura 28), com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e solução transportadora (tampão fosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,40). A concentração de substrato foi de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de acetilcolina, preparado em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão fosfato, contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e pH 7,40. A resposta do biossensor foi obtida antes da etapa de inibição, através da injeção de $150 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de substrato. Soluções padrões de diclorvós recém preparadas ($150 \text{ }\mu\text{L}$) nas concentrações de 10 a $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, foram injetadas sem parada de fluxo. Após o restabelecimento da linha base, $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de cloreto de acetilcolina foi injetado em triplicata, e a diferença de potencial devido ao ácido acético gerado na hidrólise enzimática foi medida. A porcentagem de inibição da Enzima AChE foi obtida de acordo com a equação:

$$I(\%) = \frac{\Delta E_1 - \Delta E_2}{\Delta E_1} \cdot 100\%$$

Onde $I(\%)$ é o grau de inibição, ΔE_1 é a diferença de potencial produzida pelo sistema enzimático antes da inibição e ΔE_2 é a diferença de potencial produzida pelo sistema enzimático depois da inibição. A etapa de regeneração do biossensor foi realizada pela injeção de $150 \text{ }\mu\text{L}$ de solução $5,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de 1,1'-trimetileno-bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima (TMB-4).

4.10 Ensaios de recuperação e comparação

A exatidão e precisão do método proposto foram avaliadas para determinação de pesticida diclorvós em amostra de batata (*Solanum tuberosum*, L.). Esta amostra foi cedida pela empresa AGROTESTE-Serviços de Inteligência

Agronômica, situada na BR 365, km 604 - Estação Experimental, Zona Rural - Uberlândia/MG. A batata foi cultivada no mês de setembro de 2008 e segundo a empresa não foi aplicado nenhum agrotóxico para controle de pragas.

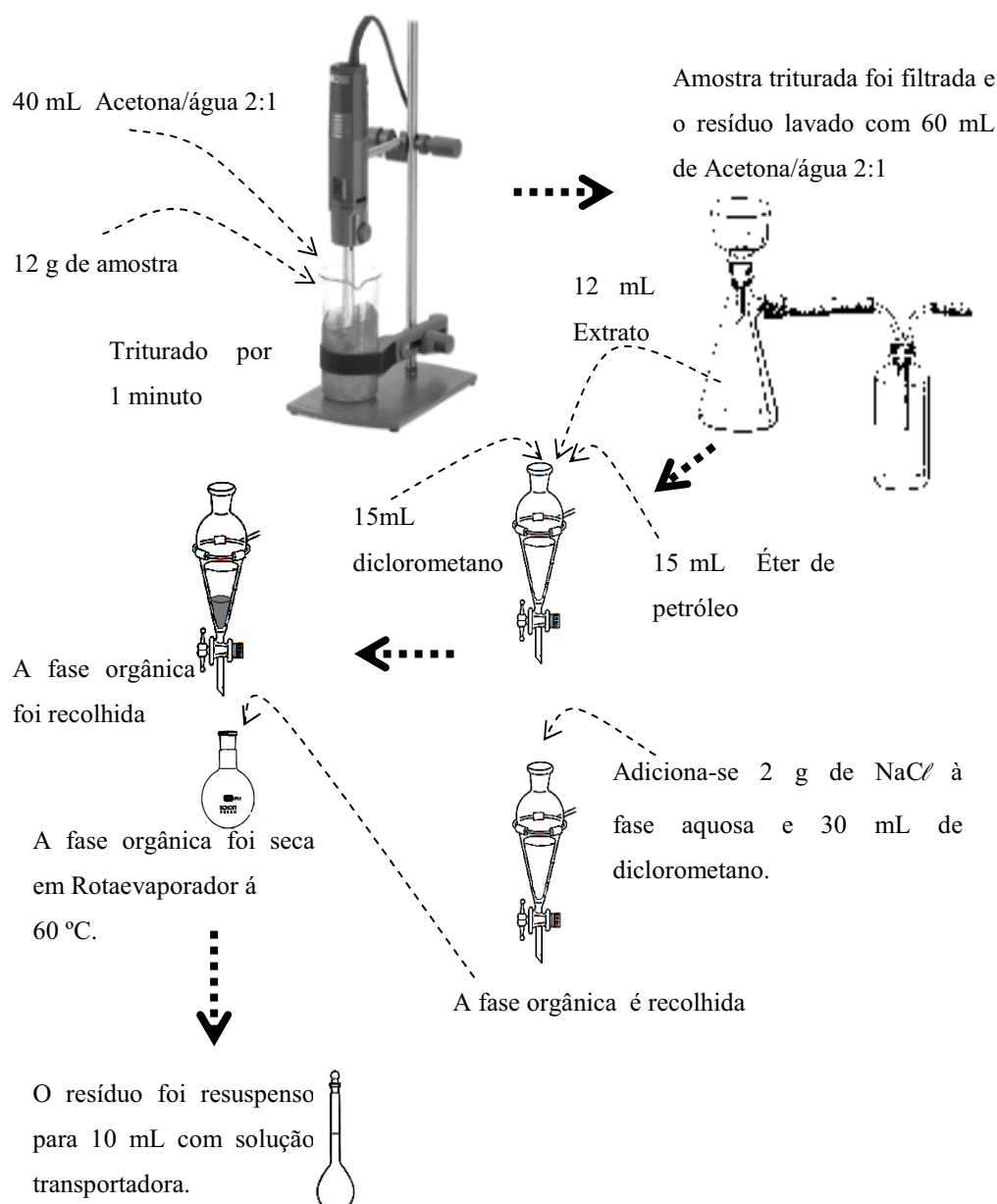


Figura 32 – Procedimento de extração líquido-líquido utilizado

A amostra foi lavada com água para retirada do excesso de solo, triturada em ultra-turrax com uma mistura de acetona água 2:1, durante 1 min e em seguida filtrada. O filtrado foi homogeneizado com 2,65 μL , 4,42 μL e 7,07 μL de solução estoque de diclorvós ($0,113 \text{ mol L}^{-1}$) de forma a resultar no nível de

fortificação de 30, 50 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações foram avaliadas usando procedimento de extração líquido-líquido descrito por *YOKOMIZO et al.* (1985) e ilustrado na figura 32. A concentração de diclorvos foi avaliada usando a metodologia proposta (Biossensor potenciométrico grafite/poli(4-AMP)/AChE), cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) e cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa (CG-MS). Para os ensaios cromatográficos, o resíduo após a etapa de evaporação do solvente foi resuspenso em hexano e 2 μL foram injetados em cromatógrafo a gás 17-A com detector de espectrometria de massa, sistema quadrupolo, QP5000. O material recuperado da fortificação também foi analisado em cromatógrafo a gás (CG-17-A) da Shimadzu, equipado com detector de captura de elétrons. As condições de detecção e cromatográficas estabelecidas foram:

Cromatografia a gás com detector de espectrometria de massa

- Coluna HP-INOWAX, dimensões: 60m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de fase estacionária.
- Rampa: temperatura inicial de 60 °C; 60°C a 150°C por 25°C/min; 1 min a 150 °C; 150 °C a 200 °C por 3°C/min; 200°C a 220°C por 8°C/min; 15min a 220°C.
- Temperatura do injetor: 220 °C.
- Modo de injeção: splitless.
- Pressão: 100 (kPa).
- Fluxo de gás de arraste: 1,0 mL/min (Hélio).
- Voltagem do Detector: 1,5V.
- Intervalo de massa/carga: 40 a 450 (m/z).
- Modo de monitoramento de íon: SIM.
- Corte do solvente: 7 min.

Cromatografia a gás com detector de captura de elétrons

- Coluna HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% de difenil e 95% de dimetilsiloxano, 30 m de comprimento; 0,25 mm de d.i. e 0,1 μm de espessura de filme
- Rampa: temperatura inicial de 214 °C; 214°C a 229°C por 0,5 °C/min.
- Temperatura do injetor: 270 °C.
- Temperatura do detector: 300°C.
- Modo de injeção: split 1:5
- Volume de injeção: 1 μL
- Fluxo de gás de arraste: 3,0 mL/min (Nitrogênio).

5 Resultados e Discussões

5.1 Formação de filmes poliméricos

Os eletrodos de grafite polidos foram avaliados frente ao par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ utilizando-se voltametria cíclica. Os eletrodos adequados para eletropolimerização e posterior imobilização da enzima seguiram o perfil observado na figura 33. A carga elétrica (Coulombs) foi calculada integrando-se o voltamograma (onda de oxidação e onda de redução) [corrente (A) vs. potencial (V)/velocidade de varredura ($V s^{-1}$)]. O valor de carga obtido para este voltamograma foi $1,885 \times 10^{-3} C$ e todos os eletrodos de grafite utilizados foram selecionados seguindo este valor, como critério de seleção, considerando um coeficiente da variação de 5%.

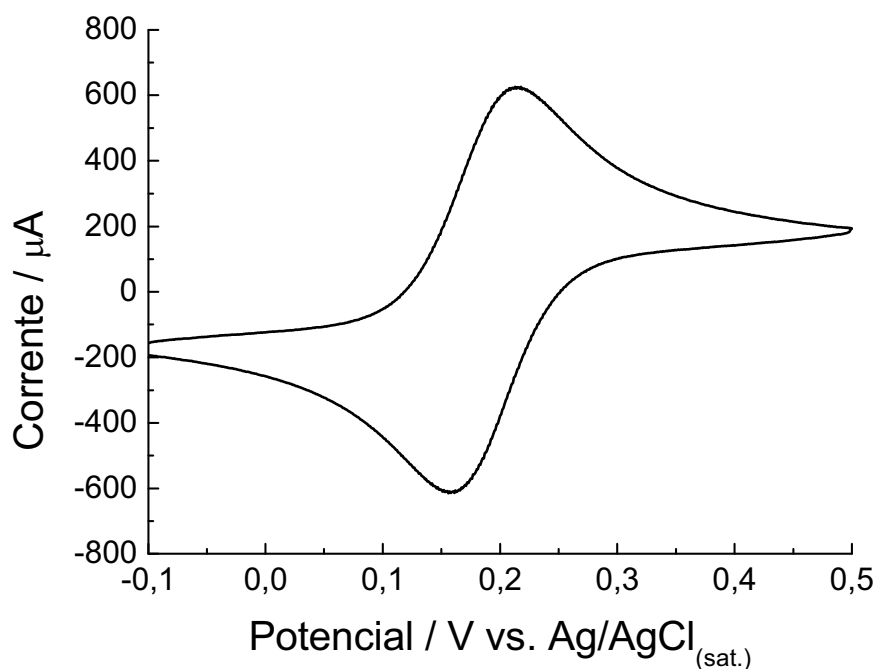


Figura 33 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo $5 mmol L^{-1}$ de $K_3Fe(CN)_6$, $5 mmol L^{-1}$ de $K_4Fe(CN)_6$ e $0,1 mol L^{-1} KNO_3$, $100 mV s^{-1}$.

A formação dos filmes de poliaminofenóis foi realizada em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} , variando-se o potencial limite entre $-0,20$ a $+0,67 \text{ V}$, $0,20$ a $1,10 \text{ V}$ e 0 a $0,64 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl para os monômeros de 2-aminofenol (Figura 34), 3-aminofenol (Figura 35) e 4-aminofenol (Figura 36), respectivamente.

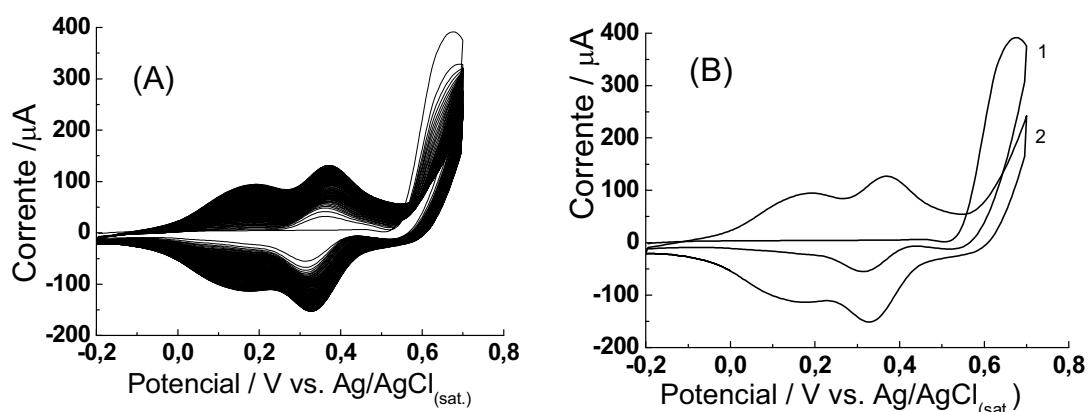


Figura 34 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 2-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico (B).

Na figura 34 B1, referente a formação do filme de poli(2-aminofenol), observa-se a formação de um pico de oxidação em torno de $+0,572 \text{ V}$ e dois de redução à $+0,262 \text{ V}$ e $+0,128 \text{ V}$. A partir de uma segunda varredura, surgiram dois picos de oxidação à $+0,134 \text{ V}$ e $+0,277 \text{ V}$ (Figura 34 B2). Estes picos são complementares aos de redução sendo considerados pares redox reversíveis. O pico no potencial mais anódico, que se refere à formação do cátion-radical, apresenta uma ligeira queda em relação à corrente e não apresenta uma onda redox complementar, sendo assim, irreversível (FRANCO, 2007). Após 100 varreduras, os dois pares redox mostram um crescimento expressivo nos valores de corrente.

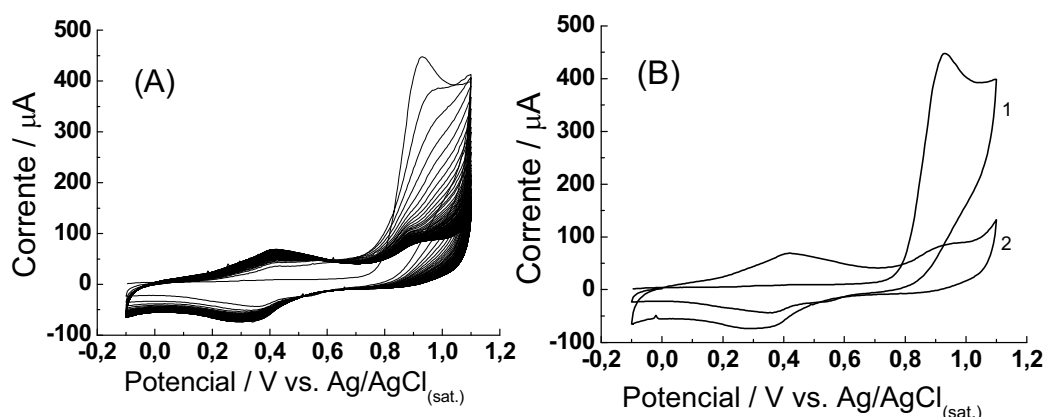


Figura 35 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 3-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico(B).

Para o 3-aminofenol, o potencial da primeiro pico de oxidação é mais anódico (+0,892 V). Um pico de redução acompanha o voltamograma com um valor de corrente muito pequeno e uma faixa de potencial ampla, por volta de +0,314 V (Figura 35 B1). O segundo voltamograma (Figura 35 B2) mostra um pico de oxidação complementar ao de redução em cerca de +0,375 V. O pico mais anódico, referente à formação do cátion-radical sofre um acentuado decréscimo no valor de corrente. O par redox não mostra alterações significantes de corrente a partir desse ponto. Essas características eletroquímicas sugerem a formação de um polímero não-condutor na superfície do eletrodo, auto-limitado, fino e com impedimento do aumento dos valores de corrente do par redox. Para o 3-aminofenol, a variação de número de varreduras faz com que o valor de corrente do pico de oxidação do monômero decresça enquanto o par redox mostra aumento de corrente pouco significativo. Isso mostra que o eletrodo está recoberto com um filme polimérico não-condutor (FRANCO, 2007).

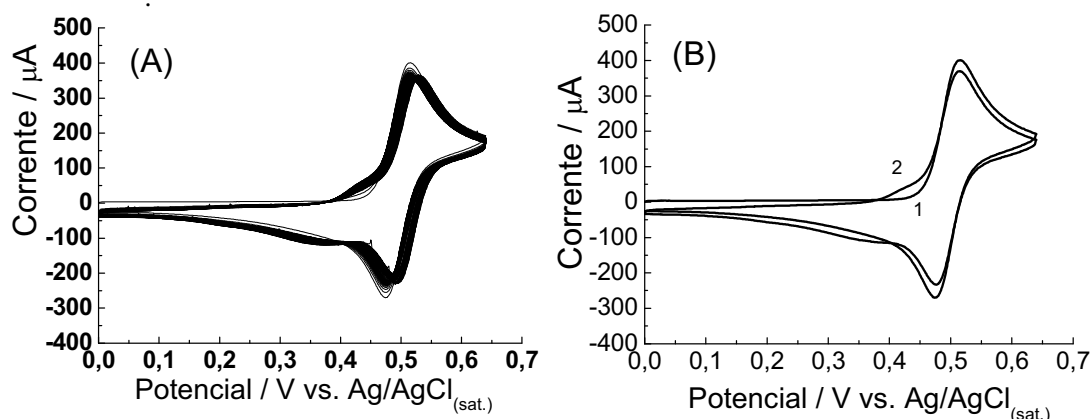


Figura 36 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de eletrodo de grafite em solução contendo 4-aminofenol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 100 varreduras, 50 mV s^{-1} (A); primeiro-1 e centésimo-2 voltamograma cíclico (B).

Na primeira varredura dos voltamogramas de formação do filme de poli(4-aminofenol) (Figura 36 B1) pode-se observar um processo redox reversível em potenciais $E_a = +0,543 \text{ V}$ e $E_c = +0,514 \text{ V}$, o que sugere que o processo não é seguido de uma reação química rápida. Nas próximas varreduras de potencial (Figura 36 B2) é observado crescimento de um pico em potenciais mais baixos $E_a = +0,450 \text{ V}$ e $E_c = +0,420 \text{ V}$, sugerindo formação de material eletroativo na superfície do eletrodo (AFONSO, 2008).

O crescimento da onda em $+0,45 \text{ V}$ é resultado do aumento da extensão de conjugação no polímero, resultando em menor potencial de oxidação, se comparado com o monômero. Pode-se sugerir, no primeiro pico de oxidação (Figura 36 B1), a adsorção de 4-aminofenol seguido da primeira transferência eletrônica e perda do primeiro próton. A seguir, o radical adsorvido é submetido à segunda perda eletrônica e de mais um próton, formando 4-quinoneimina (MENEZES & MAIA, 2006). Posteriormente, a quinoneimina é hidrolisada a 4-benzoquinona (HAWLWY & ADAM, 1965; MENEZES & MAIA, 2006) que reage com 4-aminofenol, resultando

em produto pouco solúvel que precipita na superfície do eletrodo (Figura 20). A partir de reações sucessivas forma-se o filme polimérico. As ondas de oxi-redução de 4-aminofenol apresentam um pequeno decréscimo, sugerindo dificuldade de adsorção do monômero 4-aminofenol à superfície do eletrodo já modificado (AFONSO, 2008).

5.2 Resposta do sensor de grafite e grafite modificado com poliaminofenóis

Com a finalidade de verificar se os eletrodos de grafite e grafite modificados com filmes de poliaminofenóis, podem ser utilizados como transdutores na construção de biossensor potenciométrico a base de AChE, investigou-se o comportamento dos respectivos eletrodos, em fluxo, quando em contato com soluções aquosas de ácido acético. Para tanto foram injetados 150 μL de solução padrão de ácido acético 50 mmol L^{-1} . Os parâmetros de fluxo foram: solução transportadora contendo tampão fosfato 1,0 mmol L^{-1} ; KCl 0,1 mol L^{-1} ; pH 7,40, vazão de 1,5 mL min^{-1} e bobina de 35 cm.

O aparecimento de um potencial desenvolvido na célula eletroquímica na ausência de corrente apreciável, devido à diferença de potencial estabelecida entre o eletrodo de trabalho (transdutor) e o eletrodo de referência Ag/AgCl, é o sinal elétrico ou a resposta analítica traduzida pelo eletrodo de trabalho (transdutor) provocada pela presença do ácido acético na interface da superfície do eletrodo. Esta resposta analítica foi observada em todos os transdutores estudados para uma concentração de ácido acético de 5 mmol L^{-1} (Figura 37). Nesta concentração de ácido acético, os eletrodos de grafite e grafite modificado com poli(4-aminofenol) apresentaram resposta analítica (88,4 mV e 50,1 mV) e velocidades de resposta maiores que os eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) e poli(3-aminofenol) (Tabela 9). O eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol)

apresentou desvio padrão relativo (1,1% ; $n = 3$) menor que os outros eletrodos estudados. O tempo de restabelecimento da linha base, foi praticamente o mesmo para os eletrodos, exceto para o eletrodo modificado com poli(2-aminofenol) que possivelmente apresentou uma facilidade maior de desprotonação da superfície, portanto menor tempo de restabelecimento da linha base.

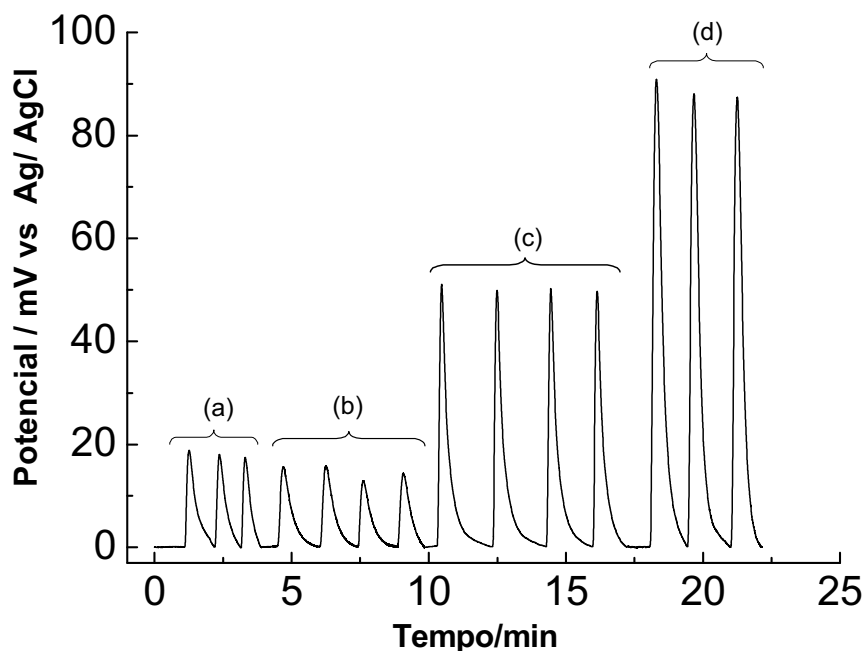


Figura 37 – Resposta potenciométrica de eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (a), poli(3-aminofenol) (b), poli(4-aminofenol) (c) e eletrodo de grafite (d) em relação à solução de ácido acético 5 mmol L^{-1} .

O comportamento da resposta analítica em função da concentração de ácido acético foi avaliado injetando $150 \mu\text{L}$ de soluções padrões de ácido acético, em triplicata, nas concentrações de $0,050$ a 100 mmol L^{-1} nas condições experimentais: solução transportadora (tampão fosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,40), vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e bobina de 35 cm . Os resultados são apresentados na tabela 9.

Os eletrodos de grafite e grafite modificado com poli(4-aminofenol) apresentaram melhores resultados para o limite de detecção, limite de

quantificação e faixa linear de resposta. A resposta potenciométrica em função da concentração para estes dois eletrodos mostra uma sensibilidade maior a íons H_3O^+ , em relação às superfícies modificadas com poli(2-aminofenol) e poli(3-aminofenol).

Tabela 9 – Figuras de mérito para o sensor de grafite e sensores de grafite modificados com filmes de poliaminofenóis em função da concentração de ácido acético.

Figuras de Mérito	Grafite	Eletrodo de grafite modificado		
		Poli(2-AMP)	Poli(3-AMP)	Poli(4-AMP)
LR/ mmol L ⁻¹	5,0 -100	5,0 -100	3,0 - 100	1,0 - 100
LD / μmol L ⁻¹	68	1600	840	140
LQ/ mmol L ⁻¹	0,2	5,3	2,8	0,5
*ΔE /mV	88,4 ± 3,3	18,1 ± 1,2	14,1 ± 1,5	50,1 ± 0,7
*RSD/ %	2,2	3,9	8,6	1,1
*TRL / s	81,7± 22,2	56,2 ± 17,8	80,9± 15,7	104,3± 24,5
Linearidade	$\Delta E = 197,5 + 57,2t$ $r^2 = 0,99314$	$\Delta E = 115,9 + 44,1t$ $r^2 = 0,99698$	$\Delta E = 139,0 + 55,2t$ $r^2 = 0,99733$	$\Delta E = 184,9 + 58,8t$ $r^2 = 0,99784$
*VR/mV s ⁻¹	6,6 ± 1,2	2,0 ± 0,8	1,2 ± 0,2	5,6 ± 0,4

LR- faixa linear de resposta; LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação; RSD- coeficiente de variação; TRL- Tempo de restabelecimento da linha base; VR- Velocidade de resposta; t = log [Ácido Acético]; ΔE- diferença de potencial.

*Concentração de ácido acético 5 mmol L⁻¹.

5.3 Cálculo da atividade enzimática em solução

A atividade enzimática pode ser expressa em unidade de atividade cujo símbolo é U, a qual é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa o consumo do substrato ou a formação do produto em μmol min⁻¹ (1U corresponde à formação/consumo de 1μmol min⁻¹ do substrato ou do produto da reação enzimática). O método padrão para determinar a atividade enzimática da acetilcolinesterase foi descrito por *ELLMAN, et al.* (1961). Neste método, o substrato acetiltiocolina é hidrolisado a tiocolina pela enzima acetilcolinesterase,

que em seguida, reage com 5,5 ditio-bis-2-acidonitrobenzóico-DTNB resultando no produto 5-tio-2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina que absorve em 412 nm. Dessa forma, o método monitora a formação do produto da reação enzimática por minuto, monitorando a absorvância do complexo amarelo formado em função do tempo. De forma análoga, foi proposto um método para determinação da atividade enzimática na solução estoque de acetilcolinesterase usando o púrpura de bromocresol no meio reacional, monitorando a absorvância do mesmo em 430nm em função do tempo de reação enzimática (Figura 41).

Um indicador é um par conjugado de ácido e base de Bronsted-Lowry cujo ácido apresenta uma coloração e a base outra, ou seja, apresentam bandas de absorção em comprimentos de onda diferentes na região UV – Visível. Algumas vezes uma das duas espécies é incolor, não absorve nesta região do espectro eletromagnético (HARRIS, 2001; SKOOG *et al.*, 1992; ATKINS, 1999). A interconversão entre as duas espécies pode ser representada pelo equilíbrio mostrado na figura 38.

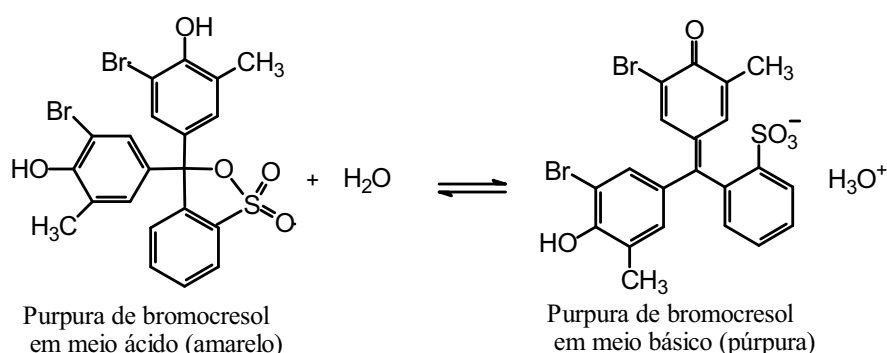


Figura 38 – Equilíbrio ácido-base para indicador púrpura de bromocresol.

O espectro de absorção para o púrpura de bromocresol (Figura 39) obtido em pH 8,70 apresenta uma banda em 590 nm, atribuída a transições π - π^* da espécie aniônica (cor púrpura). À medida que o pH vai diminuindo essa banda

desaparece e surge uma banda em 430 nm associada à formação da espécie neutra (cor amarela).

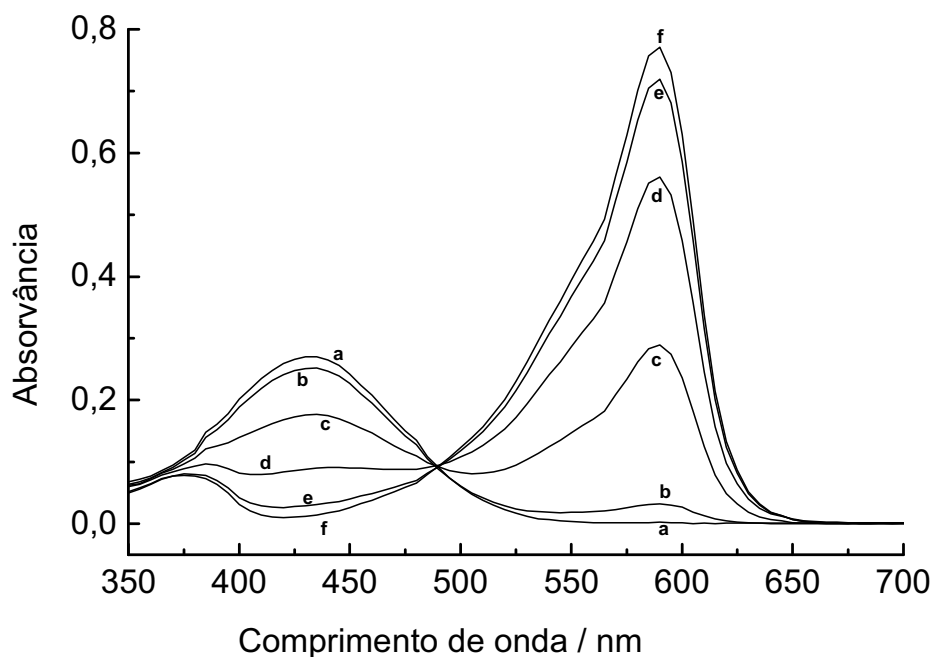


Figura 39 – Espectro de absorção do Púrpura de Bromocresol em diferentes valores de pH. [Indicador]=0,1 mmol L⁻¹; (a) pH= 3,20; (b) pH = 4,70; (c) pH = 5,97; (d) pH = 6,66; (e) pH = 7,40; (f) pH = 8,70.

Este comportamento da banda em 430 nm do púrpura de bromocresol foi usado para monitorar a quantidade de ácido acético gerado pela enzima acetilcolinesterase em solução, pois conforme pode ser observado na figura 40, a banda de absorção a 430 nm apresenta um comportamento linear para uma variação de pH entre 4,50 a 7,50. Assim a presença deste indicador no meio reacional para um valor de pH ajustado em 7,50 apresenta sensibilidade para monitorar o ácido acético gerado pela reação enzimática em função do tempo. O ácido acético formado na hidrólise do substrato provoca o deslocamento do equilíbrio descrito na figura 38 no sentido de aumentar a concentração do indicador na forma neutra o que aumenta o valor da absorção em 430 nm (Figura 39).

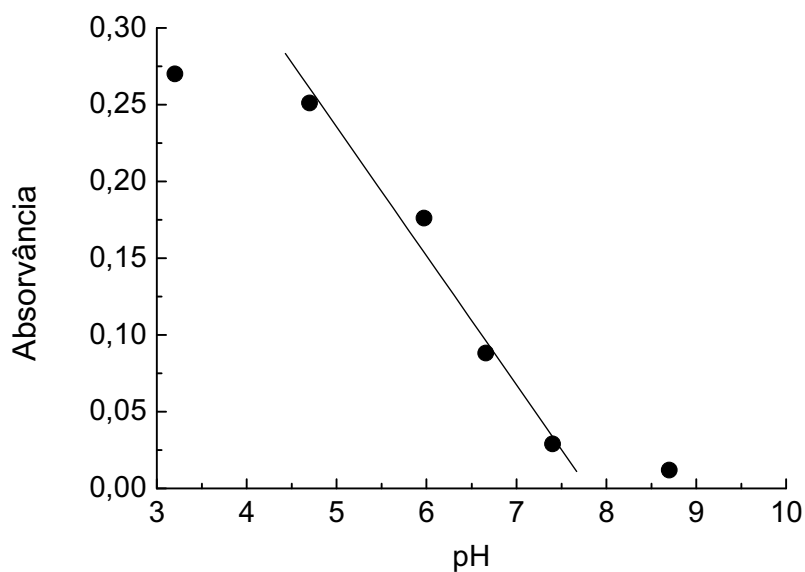


Figura 40 – Intensidade de absorção do indicador púrpura de bromocresol a 430 nm em função do pH

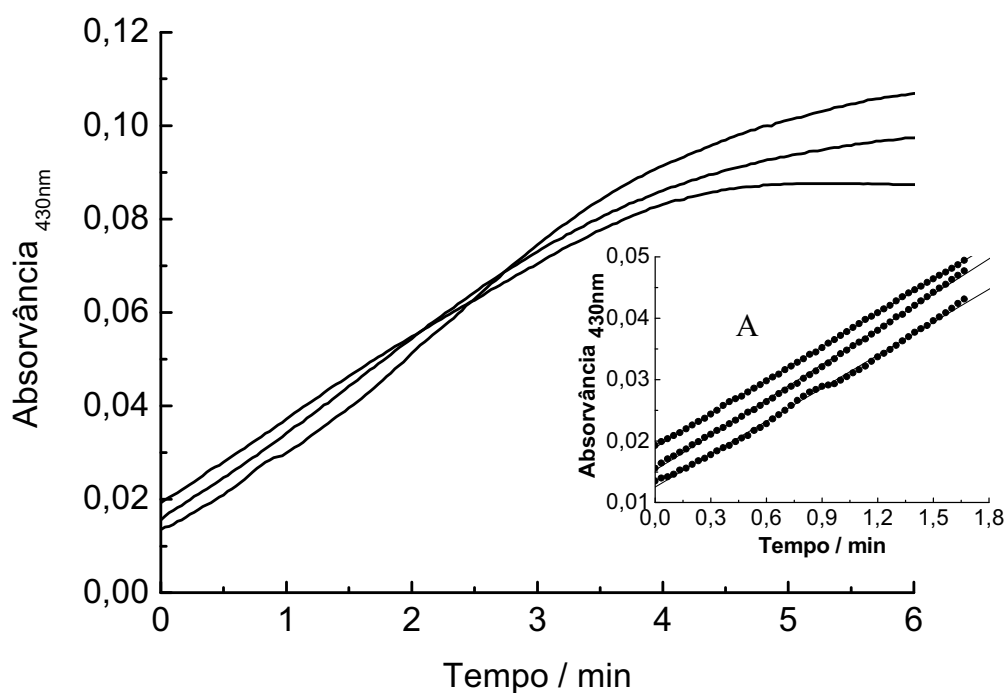


Figura 41 – Absorvância do púrpura de bromocresol a 430 nm em função do tempo de reação enzimática; Inserção A: região linear da curvas. Condições: pH inicial 7,90; tampão fosfato 1mmol L^{-1} ; púrpura de bromocresol 1mmol L^{-1} ; cloreto de acetilcolina 1mmol L^{-1} ; AChE (1U).

O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade enzimática para AChE presente na solução estoque foi de $625,2U \pm 37,5$, determinada de acordo com a equação:

$$U(\mu mol_{\text{ácido acético}} / \text{min}) = \frac{\Delta Abs \cdot V_2}{\epsilon \cdot V_1} \cdot 2000$$

Onde ΔAbs corresponde a variação da absorvância a 430 nm por minuto (coeficiente angular da faixa linear mostrado na figura 41 A); ϵ , absortividade molar do púrpura de bromocresol, V_1 é o volume de solução estoque (μL) e V_2 é o volume final na cubeta (μL). O valor obtido foi menor que o relatado pelo fabricante (705,25U), o que pode ser atribuído ao tempo de estocagem da solução estoque, que no momento da avaliação da atividade enzimática era de 8 meses.

5.4 Biossensor potenciométrico

A resposta do biossensor é definida como a variação de potencial causada pela formação de ácido acético na hidrólise do substrato cloreto de acetilcolina, catalisada pela enzima AChE imobilizada na superfície do biossensor. Os parâmetros que influenciam a resposta do biossensor estão relacionados com a atividade catalítica da enzima e sensibilidade do transdutor em detectar o ácido acético gerado na reação enzimática (Figura 37).

Com a finalidade de verificar a resposta do biossensor em relação ao transdutor, a enzima acetilcolinesterase foi imobilizada conforme procedimento mostrado na figura 31, sobre a superfície do eletrodo de grafite e do eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol). Estas duas superfícies foram usadas na construção do biossensor por apresentarem melhor resposta em relação ao ácido acético na interface eletrodo-solução. Os biossensores foram acoplados na célula eletroquímica (Figura 30) e esta foi usada como detector no sistema em

fluxo descrito na figura 28. As condições experimentais foram: solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40), vazão 1,5 mL min⁻¹, bobina de 35 cm e atividade enzimática imobilizada de 30U. Foram injetados 150 µL de solução padrão de cloreto de acetilcolina nas concentrações de 0,5 a 100 mmol L⁻¹ preparadas em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40).

Os biossensores apresentaram um comportamento de resposta em relação à concentração do substrato, característico de uma reação enzimática, mostrado nas figuras 42 e 43. A resposta do biossensor é proporcional à concentração do substrato, para um valor de concentração até 10 mmol L⁻¹, caracterizando que a reação é de primeira ordem com relação ao substrato. Valores de concentração de 10 mmol L⁻¹ a 30 mmol L⁻¹, a velocidade inicial da reação se reduz, e a resposta do biossensor não é mais proporcional à concentração do substrato, caracterizando que a reação é de ordem mista. A partir de 30 mmol L⁻¹ de cloreto de acetilcolina, a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato e a resposta dos biossensores tende a um valor de potencial constante, caracterizando uma reação de ordem zero com relação ao substrato, e a enzima é considerada “saturada” com seu substrato.

A velocidade de resposta, tempo de restabelecimento da linha base, e a resposta dos biossensores, grafite/AChE e grafite/poli(4-aminofenol)/AChE foram comparados para uma concentração de 5mmol L⁻¹ do substrato (Tabela 10). A variação de potencial (17,4 mV) observada para o biossensor (grafite/AChE), nesta concentração de substrato foi maior que a resposta (12,4 mV) dada pelo biossensor (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE), o que corrobora com os resultados de resposta dada pelos respectivos transdutores, onde o grafite apresentava uma

maior resposta para o ácido acético na interface eletrodo-solução. As velocidades de resposta dos biossensores foram de $1,0 \text{ mV.s}^{-1}$, diferenciando do comportamento dos transdutores, onde a velocidade de resposta do eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) era maior. Esta menor velocidade observada pode ser dada pela diminuição de grupos livres e sensíveis a íons H_3O^+ presentes na superfície, ocorrida com o processo de imobilização da enzima. O tempo de restabelecimento da linha base, para o biossensor (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) foi praticamente 50 % menor, o que é interessante pois a frequência de amostragem do método depende deste restabelecimento da linha base.

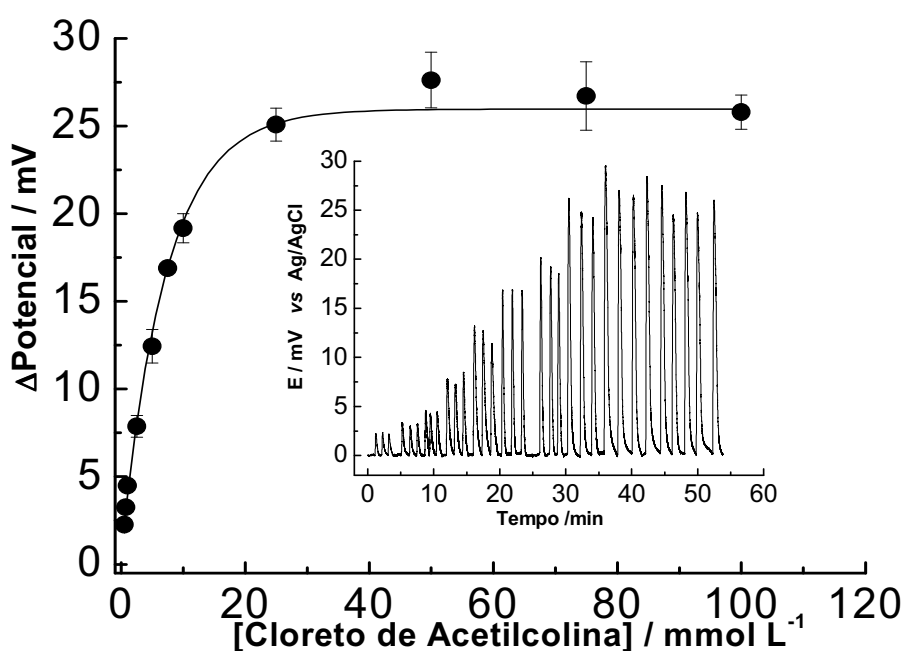


Figura 42 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função da concentração do substrato. Condições experimentais: Solução de cloreto de acetilcolina 0,5 a 100 mmol L⁻¹, preparadas em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Atividade enzimática teórica imobilizada: 30U.

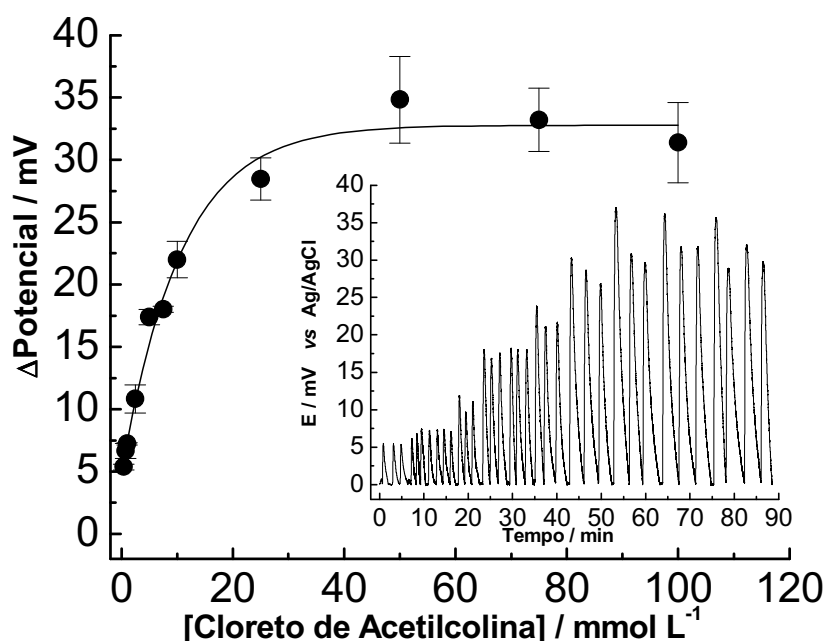


Figura 43 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/AChE) em função da concentração do substrato. Condições experimentais: Solução de cloreto de acetilcolina 0,5 a 100 mmol L⁻¹, preparadas em solução transportadora (tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,40). Atividade enzimática teórica imobilizada: 30U.

Tabela 10 – Figuras de mérito para o biossensor de grafite/AChE e biossensor Grafite/poli(4-aminofenol)/AChE em função da concentração de cloreto de acetilcolina.

Figuras de Mérito	Biossensor	
	Grafite	Poli(4-AMP)
LR/ mmol L ⁻¹	0,5 -10	0,5 – 10
LD / μmol L ⁻¹	160	140
LQ/ mmol L ⁻¹	0,5	0,4
*ΔE /mV	17,4 ± 1,0	12,4 ± 1,6
*TRL / s	122,1 ± 12,3	67,0 ± 8,1
Linearidade	$\Delta E = 5,42 + 1,73[CAC]$ $r^2=0,99056$	$\Delta E = 1,74 + 2,01 [CAC]$ $r^2=0,99533$
*VR/mV s ⁻¹	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2

LR- faixa linear de resposta; LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação; TRL- Tempo de restabelecimento da linha base; VR- Velocidade de resposta; CAC = Cloreto de acetilcolina; ΔE- diferença de potencial. *Concentração de cloreto de acetilcolina de 5 mmol L⁻¹.

Os biossensores apresentaram uma faixa linear de resposta para concentrações de cloreto de acetilcolina de 0,5 a 10 mmol L⁻¹. Nesta faixa de concentração, observa-se uma maior sensibilidade, em relação ao substrato, para o biossensor (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE), além de limite de detecção e quantificação de 140 µmol L⁻¹ e 400 µmol L⁻¹, calculados segundo a IUPAC, a partir do desvio padrão da linha base.

Os parâmetros cinéticos K_M^{app} e V_{max} foram obtidos a partir do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 44), construídos com os resultados da resposta dos biossensores em função da concentração do substrato (Figuras 42 e 43).

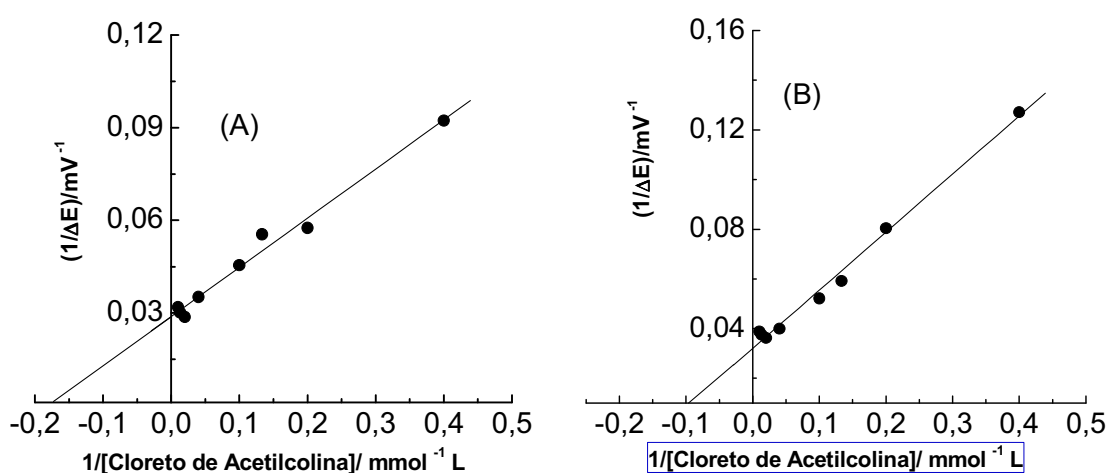


Figura 44 – Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk; (A) biossensor potenciométrico (grafite/AChE); (B) biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE).

Nos gráficos de duplo-recíproco, o ponto onde a linha intercepta a ordenada é igual a $1/V_{max}$, e o ponto de intersecção na abscissa é igual a $-1/K_m$, o que foi utilizado para calcular os valores de K_m^{app} e V_{max} para enzima imobilizada nos biossensores. A enzima imobilizada apenas na superfície de grafite apresentou K_m^{app} igual a 5,76 mmol L⁻¹ e V_{max} de 34,7 µmol substrato/min, enquanto a

enzima imobilizada na superfície de grafite com poli(4-aminofenol) apresentou K_m^{app} de $10,32 \text{ mmol L}^{-1}$ e V_{max} de $31,2 \text{ } \mu\text{mol substrato/min}$. Os valores de K_m^{app} e V_{max} podem ser usados para verificar a especificidade do substrato-enzima, pois quanto maior o valor K_m^{app} menor é a interação do substrato com a enzima. Nota-se que a enzima imobilizada possui um valor da constante de Michaelis-Menten maior nos dois biossensores que a enzima em solução, que segundo *SHULGA & KIRCHHOFF (2007)* é de $0,051 \text{ mmol L}^{-1}$, indicando que a interação substrato-enzima é menor, pois a enzima encontra-se ligada ao suporte de grafite ou grafite/poli(4-aminofenol) e ao glutaraldeído usado na imobilização, o que diminui sua atividade e, portanto um valor de K_m maior. O valor da V_{max} corresponde à velocidade atingida sob condições de saturação da enzima em condições específicas, sendo assim, pode ser usada para estimar atividade enzimática no biossensor dada em μmol do substrato consumido por minuto (Unidade de atividade). Nota-se que os valores de $V_{m\acute{a}x}$ que correspondem a $34,7 \text{ U}$ para biossensor (grafite/AChE) e $31,2 \text{ U}$ para biossensor (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) são próximos da atividade teórica imobilizada, que é de 30 U . O valor da atividade enzimática no biossensor grafite/poli(4-aminofenol)/AChE é menor, provavelmente devido a ligações existentes entre o poli(4-aminofenol) e a enzima, resultado que corrobora com o valor maior de K_m para este biossensor.

5.4.1 Otimização da resposta do biossensor

A resposta do biossensor (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) é definida como a variação de potencial causada pela formação de ácido acético na hidrólise do substrato cloreto de acetilcolina, catalisada pela enzima AChE imobilizada na superfície do biossensor. A atividade enzimática é um dos parâmetros que podem

afetar a resposta do biossensor. De um 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 denominada de centro ativo (ou sítio ativo) da enzima. O sítio ativo é formado por resíduos de aminoácidos, trazidos próximos uns dos outros pelo dobramento da cadeia polipeptídica, definida pela estrutura terciária da enzima (*LEHNINGER, 1995; CONN, 1980*). O centro ativo, assim organizado, adquire uma conformação espacial que permite a enzima reconhecer seu substrato (Figura 6 e Figura 7). Assim a seletividade da enzima para um determinado substrato é definida por sua estrutura primária (seqüência de aminoácidos) e pela conformação espacial do centro ativo envolvido, que é governada pela estrutura tridimensional da enzima. A estrutura tridimensional da enzima depende de condições do meio reacional, pois agentes químicos ou físicos como pH e temperatura, podem provocar mudanças conformacionais na proteína e afetar sua atividade enzimática, e conseqüentemente, a resposta do biossensor.

Considerando tal fato, foi avaliado a resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em relação a diferentes condições experimentais, buscando otimizar sua resposta frente ao ácido acético gerado na hidrólise do cloreto de acetilcolina. As seguintes condições experimentais foram investigadas: pH e concentração de tampão fosfato na solução transportadora, além dos parâmetros hidrodinâmicos, vazão e volume de injeção.

Para avaliação da resposta do biossensor potenciométrico (10U), em função do pH do meio reacional, foram preparadas soluções de cloreto de acetilcolina (5 mmol L^{-1}) em pH de 6,00 a 8,00 usando como solvente solução

transportadora com valor de pH em estudo. Os resultados são apresentados na figura 45.

A influencia do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando-se que as enzimas são moléculas com características anfóteras que contêm um elevado número de grupos ácidos e básicos. As cargas destes grupos variam, de acordo com as suas constantes de acidez e, conseqüentemente, com o pH do meio. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo da enzima ou serem importantes para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima. Assim, as mudanças de pH podem afetar a estrutura conformacional e, conseqüentemente, influenciar na atividade enzimática.

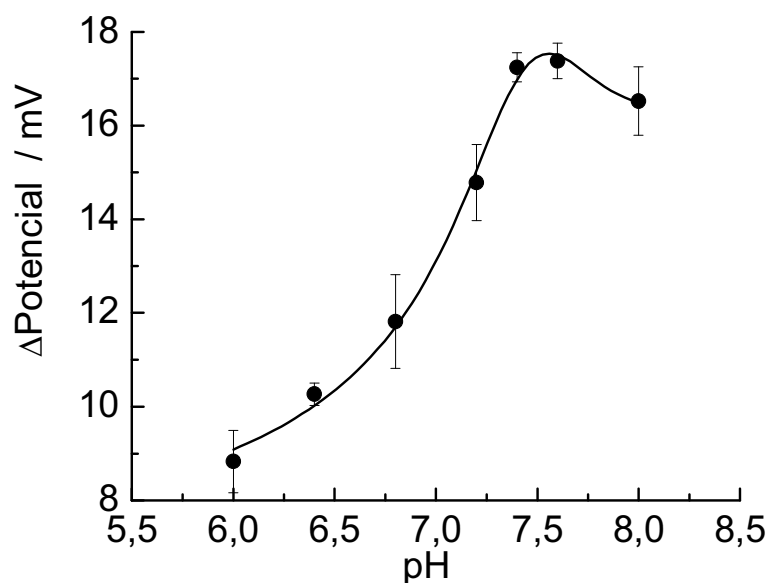


Figura 45 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função do pH do meio reacional. Condições experimentais: 150 μL de cloreto de acetilcolina 5,0 mmol L^{-1} preparado em solução transportadora contendo 0,10 mol L^{-1} KCl e tampão fosfato 1 mmol L^{-1} no pH em estudo; vazão: 1,5 mL min^{-1} .

Cada enzima possui um pH característico no qual a carga total na molécula é zero. Este é o chamado ponto isoelétrico (PI) no qual a solubilidade da enzima em solução aquosa é mínima (LEHNINGER, 1995; CONN, 1980). De um modo

semelhante, o pH da solução também vai afetar o substrato, os produtos e os co-substratos (quando presentes). O aumento da concentração de H_3O^+ vai, adicionalmente, aumentar a competição dos íons hidrogênio pelas ligações de qualquer metal presente na enzima reduzindo a concentração de metal ligado. Diminuir a concentração de H^+ pode, por sua vez, aumentar a concentração de íon hidróxido que compete com os ligantes da enzima pelos cátions di e trivalentes formando hidróxidos e, em valores de pH elevados acaba por causar a sua remoção da enzima, afetando a atividade enzimática. Por outro lado, quando o substrato possui grupos protonáveis, as variações de pH também podem afetar a distribuição de carga do substrato. Assim, uma melhor resposta do biossensor potenciométrico dependerá, então, de como se encontram a enzima e o substrato, para permitir uma interação eficiente entre ambos.

Observa-se que a melhor resposta dada pelo biossensor, nas condições estudadas, foi para um valor de pH 7,40 (Figura 45). Nesta condição, a interação entre a enzima e o substrato é máxima, no entanto para valores de pH menores e maiores que 7,40 observa-se uma redução da resposta potenciométrica, provavelmente causada pela protonação ou desprotonação de grupos presentes na estrutura da enzima ou do sítio ativo, diminuindo sua atividade catalítica.

Outro parâmetro investigado foi o efeito da concentração do tampão fosfato na solução transportadora, mantida em pH 7,40 na resposta do biossensor potenciométrico e os resultados estão apresentados na figura 46. A resposta analítica ($\Delta E/\text{mV}$ vs Ag/AgCl) para concentrações acima de 10 mmol L^{-1} decresce acentuadamente, indicando que a resposta do biossensor foi afetada. Para concentrações entre 20 a 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato, os valores de ΔE se mantiveram constantes e próximos de 0,0 mV. Este comportamento 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^+ originado pela ionização do ácido acético, resultante da hidrólise enzimática do cloreto de acetilcolina. Os íons gerados podem ser consumidos pelo sistema tampão e como consequência, a variação da resposta será menor.

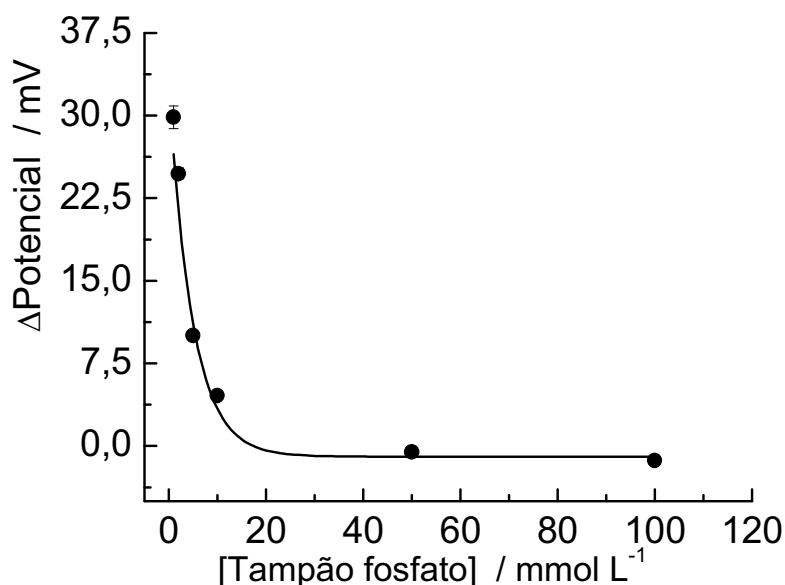


Figura 46 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/ poli(4-aminofenol)/AChE) em função da concentração do tampão fosfato (1,0 a 100 mmol L⁻¹) na solução transportadora pH 7,40. Condições experimentais: 150 μL de cloreto de acetilcolina 1,0 mmol L⁻¹ preparado em 0,10 mol L⁻¹ de KCl, contendo tampão fosfato na concentração em estudo; vazão: 1,5 mL min⁻¹.

Outro fator que pode explicar a diminuição da resposta do biossensor, observada na figura 46, é a diminuição na atividade enzimática, provocada pelo aumento da concentração dos íons H_2PO_4^- e de HPO_4^{2-} em solução (ZOU *et al*, 2006). Esses íons podem interagir com grupos que fazem parte do sítio ativo da enzima ou com grupos que podem afetar sua conformação e, conseqüentemente, provocar uma diminuição da atividade enzimática.

A resposta potenciométrica dada pelo biossensor, acoplado a célula eletroquímica (Figura 30) foi obtida em fluxo, usando sistema FIA descrito na figura 28. Parâmetros como vazão e volume da alça de injeção foram avaliados e os resultados estão mostrados na figura 47.

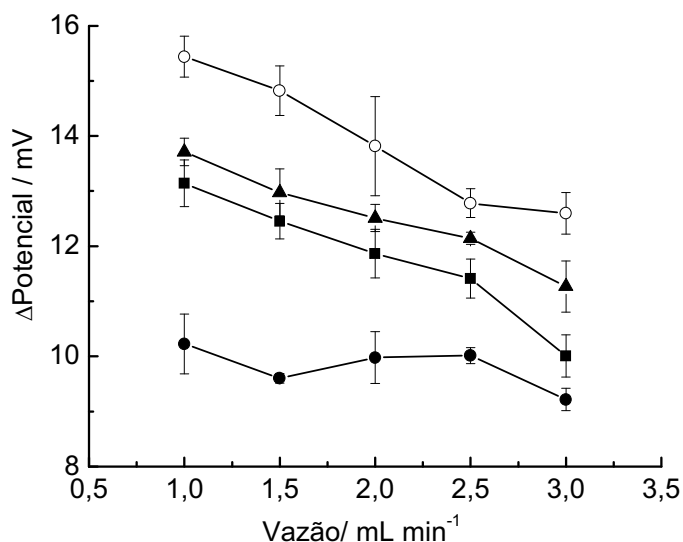


Figura 47 – Resposta do biossensor potenciométrico (grafite/poli(4-aminofenol)/AChE) em função da vazão para diferentes volumes de injeção: (●) 100; (■) 150; (▲) 200 e (○) 250 μL . Condições experimentais: 5,0 mmol L^{-1} de cloreto de acetilcolina preparado em solução transportadora contendo 1,0 mmol L^{-1} de tampão fosfato e 0,10 mol L^{-1} KCl, pH 7,40.

Para vazões maiores que 1,0 mL min^{-1} , observa-se uma diminuição na resposta do biossensor potenciométrico. Este comportamento pode ser explicado pela diminuição do tempo de interação entre enzima e substrato para vazões maiores e, portanto menos ácido acético é gerado na hidrólise do substrato. Esta diminuição é mais significativa para volumes de injeção de 150, 200 e 250 μL , e menos pronunciada para o volume de 100 μL de cloreto de acetilcolina. Também é observado um aumento na resposta do biossensor, com o aumento do volume

de injeção de cloreto de acetilcolina, devido à maior quantidade deste substrato frente à atividade enzimática imobilizada.

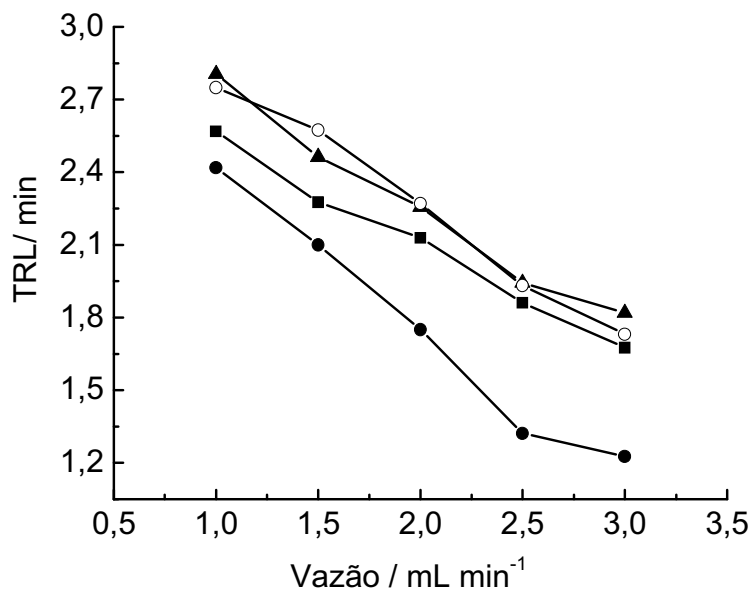


Figura 48 – Tempo de restabelecimento da linha base (TRL) em função da vazão para diferentes volumes de injeção: (●) 100; (■) 150; (▲) 200 e (○) 250 μL . Condições experimentais: 5,0 mmol L^{-1} de cloreto de acetilcolina preparado em solução transportadora contendo 1,0 mmol L^{-1} de tampão fosfato e 0,10 mol L^{-1} KCl, pH 7,40.

A melhor resposta do biossensor potenciométrico foi obtida para uma vazão de 1,0 mL min^{-1} e um volume de cloreto de acetilcolina de 250 μL . No entanto, para estes dois valores o tempo de restabelecimento da linha base foi maior (Figura 48), o que diminui a frequência de amostragem. Vazões maiores que 1,5 mL min^{-1} , não foram usadas em ensaios posteriores, pois podem provocar a lixiviação da enzima imobilizada. Sendo assim, vazões de 1,0 e 1,5 mL min^{-1} e volume de injeção de 150 μL foram utilizados em ensaios subsequentes.

5.5 Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados

Medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) dos eletrodos de grafite com poli(4-aminofenol) e do biossensor potenciométrico (10U) foram realizadas com objetivo de confirmar modificações provocadas pela enzima AChE, quando imobilizada na superfície de grafite/poli(4-aminofenol).

Voltamogramas cíclicos dos eletrodos foram obtidos em cela de três compartimentos contendo $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ e KNO_3 , variando-se o potencial entre -0,10V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de $100\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Os voltamogramas cíclicos estão mostrados na figura 49.

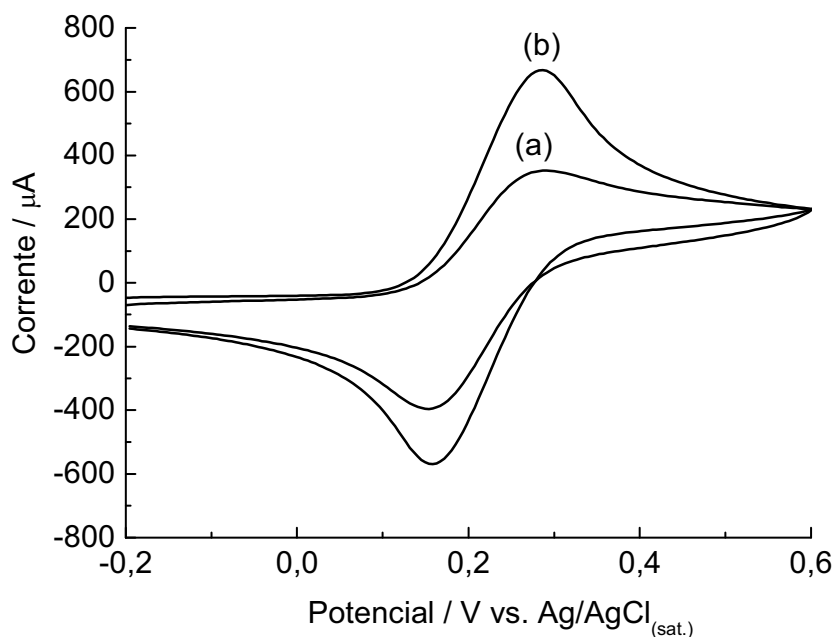


Figura 49 – Voltametria cíclica em $5,0 \text{ mmol L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$, $5 \text{ mmol L}^{-1} K_4Fe(CN)_6$ contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1} KCl$, 100 mV s^{-1} . (a) grafite/poli(4-aminofenol)/AChE; (b) grafite/poli(4-aminofenol).

As voltametrias cíclicas para as duas superfícies, não apresentaram diferenças significativas nos potenciais de pico (0,3V). No entanto, é observado que a resposta de corrente no biossensor foi menor que do eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol). A

diferença foi de aproximadamente 307 μA , devido à presença da enzima AChE, que provocou uma menor transferência de carga para as espécies eletroativas em solução.

Este comportamento de maior resistência à transferência de carga no biossensor, também foi observado para os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica realizada usando-se o célula de três compartimentos (Figura 25 E) contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e KCl como eletrólito suporte. As medidas para cada eletrodo foram feitas variando-se a faixa de frequência entre 100 KHz e 0,02 Hz usando um sinal de excitação senoidal com uma amplitude de excitação de 10 mV. Os resultados de impedância são representados na forma de diagrama de Nyquist (Figura 50A) e do gráfico de Bode (Figura 50 B).

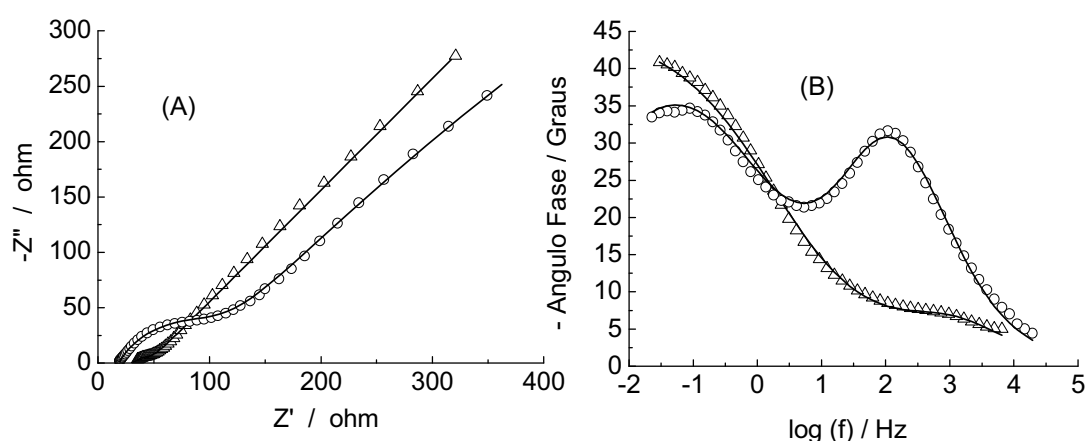


Figura 50 – Gráfico de Nyquist(A) e Bode (B) obtidos em 5,0 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 0,1 mol. L^{-1} KCl , frequência: 100KHz e 0,02Hz; amplitude 10mV. (Δ)grafite/poli(4-aminofenol); ($\circ$)grafite/poli(4-aminofenol)/AChE.

Cada ponto do diagrama de Nyquist representa um valor de Z' e Z'' medidos em frequência particular. Para as duas superfícies (biossensor e grafite/poli(4-aminofenol)) observa-se um semicírculo em regiões de alta frequência onde a impedância é dada pela resistência da solução e da superfície à transferência de carga. Uma relação linear em baixas frequências, também é

observada, onde a impedância é dada pela soma das resistências da solução e de polarização (Figura 50 A). O semicírculo descreve processos faradâicos de transferência de elétrons entre o eletrodo e a superfície, e a porção linear contém informações sobre transporte de íons. Para o biossensor nota-se um semicírculo mais acentuado, indicando que tanto a Z' (Componentes capacitivos) como Z'' (componentes resistivos) do sistema foram significativamente mudados. O mesmo comportamento pode ser visto num gráfico de Bode (Figura 50 B), onde se relaciona o ângulo de fase com a frequência. No caso deste gráfico, valores de ângulo de fase tendendo a 0° podem ser associados a componentes resistivos, e ângulos de fase tendendo a 90° a componentes capacitivos, e a impedância de Warburg, a ângulos próximos de 45° . Analisando o gráfico de Bode de valores a partir de altas frequências, nota-se uma tendência de ângulo de fase para 90° entre 10^5 e 10^2 Hz, para as duas superfícies, no entanto para o biossensor é mais acentuada, indicando valores de componentes capacitivos maiores. Para região de frequência entre 10^2 e 10^1 Hz observa-se uma tendência de ângulo de fase para 0° no biossensor, indicando componentes resistivos maiores. Para a superfície com o filme de poli(4-aminofenol) não é observada esta tendência. Em regiões de baixa frequência de 10^{-1} a 10^{-2} Hz observa-se uma tendência do ângulo de fase para 45° , maior para a superfície com poli(4-aminofenol), no entanto a impedância de Warburg obtida para o biossensor foi maior, o que pode ser atribuído à contribuição de componentes resistivos, que pode ser confirmado pela pequena tendência do ângulo de fase a 0° , observada em frequências entre 10^{-1} a 10^{-2} Hz.

A figura 51 representa o circuito equivalente que melhor descreve as características elétricas dos sistemas (biossensor e grafite/poli(4-aminofenol)). Esta simulação permite determinar parâmetros pertinentes a cada componente do

circuito elétrico que refletem as propriedades dielétricas, o transporte de carga e de massa na interface eletroquímica, cujos resultados estão descritos na tabela 11.

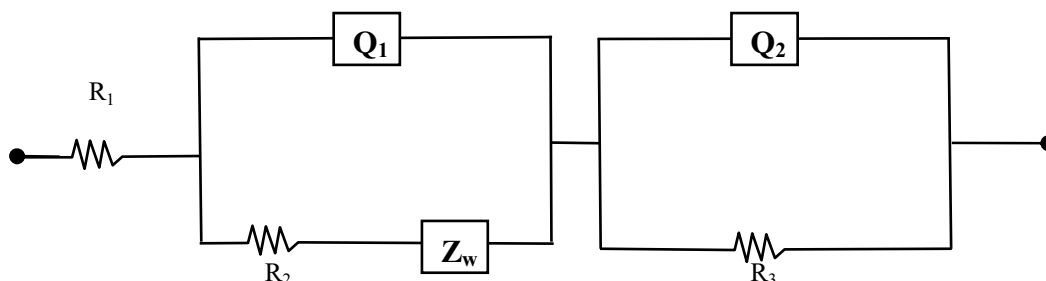


Figura 51 – Modelo de circuito equivalente usado para simular os espectros de impedância para as superfícies de grafite/poli(4-aminofenol) e grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. Q_1 : capacitância da dupla camada elétrica; Q_2 : capacitância da camada de modificação: grafite/poli(4-aminofenol) e biossensor de grafite/poli(4-aminofenol)/AChE; Z_w : resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica.

Tabela 11 – Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist.

Parâmetro	Superfície	
	Poli(4-AMP)	Poli(4-AMP)/ AChE
R_s / Ω	32,8	18,66
R_{tc} / Ω	15,52	81,1
$R_{cm} / k\Omega$	-----	2,66
Q_{dc} / mF	0,2702	0,2695
Q_{cm} / mF	----	3,66
$W / \times 10^{-2}$	0,5799	6,80
n	-----	0,54
$\chi^2 (\times 10^{-2})$	1,04	0,778

R_s - resistência da solução ; R_{tc} - resistência a transferência de carga; R_{cm} – resistência da camada de modificação (poli(4-AMP) com e sem AChE); Q_{dc} - capacitância da dupla camada elétrica; Q_{cm} - capacitância da camada de modificação (poli(4-AMP)/AChE); W - Resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica; χ^2 - parâmetro estatístico de simulação.

No circuito equivalente, observa-se a presença de capacitância da dupla camada (Q_1) e outra capacitância que pode ser relacionada à camada de modificação poli(4-AMP)/AChE (Q_2), além de resistências associadas à solução (R_1), a transferência de carga da dupla camada elétrica (R_2), aquela referente a transferência de carga entre o grafite e a camada de modificação poli(4-AMP)/AChE (R_3) e resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica (Z_w).

Os resultados da simulação (Tabela 11) mostram dois valores de resistência para o biossensor (resistência a transferência de carga da dupla camada elétrica, R_{tc} , e a outra resistência que pode ser atribuída à transferência de carga entre o grafite e a camada de modificação poli(4-AMP)/AChE, R_{cm}). O eletrodo de grafite modificado apenas com o filme de poli(4-aminofenol) apresenta apenas a resistência à transferência de carga da dupla camada elétrica, com valor menor em relação àquela observada nos dados de simulação para o biossensor. O sistema eletroquímico contendo o biossensor apresentou resistência à transferência de carga maior que a do sistema contendo apenas o filme, o que confirma o comportamento de corrente menor observado para o biossensor, nos voltamogramas cíclicos, mostrados na figura 49. Os resultados de impedância e de voltametria cíclica subsidiam afirmar que a superfície de grafite contendo o filme de poli(4-aminofenol) foi modificada com a imobilização da enzima AChE.

5.6 Análises de microscopia de força atômica

A morfologia dos eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) e poli(4-aminofenol)/AChE foi investigada através de imagens de microscopia de força atômica-MFA (Figura 52). Os resultados mostram a formação de estruturas globulares vizinhas no eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) (Figura 52 A).

A superfície do eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) com a enzima imobilizada (Figura 52 B) mostra um preenchimento dos espaços vizinhos das estruturas globulares anteriormente observadas para o eletrodo recoberto apenas com poli(4-aminofenol), mudando completamente a morfologia da superfície. O eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) apresenta maior número de glóbulos com estrutura definida, em relação à superfície do eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) com a enzima AChE imobilizada. Valores de rugosidade para as duas superfícies foram determinados seguindo procedimento proposto por *LOBO et al., 1999*. O valor de rugosidade para o eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol), em escala de $2\mu\text{m}$, foi de 174 nm. Este valor foi maior que para o eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) modificado com AChE, cujo valor para a mesma escala foi de 86 nm. Esta diferença nos valores de rugosidade e na topografia observada na figura 52 A e figura 52 B, reforçam a ocorrência de imobilização da enzima AChE no biossensor.

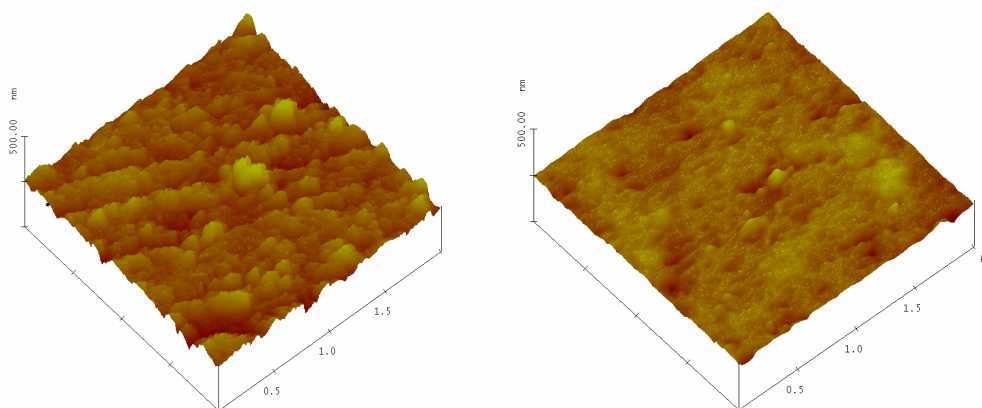


Figura 52 – Imagens de MFA para eletrodos modificados. (A) grafite/poli(4-aminofenol); (B) grafite/poli(4-aminofenol)/AChE.

5.7 Avaliação da inibição da enzima AChE pelo Diclorvós

Considerando os resultados obtidos com o biossensor potenciométrico grafite/poli(4-aminofenol)/AChE, observou-se que o mesmo apresenta

características promissoras para ser usado na determinação de inibidores da enzima AChE. Esta avaliação foi realizada empregando-se o diclorvós como pesticida organofosforado. A resposta analítica associada com a concentração do diclorvós é baseada na inibição da enzima AChE imobilizada na superfície do biossensor. A porcentagem de inibição é avaliada pela diminuição na variação de potencial causada pela formação de ácido acético na hidrólise do substrato cloreto de acetilcolina, catalisada pela AChE após introdução de uma concentração conhecida de solução de diclorvós. A porcentagem de inibição da enzima AChE foi obtida de acordo com a expressão:

$$I(\%) = \frac{\Delta E_1 - \Delta E_2}{\Delta E_1} \cdot 100\%$$

Onde $I(\%)$ é o grau de inibição, ΔE_1 é a diferença de potencial produzida antes da inibição e ΔE_2 é a diferença de potencial estabelecida após a inibição.

Resultados iniciais de inibição e regeneração, mostrados na figura 53, foram obtidos usando o biossensor proposto acoplado no sistema de fluxo contínuo (Figura 28), usando uma atividade enzimática imobilizada de 10U. A etapa de regeneração da resposta do biossensor foi realizada pela introdução de 150 μL de 1,1'- Trimetileno- bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima (TMB-4), 0,5 mmol L^{-1} . Soluções padrões de diclorvós nas concentrações de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram injetadas e a inibição foi avaliada com tempo de incubação de 3 minutos (Figura 53: B, C, D).

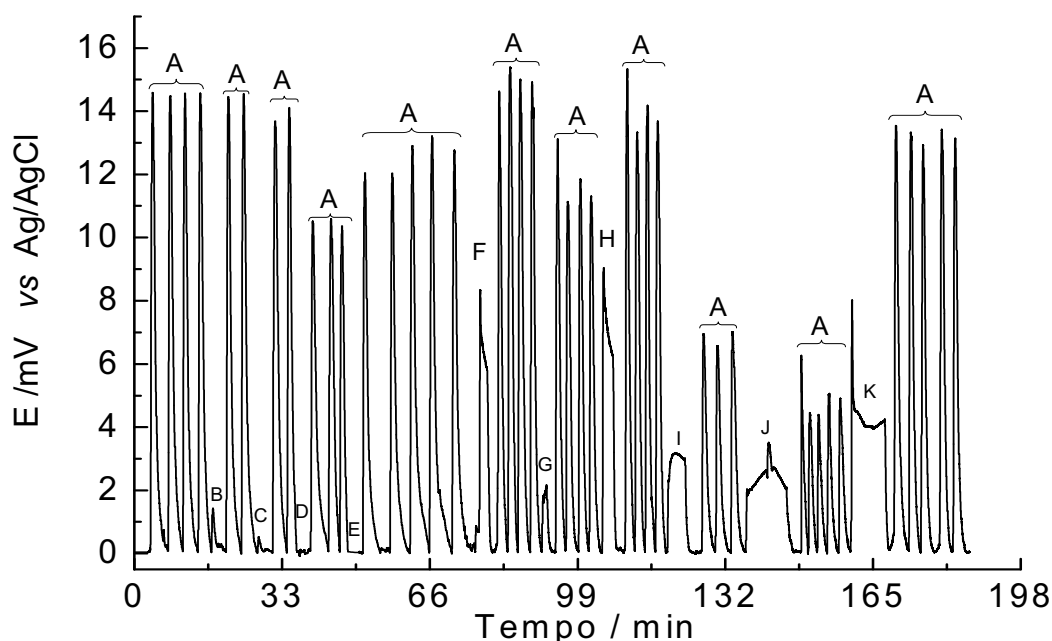


Figura 53 – Efeito da inibição da AChE pelo Diclorvós e posterior reativação da enzima com TMB-4. (A), cloreto de acetilcolina $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B), (C), (D) diclorvós $0,01 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente; (E),(F), (H) e (K) reativação da enzima imobilizada com TMB-4 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (G),(I) e (J) diclorvós $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com tempo de incubação crescente. Solução Transportadora: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e Tampão fosfato $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH = 7,40.; Vazão= $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem $150 \text{ } \mu\text{L}$. Atividade enzimática imobilizada 10 U.

Para uma atividade enzimática imobilizada de 10U e tempo de incubação de 3 minutos, a solução de diclorvós, $0,01 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou inibição da resposta, enquanto a solução de diclorvós $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou inibição de 4%. Uma porcentagem de inibição mais significativa, 25,4%, foi obtida para solução de diclorvós de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para uma concentração de diclorvós de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foi avaliado a %inibição para tempos de incubação de 7 e 12 minutos (Figura 53: G, I, J). Para um tempo de incubação de 7 minutos a inibição foi de 51,5% e para 12 minutos de incubação foi de 66,5%. Estes resultados mostram que a

porcentagem de inibição é dependente da concentração e do tempo de incubação do diclorvós. A regeneração da enzima é rápida, utilizando solução de TMB-4, 0,5 mmol L⁻¹, sem parada de fluxo (Figura 53 E). No entanto, a regeneração não foi completa, apresentando uma recuperação de 87,7%. Uma recuperação da atividade enzimática de 100% foi obtida com a mesma concentração de TMB-4, para um tempo de incubação 5 minutos, (Figura 53 F).

Os resultados da figura 53 mostram que um aumento na concentração e no tempo de incubação do diclorvós provoca um aumento na resposta de inibição. No entanto, a relação resposta (% inibição) vs. concentração do analito (diclorvós) precisa ser otimizada, preferencialmente para uma inibição sem parada de fluxo. Provavelmente para uma concentração de diclorvós de 0,01 µmol L⁻¹ pode ter ocorrido inibição da enzima. No entanto, não foi possível observá-la para uma relação de atividade enzimática de 10U e 5,0 mmol L⁻¹ de substrato usada no ensaio. Essa atividade enzimática (10U), segundo resultados apresentados na figura 41, necessita de uma concentração de substrato superior a 10 mmol L⁻¹, para saturar todos os sítios ativos da enzima na hidrólise do substrato. Como foram utilizados 5 mmol L⁻¹, provavelmente apenas 50% dos sítios ativos foram usados e, portanto a resposta obtida após incubação com o pesticida foi a mesma, pois podem existir sítios ativos suficientes, após incubação, para hidrolisar todo o cloreto de acetilcolina na concentração de 5 mmol L⁻¹. Pelo mesmo motivo, a resposta de inibição para as demais concentrações de diclorvós, também poderia ser maior se esta relação (atividade enzimática vs. concentração substrato) fosse otimizada.

Com objetivo de melhorar o limite de detecção, limite de quantificação e frequência de amostragem (sem parada de fluxo), para o método proposto, foram

realizados ensaios com o biossensor, com atividade enzimática de 10U acoplado no sistema de fluxo contínuo, e a resposta potenciométrica antes e depois da inibição foi obtida utilizando solução de cloreto de acetilcolina de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato 1 mmol L^{-1} contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH igual a 7,40. Para esta atividade enzimática (10U) a concentração de substrato, 20 mmol L^{-1} é suficiente para saturar todos os sítios ativos da enzima. Soluções padrões de diclorvós ($150 \text{ }\mu\text{L}$) foram injetadas sem parada de fluxo.

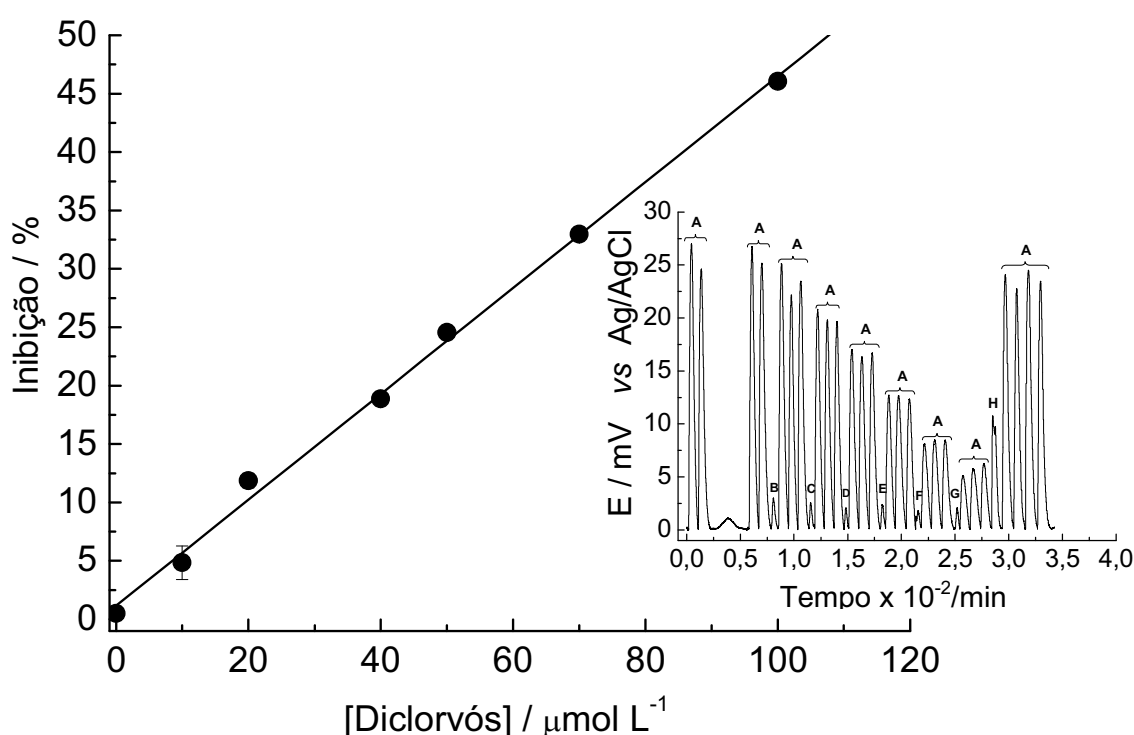


Figura 54 – Inibição da resposta potenciométrica em função da concentração de Diclorvós, sem parada de fluxo. (A), resposta potenciométrica na presença de 20 mmol L^{-1} de substrato; (B), (C),(D),(E), (F) e (G), injeção de diclorvós, 10, 20, 40, 50, 70 e $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente; (H) reativação da enzima com TMB-4 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; Condições experimentais: Solução transportadora: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e tampão fosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 7,40.; Vazão= $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem $150 \text{ }\mu\text{L}$. Atividade da enzima imobilizada: 10 U.

Os resultados de porcentagem de inibição da resposta potenciométrica em função da concentração do diclorvós estão apresentados na figura 54. A curva analítica obtida apresenta relação linear entre a % inibição e concentração de diclorvós na faixa de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e segue a equação $\%I = 0,46 [\text{diclorvós}] + 1,16$ com coeficiente de correlação de 0,998.

Como a resposta analítica associada com a concentração de diclorvós é dada por uma diminuição na variação de potencial causada pela inibição da atividade enzimática imobilizada, então a resposta do branco pode ser a variação da resposta potenciométrica do cloreto de acetilcolina antes da inibição. O valor do desvio padrão da resposta correspondente a dez injeções de cloreto de acetilcolina 20 mmol L^{-1} , sem inibição, foi usado para determinar o limite de detecção e quantificação. Três vezes este valor em relação a sensibilidade do método foi usado para calcular o limite de detecção para o diclorvós. O cálculo do limite de quantificação, foi realizado usando dez vezes o valor do desvio padrão da resposta do branco em relação a sensibilidade do método.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,18 mg L^{-1}) e 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,53 mg L^{-1}), respectivamente. Estes valores são bastante satisfatórios, ressaltando que o método proposto é sem parada de fluxo (tempo de incubação igual a zero) quando comparados com outros métodos que usam biossensor potenciométrico a base de AChE, descritos na literatura. Por exemplo, *VALDÉS-RAMÍREZ et al. (2008)*, desenvolveram biossensor amperométrico, baseado na inibição de AChE, para determinação de diclorvós em amostras de maçã. O método proposto apresentou limite de detecção de 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 10 minutos de incubação. *IVNITSKII & RISHPON (1994)* desenvolveram biossensor com detecção potenciométrica de diclorvós em fluxo e

em sistema estacionário e obtiveram limites de detecção de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o modo de fluxo e $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para modo estacionário ambos com 10 minutos de incubação. *ANDREESCU et al. (2002)* desenvolveram biossensor amperométrico imobilizando AChE por encapsulamento sol-gel e imobilização por afinidade metal-quelante em eletrodo impresso. O biossensor apresentou limite de detecção de $0,001 \mu\text{mol L}^{-1}$ para diclorvós e outros organofosforados estudados, para um tempo de incubação de 20 minutos.

5.8 Avaliação do tempo de vida do biossensor potenciométrico

O tempo de vida do biossensor grafite/poli(4-AMP)/AChE foi avaliado para uma atividade enzimática de 10U, durante um período de quarenta dias, injetando em triplicata solução de cloreto de acetilcolina 20 mmol L^{-1} , e a resposta do potencial da célula foi observada. Entre uma avaliação e outra, o eletrodo foi armazenado no estado seco, no freezer (-12°C) até a próxima avaliação.

A figura 55 mostra os resultados de resposta relativa do biossensor em função do tempo de armazenamento em dias. Após 23 dias de armazenamento do biossensor observa-se uma diminuição de 29,5% na resposta relativa e após 40 dias de avaliação uma diminuição de 56,5 % da resposta. Esta diminuição na resposta do biossensor pode ser atribuída à baixa atividade enzimática imobilizada em relação à concentração de cloreto de acetilcolina 20 mmol L^{-1} .

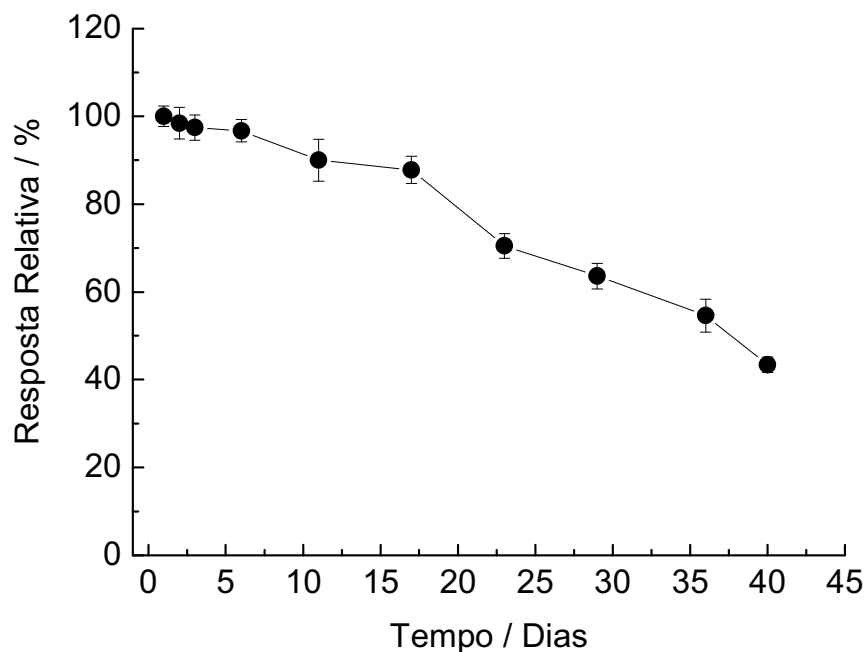


Figura 55 – Efeito do tempo de estocagem na resposta potenciométrica do biossensor grafite/poli(4-aminofenol)/AChE. Condições experimentais: Solução Transportadora: KCl 0,1 mol L⁻¹ e Tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹, pH = 7,40.; Vazão= 1,0 mL min⁻¹. Alça de amostragem 150 µL. Atividade enzimática imobilizada 10U, solução de cloreto de acetilcolina 20 mmol L⁻¹.

5.9 Confirmação do Diclorvós no CG-MS

Para verificação da especificidade do padrão usado e confirmação do analito presente na amostra fortificada, o diclorvós foi monitorado através de comparações dos resultados obtidos com a técnica de cromatografia gasosa e detecção espectrométrica de massa. Foram monitorados de forma seletiva os íons da molécula de diclorvós no modo SIM (“Single ion monitoring”) em solução padrão de diclorvós (100 µmol L⁻¹) e solução obtida da extração de amostra fortificada com este nível de concentração.

O diclorvós quando injetado em cromatógrafo com espectrômetro de massa, sofre um bombardeamento de elétrons na câmara de ionização sob alto vácuo com formação dos principais íons moleculares que apresentam relação m/z de 109, 185 e 220, mostrados na figura 56B, com um tempo de retenção de 14,7 minutos verificado pelo cromatograma mostrado na figura 56A. Desta forma com o monitoramento destes íons foi possível verificar que nenhum produto de degradação do diclorvós com o solvente, ou na amostra fortificada, viesse a interferir na resposta analítica, confirmando assim a especificidade do padrão usado.

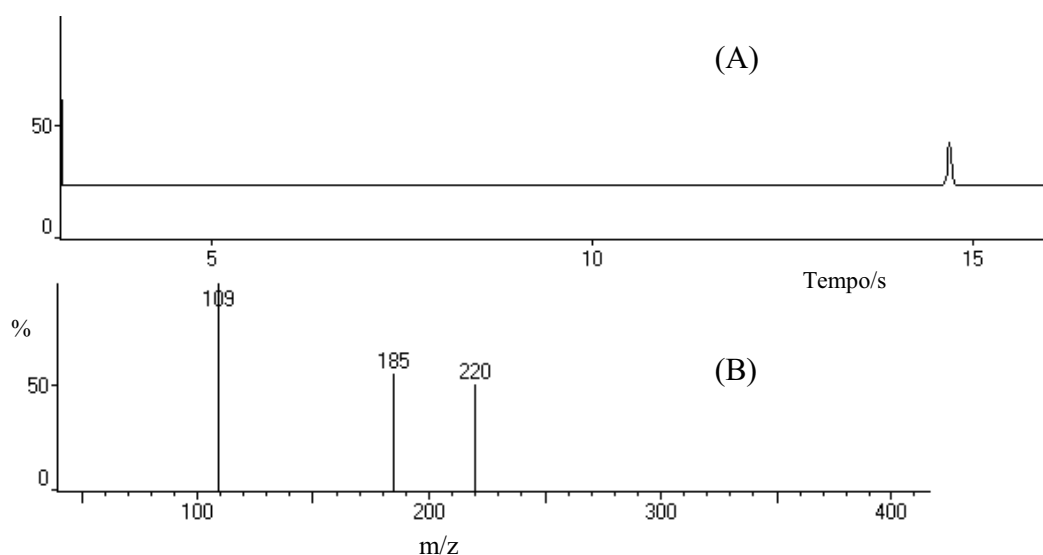


Figura 56 – Cromatograma (A), espectro dos íons moleculares (B) do Diclorvós no modo SIM (“Single ion monitoring”).

5.10 Avaliação da exatidão, precisão e comparação de métodos

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência). A

determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade do método. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado / valor esperado) e deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (*INMETRO-DOQ-CGCRE-008, 2003*).

Ensaio de fortificação/recuperação foram realizados para detecção de pesticida diclorvós em amostras de batata (*Solanum tuberosum, L.*) da variedade cupido. As amostras foram fortificadas com solução de diclorvós em três níveis de concentração, 10, 50 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no extrato obtido. As recuperações foram avaliadas usando procedimento de extração líquido-líquido (Figura 32).

Os valores de recuperação obtidos foram expressos em porcentagem das recuperações em relação à quantidade do diclorvós adicionado no procedimento de fortificação, considerada como 100% (Tabelas 12 e 13). Os percentuais de recuperação foram calculados de acordo com a equação:

$$\% \text{recuperação} = \frac{C_2 - C_b}{C_1} \cdot 100\%$$

Onde C_1 é a concentração adicionada, C_2 é concentração do diclorvós encontrada no ensaio de recuperação, C_b é concentração da espécie analítica existente na amostra sem fortificação.

Para verificar a exatidão do método proposto, utilizou-se de um modelo estatístico baseado em hipótese, submetendo os resultados das recuperações obtidas ao teste t de *Student*, que permite comparações entre séries simples, para um determinado intervalo de confiança da média. Desta forma foi possível avaliar

os resultados quanto à exatidão do método estabelecendo-se como hipótese nula ou erro zero como H_0 : Recuperação = 100% e como hipótese alternativa H_1 : Recuperação $\neq$ 100%. A equação utilizada para verificação da hipótese é mostrada a seguir:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{| \text{Rec.M} - 100\% |}{s / \sqrt{n-1}}$$

Onde, RecM é o percentual médio das recuperações, 100% é o percentual da recuperação desejada, s é o desvio padrão de n, e n é o número de replicatas.

Assim se $t_{\text{calculado}}$ for menor que t_{tabelado} , aceita-se a hipótese de evidência que não existem diferenças sistemáticas entre o valor médio da recuperação e o valor padrão (100%), significando que não foram encontrados erros sistemáticos no método analítico proposto, demonstrando que o método possui a exatidão de acordo com um determinado intervalo de confiança.

Tabela 12 – Recuperações para extratos de amostras de batata fortificadas com Diclorvós em três níveis de concentração obtidas com método proposto (biossensor grafite/poli(4-AMP)/AChE).

NF/ $\mu\text{mol L}$	Inibição/%	Rec./%	RecM/%	s	IC	$t_{95\%}$ Calculado	CV/%	CVG/%
10	7,9	61,4	69,1	9,2	7,9	5,5185	13,3	
	8,1	66,7						
	8,5	79,2						
50	18,1	69,2	68,3	0,8	1,3	55,861	1,1	6,4
	17,9	68,1						
	17,8	67,7						
80	26,6	73,2	69,6	3,4	5,7	12,645	4,8	
	25,5	69,2						
	24,7	66,5						

NF-Nível de fortificação; Rec.-Recuperação (%); RecM-Recuperação média; s-desvio padrão; CV-desvio padrão relativo(%); IC-intervalo de confiança da média; CVG-coeficiente de variação global nos três níveis de fortificação.

Os resultados para $t_{\text{calculado}}$ (Tabela 12) mostram que todos os valores estão acima do valor t_{tabelado} (4,303) para um intervalo de confiança de 95%. Assim pode-se afirmar que existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado de 100% de recuperação, considerando-se que o método não foi suficientemente exato nas recuperações obtidas nos níveis de concentração de diclorvos avaliados. As diferenças observadas ou erro cometido pelo método podem ser atribuídos a perda de analito inerente ao procedimento de extração líquido-líquido. Um efeito matriz também pode ter ocorrido, alterando a interação do diclorvos com a enzima imobilizada, pois a porcentagem de inibição dada por uma solução padrão de diclorvos na concentração de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ é $37,49\% \pm 3,2\%$ maior que a porcentagem de inibição obtida na amostra fortificada com este nível de concentração ($25,6\% \pm 2,4\%$).

Os resultados para $t_{\text{calculado}}$ (Tabela 13) referente aos métodos cromatográficos, CG-DCE e CG-MS também estão acima do valor t_{tabelado} (4,303) para um intervalo de confiança de 95%, exceto para o resultados de fortificação considerando o nível de concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido com CG-MS que apresentou valor de $t_{\text{calculado}}$ menor que o t_{tabelado} . Assim estes métodos, para maioria dos níveis de concentração avaliados, também não se mostraram suficientemente exatos nas recuperações obtidas. As diferenças observadas ou erro cometido pelos métodos podem ser atribuídos a perda de analito inerente ao procedimento de extração líquido-líquido.

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas mais comuns de expressá-la

são por meio do desvio padrão ou desvio padrão relativo. A precisão é geralmente dependente da concentração do analito e, deste modo, deve ser determinada para um diferente número de concentrações. Neste caso o desvio padrão relativo pode ser mais útil, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse (*INMETRO-DOQ-CGCRE-008, 2003*).

Para verificação da variabilidade (precisão) dos resultados obtidos com o método proposto, a tabela 12 mostra a variação dos resultados da média de três recuperações obtidas nos três níveis de concentração para o dicloróvos. O percentual de recuperação em relação ao adicionado, o desvio padrão, os coeficientes de variação (CV/%) para cada nível de concentração, bem como a média dos coeficientes de variação dos três níveis, definida como coeficiente de variação global (CVG/%) também são mostrados na tabela 12.

Os resultados para o desvio padrão relativo (CV/%) das recuperações em cada nível de concentração avaliado, bem como do coeficiente de variação global (CVG/%), validam a precisão do método proposto, pois estão dentro dos limites recomendados pela literatura, abaixo de 20% para o CV/% e menos que 15% para o CVG/% (*THIER & ZEUMER, 1987; VAN ZOONEN, 1996; EC, 2000; GARP, 2001*).

A comparação dos resultados obtidos utilizando o método proposto com os resultados de um método de referência proporciona a avaliação do grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, avalia a exatidão e precisão do método proposto relativamente ao de referência (*INMETRO-DOQ-CGCRE-008, 2003*). Assim resultados de adição/recuperação usando o biossensor potenciométrico grafite/poli(4-AMP)/AChE) foram

comparados com resultados de adição/recuperação obtidos por cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons e cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa (Tabela 13).

Tabela 13 – Recuperações para amostras de batata fortificadas com Diclórvo em três níveis de concentração obtidas com método proposto, CG-DCE e CG-MS.

Método	NF/ μmol L	Rec./ %	n	s	IC	CV/ %	t _{95%} Calculado	F _(B/DCE) Calculado	F _(B/MS) Calculado
Biossensor	10,0	64,1	3	9,2	± 7,8	14,3	5,5185	1,135	2,798
	50,0	68,4	3	0,8	± 1,3	1,1	55,861	45,56	43,89
	80,0	69,6	3	3,4	± 5,7	4,8	12,644	2,077	2,163
CG-DCE	10,0	79,0	5	9,8	± 13,4	12,4	4,2857		
	50,0	65,3	6	5,4	± 7,4	8,3	14,368		
	80,0	67,3	6	4,9	± 6,6	7,2	14,922		
CG-MS	10,0	114,4	6	5,5	± 7,6	4,8	5,8544		
	50,0	111,2	4	5,3	± 7,3	4,7	3,6602		
	80,0	82,95	6	5,0	± 6,9	6,0	7,6250		

NF-Nível de fortificação; Rec.-Recuperação (%); RecM-Recuperação média; s-desvio padrão; CV-desvio padrão relativo(%); IC-intervalo de confiança da média; CVG-coeficiente de variação global nos três níveis de fortificação; F_{(B/DCE)Calculado} – parâmetro da distribuição de F observado comparando método proposto e CG-DCE; F_{(B/MS)Calculado} – parâmetro da distribuição de F observado comparando método proposto e CG-MS;

Quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F. Este teste baseia-se no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos ($F_{\text{calculado}} = S_A^2 / S_B^2$), colocando-se a maior variância no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a um. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de F. Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões (INMETRO-DOQ-CGCRE-008, 2003). Os resultados do parâmetro referente ao teste F obtidos comparando resultados de recuperação entre o método proposto (Biossensor potenciométrico grafite/poli(4-AMP)/AChE) com CG-DCE e CG-MS

(Tabela 13), mostram que para os níveis de concentração de $10\mu\text{mol L}^{-1}$ e $80\mu\text{mol L}^{-1}$ não existem diferenças significativas na precisão entre o método usando o biossensor potenciométrico e o método CG-DCE, pois os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que o valor de $F_{\text{tabelado}(0,05;2;2)}$ (9,28). Também para estes dois níveis de concentração, comparando o método usando o biossensor potenciométrico com o método CG-MS não existe diferença significativa entre estes dois métodos, relativamente às suas precisões, pois os resultados de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que o valor de $F_{\text{tabelado}(0,05;2;2)}$ (9,28). No entanto para o nível de concentração de $50\mu\text{mol L}^{-1}$, observa-se que o valor de $F_{\text{calculado}}$ apresenta-se maior que o $F_{\text{tabelado}(0,05;2;2)}$ (9,28), quando comparamos o método proposto, com os dois outros métodos, CG-DCE e CG-MS. O resultado de aplicação do teste F para este nível de concentração permite afirmar que existe diferença significativa entre o método usando o biossensor e os dois outros métodos (CG-DCE e CG-MS), com relação à precisão. Comparando o valor do desvio padrão relativo do método proposto (1,1%; n=3), com os demais métodos, CG-DCE (8,7%; n=3) e CG-MS (4,7%; n=3), observa-se que o desvio padrão relativo para o método usando o biossensor potenciométrico grafite/poli(4-AMP)/AChE é menor apresentando assim uma precisão melhor para este nível de concentração ($50\mu\text{mol L}^{-1}$) em relação aos métodos CG-DCE e CG-MS.

6 Conclusões

Estudos realizados com eletrodo de grafite e grafite modificado com filmes de poli(2-AMP), poli(3-AMP) e poli(4-AMP) mostraram que estes eletrodos podem ser usados como suporte para imobilização de biocomponentes e, conseqüentemente, na construção de biossensores. O eletrodo de grafite modificado com poli(4-AMP) apresentou características analíticas em relação a concentração de ácido acético, avaliada em fluxo, tais como, sensibilidade, velocidade de resposta, limites de detecção e quantificação, comparáveis ao eletrodo de grafite e superiores aos eletrodos de grafite modificados com poli(2-AMP) e poli(3-AMP). Esta capacidade de transdução, juntamente com biocompatibilidade oferecida pela superfície modificada com poli(4-AMP) favoreceram a imobilização da enzima AChE, viabilizando a construção do biossensor potenciométrico, usado como proposta de detecção em fluxo de resíduos de agrotóxicos, inibidores desta enzima, em alimentos de origem vegetal.

Medidas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e imagens de MFA dos eletrodos de grafite com poli(4-AMP) e do biossensor (grafite/poli(4-AMP)/AChE) confirmam as modificações provocadas pela imobilização da enzima AChE. Os resultados de voltametria e impedância mostram que o sistema eletroquímico contendo o biossensor apresentou uma resistência total maior que a do sistema contendo apenas o filme. Os resultados de MFA mostram a formação de estruturas globulares vizinhas no eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol). Para a superfície do biossensor grafite/poli(4-aminofenol) observa-se um preenchimento dos espaços vizinhos das estruturas globulares anteriormente observadas para o eletrodo recoberto apenas com poli(4-aminofenol). O valor de rugosidade para o eletrodo de grafite modificado

com poli(4-aminofenol), em escala de 2 μm , foi de 174 nm. Este valor foi maior que para o eletrodo de grafite/poli(4-aminofenol) modificado com AChE (86 nm). Estas diferenças nos valores de rugosidade e na topografia observada reforçam a ocorrência de imobilização da enzima AChE no biossensor.

O máximo de resposta para o biossensor (grafite/poli(4-AMP)/AChE), em relação a concentração do substrato cloreto de acetilcolina, foi obtida usando uma solução transportadora contendo 1mmol L⁻¹ de tampão fosfato, KCl 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,40. A vazão do transportador de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 150 μL , também proporcionaram uma resposta máxima.

A relação atividade da enzima imobilizada (10U) para uma concentração de cloreto de acetilcolina de 20 mmol L⁻¹, proporcionou porcentagem de inibição máxima, obtida sem parada de fluxo, usando diclorvós como inibidor da enzima AChE. Esta relação atividade enzimática e concentração de substrato, aliada a condições experimentais otimizadas, proporcionaram o desenvolvimento de um método de análise que apresentou limites de detecção e de quantificação, para diclorvós de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,18 mg L⁻¹) e 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,53 mg L⁻¹), respectivamente.

Recuperações em amostra de batata (*Solanum tuberosum*, L.) fortificada com solução de diclorvós em três níveis de concentração mostraram para um intervalo de confiança de 95%, que o método usando análise por injeção em fluxo acoplado com biossensor potenciométrico grafite/poli(4-AMP)/AChE não foi suficientemente exato, no entanto apresentou valores de porcentagem de recuperação próximos aos obtidos com CG-DCE e CG-MS. Resultados de desvio padrão relativo e desvio padrão relativo global, validam a precisão do método proposto. Este parâmetro de validação (precisão) foi comparável à precisão do

método de cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons e cromatografia gasosa por detecção espectrométrica de massa.

O método CG-MS também foi usado para verificar a especificidade do padrão usado e confirmar a presença do analito na amostra fortificada. O monitoramento dos íons moleculares com m/z de 109, 185 e 220 permitiu verificar que não ocorreu a degradação do diclorvós com o solvente, confirmando assim a especificidade do padrão usado e sua presença na amostra fortificada.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que o eletrodo de grafite/poli(4-AMP) apresentou biocompatibilidade para imobilização de AChE e considerável capacidade de transdução, proporcionando o desenvolvimento do biossensor potenciométrico usado como sistema de detecção em fluxo para determinação de resíduos de agrotóxicos inibidores da AChE em amostras de alimentos de origem vegetal.

7 Propostas de continuidade do trabalho

- Desenvolver metodologia de extração/pré-concentração usando materiais lignocelulósicos, por exemplo, a *Moringa oleífera*, como material sorvente em coluna pré-concentradora e o biossensor potenciométrico desenvolvido, como proposta para quantificação da espécie analítica.
- Aplicar o método desenvolvido (biossensor potenciométrico) em amostras de alimentos dando ênfase a alguns que são consumidos diariamente pela população, como exemplo, alface e outras hortaliças, obtidas de feiras livres, supermercados e de comércios atacadistas.
- Adaptar a célula desenvolvida para análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica, usando como eletrodo de trabalho o grafite modificado com filmes poliméricos no desenvolvimento de biossensores. Inserir na geometria de célula desenvolvida, eletrodo auxiliar de platina, a fim de obter célula eletroquímica como proposta de detecção amperométrica acoplada a análise por injeção em fluxo, para ser aplicada para:
 - Determinação de derivados de fenol usando como eletrodo de trabalho biossensor a base de peroxidase imobilizada em eletrodos de grafite recoberto com filme de ácido 2-hidroxifenilacético.
 - Determinação de metais, por exemplo, mercúrio em amostras de água e efluentes.
- Acoplar o sistema de detecção potenciométrica, sensor de grafite/poli(4-aminofenol) à cromatografia líquida de alta eficiência visando a determinação de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico) em amostras de bebidas, tais como sucos industrializados, vinhos e conservas.

8 Produção científica

8.1 Artigos Científicos

- Edmar I. Melo, Ana G. Brito-Madurro, João M. Madurro, Nívia M. M. Coelho. Potentiometric Sensor Based in the Chemistry Modification of Graphite Electrodes with Polyaminophenols. *Analytical Sciences*. Dezembro de 2009.
- Edmar Isaias de Melo; Diego L. Franco; André S. Afonso; Hélien C. Rezende; Ana G. Brito-Madurro; João M. Madurro; Nívia M. M. Coelho. Dichlorvos Determination in Potato "in Natura" Using Potentiometric Biosensor Based on the Inhibition of Acetylcholinesterase Immobilized on a Poly(4-Aminophenol) Matrix. *Journal of Applied Electrochemistry*, Dezembro de 2008.
- Celso L. Araújo, Edmar I. Melo, João M. Madurro and Nívia M. M. Coelho. Determination of citric acid in beverages using a potentiometric sensor. *Food Chemistry*. Junho de 2009.
- Nívia M. Coelho, Cleide S. Araújo, Edmar I. Melo, Vanessa N. Alves, Removal of Ag (I) Ions from Aqueous System Using Crushed Moringa Oleifera Lam. Seeds. *Talanta*. Janeiro de 2009.
- E.I. Melo, N.M.M. Coelho, D.A. Giarola, N.R. Pereira, D.B. Bittar, C.S. T. Araújo, J.S. Euqueres, H. C. Rezende. Avaliação do Uso de Indicadores Ácido-Base na Determinação Espectrofotométrica de Amônia em Água por Análise em Fluxo. Artigo em fase de revisão final.

8.2 Participação e trabalhos apresentados em congressos, simpósios e reuniões científicas

- ALVES, V.N.; ARAUJO, C.S.T.; MELO, E.I.; COELHO, N.M.M. Efeito de Contaminantes na Remoção de Prata em Águas Naturais utilizando Adsorventes Naturais. In: IV Encontro Nacional de Química Ambiental, 2008, Aracajú.
- MELO, E.I.; Gonzaga K.A.; Silva,T.R.P.; Aquino, A.R. Caracterização Físico-Química da Semente de Pinhão-Maso cultivado na Região de Santa Vitória-MG. In: Congresso Brasileiro de Agroenergia & Simpósio Internacional de Biocombustível, 2008, Uberlândia.
- MELO, E.I. ; AFONSO, A.S. ; RESENDE, H.C. ; COELHO, N.M.M. ; MADURRO, A.G.B.; MADURRO, J.M. Avaliação de Eletrodo de Grafite Modificado com Aminofenóis para Construção de Sensor a Base De AChE. In: XXI ENCONTRO REGIONAL SBQ-MG, 2007, UBERLÂNDIA. XXI ENCONTRO REGIONAL SBQ-MG, 2007.
- MELO, E.I. ; SILVA, P.E. ; DOUGLAS, D.E. ; COELHO, N.M.M. Determinação Proteínas Totais em Amostras de Clara de Ovo- Comparação de Métodos. In: XXI ENCONTRO DREGIONAL SBQ-MG, 2007, UBERLÂNDIA. XXI ENCONTRO DREGIONAL SBQ-MG, 2007.
- MELO, E.I.; AFONSO, A.S.; RESENDE, H.C.; COELHO, N.M.M.; MADURRO, A.G.B.; MADURRO, J.M. Biossensor Potenciométrico Baseado na Enzima Acetilcolinesterase sobre Poli(4-Aminofenol). In: 14 ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2007, JOÃO PESSOA-PB.
- MELO, E.I. ; Gonzaga K.A.; Souza, M.C.; Queiros, S.M.J.; Silva,T.R.P. Avaliação Preliminar do Teor de Ácidos Graxos Livres em Resíduos de Fritura

para Produção de Biodiesel. In: XXI Encontro Regional da SBQ, 2007, Uberlândia.

- MENEZES, D.H.; BORGES, L.F.A.; ALVES, V.N.; ARAUJO, C.S.T.; MELO, E. I.; COELHO, N.M.M. Remediação Química aplicada à Avaliação Microbiológica de Águas Tratadas. In: XXI Encontro Regional da SBQ, 2007, Uberlândia.
- MELO, E.I.; PEREIRA, N.R.; ALVES, V.N.; COELHO, L.M.; COELHO, N. M.M.; Frare, T.C. Avaliação De Vermicomposto Como Material Adsorvente De Ferro E Manganês. In: XX ENCONTRO REGIONAL SBQ-MG, 2006, SÃO JOÃO DEL-REI.
- MELO, E.I.; COELHO, N.M.M. Estratégias para o Ensino de Química Analítica Instrumental. In: XX ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-MG, 2006, SÃO JOÃO DEL-REI. XX ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-MG, 2006.
- MELO, E.I.; COELHO, N.M.M.; GIAROLA, D.A.; PEREIRA, N.R.; BITTAR, D.B.; ARAUJO, C.S.T.; EUQUERES, J.S.; RESENDE, H.C. Avaliação do Uso de Indicadores na Determinação Espectrofotométrica de Amônia em Água por Análise Em Fluxo. In: XX ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-MG, 2006, SÃO JOÃO DEL-REI. XX ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-MG, 2006.
- ALVES, V.N.; ARAUJO, T.R.; MELO, E.I. ; COELHO, L.M.; COELHO, N. M.M. Determinação de cromo utilizando a técnica do ponto Nuvem e detecção por FAAS. In: I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba IV mostra de Pós-Graduação III Jornada Científica de Química, 2006, Uberlândia. Livro de Resumo, 2006.

9 Referências Bibliográficas

ADELOJU S. B.; MOLINE A. N. Fabrication of ultra-thin polypyrrole–glucose oxidase film from supporting electrolyte-free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 133–139, **2001**.

AFONSO, A.S. Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção da hanseníase. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Pag. 40-41. **2008**.

AHMAD, F.; YUSOF, A.P. MD; BAINBRIDGE, M.; GHANI, S. AB. The application of glucose biosensor in studying the effects of insulin and anti-hypertensive drugs towards glucose level in brain striatum. *Biosensors & Bioelectronics*, 23, 1862–1868, **2008**.

ALLENDER, W.J.; MAJOR, E.J.; CRESSWELL, G. C. Measurement of acephate and its principal metabolite in leaves by gas-liquid chromatography. *Pesticide. Science.*, v. 35, 1, 91-94, **1992**.

AMVRAZI, E.G.; TSIROPOULOS, N.G. Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2789–2797, **2009**.

ANDREESCU S.; BARTHELMEBS L.; MARTY J.L. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 464, 171–180, **2002**.

ANDREOU, V.G.; CLONIS, Y.D. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol–gel entrapped bromocresol purple for in-field use. *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 61–69, **2002**.

ANH, T.M.; DZYADEVYCH, S.V.; SOLDATKIN, A.P.; CHIEN, N.D.; RENAULT, N.J.; CHOVELON, J.M. Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions. *Talanta*, 56, 627–634, **2002**.

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://www.anvisa.gov.br> acesso em 18 de dezembro de **2007**.

ARMSTRONG, F.A. Recent developments in dynamic electrochemical studies of adsorbed enzymes and their active sites. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 110–117, **2005**.

ARREBOLA, F.J.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; MATEU-SÁNCHEZ, M.; ÁLVAREZ-CASTELLÓN, F.J. Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography–chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 484, 167–180, **2003**.

ATKINS, P.W.; *Físico-Química*, 6a ed., LTC- Livros Técnicos e Científicos Ed. S.A. ; Rio de Janeiro, **1999**.

BAI, Y.; YANG, H.; YANG, W.; LI, Y.; SUN, C. Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction. *Sensors and Actuators B*, 124, 179–186, **2007**.

BARBERO, C.; SILBER, J.J.; SERENO, L. Electrochemical properties of poly-ortho-aminophenol modified electrodes in aqueous acid solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 291, 81-101, **1990**.

BARBERO, C.; SILBER, J.J.; SERENO, L. Formation of a novel electroactive film by electropolymerization of ortho-aminophenol. Study of its chemical structure and formation mechanism. *Electropolymerization of analogous compounds. Journal of Electroanalytical Chemistry*, 263, 333-352, **1989**.

BARBERO, C.; ZERBINO, J.; SERENO, L.; POSADAS, D. Optical properties of electropolymerized orthoaminophenol. *Electrochimica Acta*, 32(4), 693-697, **1987**.

BARCELÓ, D. Environmental protection-agency and other methods for the determination of pesticides and other transformation products in water. *Journal of Chromatography B*, 643, 117-143, **1993**.

BASSI, A.S.; TANG, D.; LEE, E.; ZHU, J.X.; BERGOUNOU, M. A. Biosensors in environmental and bioprocess monitoring and control. *Food Technology and Biotechnology*, 34, 1, 9-22, **1996**.

BLAEDEL, W.J.; JENKINS, R.A. Study of a reagentless lactate electrode. *Analytical Chemistry*, 48, 1240-1247, **1976**.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of Pesticides: potential risk for consumers, Trends Food Sci. tech., 11, 182, **2000**.

BONNET C.; ANDREESCU S.; MARTY J.L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Analytica Chimica Acta, 481, 209–211, **2003**.

BRETT, A.M.O; PIEDADE, J.A.P; DICULESCU, S.V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. Analytical Biochemistry. 332, 321, **2004**.

BRITO-MADURRO, A.G.; FERREIRA, L.F; VIEIRA, S.N.; GOULART, L.R. ; MADURRO, J.M. Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix. Journal of Materials Science, 42, 3238, **2007**.

BUCUR, B.; DANET, A. F.; MARTY,J.L. Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 20, 217–225, **2004**.

BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A.; MARTY,J.L. Biosensors Based on Highly Sensitive Acetylcholinesterases for Enhanced Carbamate insecticides Detection. Analytica Chimica Acta, v. 562, p. 115-121, **2006**.

BUENO, P.R.; CARVALHO, L.A.; ANDRADE, A.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. Química. Nova, 29, 4, 796-804, **2006**.

CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES G.S. BETTIOL, W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxico no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RACIONALIZAÇÃO DO USO DE PESTICIDAS NO CONE SUL; Campinas, SP, **1997**.

CARIDADE, C.G.; PAULIUKAITE, R.; BRETT, C.M.A. Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol. Electrochimica Acta, 53, 6732–6739, **2008**.

CARLINI, E.A.; NAPPO, S.A.; GALDURÓZ, J.C.F. Drogas psicotróficas- o que são e como agem. Revista IMES, 3 9-35, **2001**.

CASTRO, J.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of insecticides in soil by gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 918, 371–380, **2001**.

CATÁLOGO de produtos fitossanitários: organofosforados. Disponível em: http://www.basf.com.br/cat_eletron. Acesso em outubro de **2007**.

CENGİZ, M.F.; CERTEL, M.; GOÇMEN, H. Residue contents of DDVP (Dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry*, 98, 127–135, **2006**.

CHEMNITIUS, G.; MEUSEL, M.; ZABOROSCH, C.; KNOLL, M.; SPENER, F.; CAMMANN, K. Highly sensitive electrochemical biosensors for water monitoring. *Food Technology and Biotechnology*, 34, 1, 23-29, **1996**

CHEN, YI-I.; SU, YI-SONG; JEN, JEN-FON. Determination of dichlorvos by on-line microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 976, 349–355, **2002**.

CHRISTENSEN, H.B.; GRANBY, K. Method Validation for Strobilurin fungicides in Cereals and Fruit. *Foos Addit. Contam.* 18, 866, **2001**.

CLEMENTI, M.; CAUSIN, R.; MARZOCCHI C.; MANTOVANI A.; TENCONI, R. A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in northeast Italy. *Reproductive Toxicology* 24, 1–8, **2007**.

CODEX Alimentarius commission, <http://www.codexalimentarius.net>, acesso em janeiro de **2008**.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. *Introdução à bioquímica*, São Paulo: Edgard Blucher, p. 131-161, **1980**.

D’ORAZIO, P. D. Biosensors In Clinical Chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 334, 41, **2003**.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, 27, 4, 623-630, **2004**.

DE PAOLI, M. A; MAIA, D.J; ALVES, O. L. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. *Química Nova*, 23, 204, **2000**.

DECRETO Nº 4074, de janeiro de 2002, publicado no Diário Oficial de 08/01/**2002**.

DECRETO Nº 98.816 de janeiro de 1990, publicado no Diário Oficial em 11/01/**1990**.

DERYABINA, M.A.; YAKOVLEVA, Y.N.; POPOVA, V.A.; ERERNIN, S.A. Determination of the herbicide acetochlor by fluorescence polarization immunoassay. *Journal analytical Chemistry*, 60, 80-85, **2005**.

DI, J.; CHENG, J.; XU, Q.; ZHENG, H.; ZHUANG, J.; SUN, Y.; WANG, K.; MO, X.; BI, S. Direct electrochemistry of lactate dehydrogenase immobilized on silica sol-gel modified gold electrode and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 682-687, **2007**.

DRESCHER, W.; FIEDLER, L. Detection of residues of the insecticides acephate, dimethoate, methamidophos and omethoate in small amounts of nectar. *Chemosphere*, 12, 11-12, 1605-1610, **1983**.

DU, D.; CHEN, S.; CAI, J.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 130-134, **2007**.

EC - EUROPEAN COMISSION. Directorate General Health and Consumer Protection. Guidance document on residue analytical methods. Document SANCO /825, **2000**.

EKINCI, E.; KARAGOZLER, A.A.; KARAGOZLER, A.E. The preparation a sensor application of poly(p-Aminophenol). *Eletroanalysis*. 8, 571, **1996**.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95, **1961**.

EPA- Environmental protection Agency- Estados Unidos – www.epa.gov; acesso em 02 de janeiro de **2007**.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. Química Nova, São Paulo, 15, 1, 28-39, **1992**.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas de poluição ambiental. São Paulo, E.P.U., 196, **1980**.

FERNANDES, J.C.B.; KUBOTA, L.T.; NETO, G.O. Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane. Analytical Chimica. Acta, 385, 1, 3-12, **1999**.

FERREIRA, L.F.; MADURRO, J.M.; BOODTS, J.F.C.; MADURRO, A.G.B. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and na oligonucleotide. Polymer International, 57, 4, 644-650, **2008**.

FERRER, C.; GÓMEZ, M.J.; GARCÍA-REYES, J.F.; FERRER, I.; THURMAN, E.M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1069, 183–194, **2005**.

FOULDS, N.C.; LOWE, C.R. Immobilization of GOD in ferrocenemodified pyrrole polymers. Analytical Chemistry. 60, 2473–2478, **1988**.

FRANCO, D.L. Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 53-56. **2007**.

FRANCO, D.L.; MADURRO, J.M.; AFONSO, A.S.; VIEIRA, S.N.; FERREIRA, L.F.; GONÇALVES, R.A.; MADURRO, A.G.B. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: eletric and morphologic properties. Materials chemistry and Physics, 107, 404, **2008**.

FRENICH, A.G.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; CRUZ SICILIA, A.D.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, M.J.; PLAZA BOLAÑOS, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 558, 42–52, **2006**.

GABROVSKA, K.; NEDELICHEVA, T.; GODJEVARGOVA, T.; TOILOVA, O.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Immobilization of acetylcholinesterase on new modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55, 169–176, **2008**.

GADE, V.K.; SHIRALE, D.J.; GAIKWAD, P.D.; SAVALE, P.A.; KAKDE, K.P.; KHARAT, H.J.; SHIRSAT, M.D. Immobilization of GOD on electrochemically synthesized Ppy-PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *Reactive & Functional Polymers* 66, 1420–1426, **2006**.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.S. Utilização de Técnicas Eletroanalíticas na Determinação de Pesticidas em Alimentos. *Quim. Nova*, 29, 1, 105-112, **2006**.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARR, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: Ceres, p 649, **1988**.

GARGUILO, M.G.; HUYNH, N.; PROCTOR, A.; MICHAEL, A.C. Amperometric sensors for peroxide, choline, and Acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer *Analytical Chemistry*, 65, 523-528, **1993**.

GARJONYTE, R.; MALINAUSKAS, A.; Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized polypyrrole and poly(o-phenylenediamine) films on a Prussian Blue-modified electrode *Sensors and Actuators B*, 63, 122–128, **2000**.

GARP - ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. Validação de Métodos-Avaliação de Conformidade - Informativo técnico. São Paulo, 8, **2001**.

GAZETA MERCANTIL. Defensivos. (Suplemento Projetos de Mercado: Agronegócios, pág. 7 de 05/08/2004). In: Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola SINDAG). <http://www.sindag.com.br/new/noticias/interna.php?cod=585>. Acesso em 22 de novembro de **2006**.

GENG, P.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, W.; JIN, L.; FENG, Z.; WU, Z.; Rapid detection of *Escherichia coli* by flow injection analysis coupled with amperometric method using an IrO₂-Pd chemically modified electrode. *Electrochemistry Communications*, 9, 2157–2162, **2007**.

GENIÉS, E.M.; BOYLE, A.; LAPKOWSKI, M.; TSINTAVIS, C. Polyaniline: a historical survey. *Synthetic Metals*, 36, 139 -182, **1990**.

GIROTTI, E. M; DE PAOLI M.A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. *Química Nova*, 22, 3, 359, **1999**.

GONÇALVES, D.; FARIA, R.C.; YONASHIRO, B.; BULHÕES, L.O.S. Electrochemical oxidation of o-aminophenol in aqueous acidic medium: formation of film and soluble products. *J. Electroanal. Chem.* 487, 90–99, **2000**.

GRANBY, K.; ANDERSEN, J.H.; CHRISTENSEN, H.B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 520, 165–176, **2004**.

GUENBOURA, A.; KACEMIA, A.; BENBACHIRA, A.; ÁRIES, L. Electropolymerization of 2-aminophenol electrochemical and spectroscopic studies. *Prog. Org. Coat.*, 38, 121–126, **2000**.

HAI, A.; BEN-HAIM, D.; KORBAKOV, N.; COHEN, A.; SHAPPIR, J.; OREN, R.; SPIRA, M.E.; YITZCHAIK, S. Acetylcholinesterase–ISFET based system for the detection of acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 605–612, **2006**.

HAJOU, R.M.K.; AFIFI, F. U.; BATTAH, A. H.; Comparative determination of multi-pesticide residues in *Pimpinella anisum* using two different AOAC methods. *Food Chemistry* 88, 469–478, **2004**.

HANKS, A. R. Liquid-chromatographic method for determination of methamidophos in technical products and pesticides formulations: CIPAC collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 4, 698-700, **1992**.

HARRIS, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed. LTC-Livros Técnicos e Científicos Ed.: Rio de Janeiro, **2001**.

HARSAÂNYI, G. Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities. *Journal Sensor review*, 20, 98, **2000**.

HAWLWY, D.; ADAMS, R.N. Homogeneous chemical reactions in electrode processes: Measurement of rates of follow-up chemical reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 10, 376, **1965**.

HO, J.S.; TAMG, P.H. optimization of supercritical fluid extraction of environmental-pollutants fram a liquid solid extraction cartridge. *Journal of Chromatographic Science*, 30, 9, 344-350, **1992**.

HSIEH, H.V., PFEIFFER, Z.A., AMISS, T.J., SHERMAN, D.B., PITNER, J.B. Direct detection of glucose by surface plasmon resonance with bacterial glucose/galactose-binding protein. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 654–60, **2004**.

HUANG, J.; LI, J.; YANG, Y.; WANG, X.; WU, B.; ANZAI, J.; OSA, T.; CHEN, Q.; Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol–gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering C*, 28, 1070–1075, **2008**.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, revisão 01, março, **2003**.

INZELT, G.; PINERI, M.; SCHULTZE, J.W.; VOROTYNTSEV, M.A. Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. *Electrochim. Acta*. 45, 2403–2421, **2000**.

IPCS-International Programme on Chemical Safety. Fenitrothion. Disponível: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest30_e.htm. Acesso em 08 Setembro de **2007**.

IVANOV, A.N.; EVTUGYN, G.A.;GYURCSÁNYI, R.E.; TÓTH, K.; BUDNIKOV, H.C. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination *Analytica Chimica Acta*, 404, 55–65, **2000**.

IVNITSKII, D.M.; RISHPON, J. A potentiometric biosensor for pesticides based on the thiocholine hexacyanoferrate(III) reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 569, **1994**.

JACKOWSKA, K.; BUKOWSKA, J.; KUDELSKI, A. Electro-oxidation of o-aminophenol studied by cyclic voltammetry and surface enhanced Raman scattering (SERS). *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 350, 177-187, **1993**.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M.; DEVANEY, M. Chemical Sensors. *Analytical Chemistry*, 66, 12, 207-228, **1994**.

JHA, S. K.; TOPKAR, A. D'SOUZA, S. F. Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN). *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 1145-1150, **2008**.

KAMRIN, M.A. Pesticides profile: toxicity, environmental impact and fate. New York: Lewis, p.675, **1997**.

KAMYABI, M.A.; AGHAJANLOO, F. Electrocatalytic oxidation and determination of nitrite on carbon paste electrode modified with oxovanadium (IV)-4-methyl salophen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 614, 157-165, **2008**.

KANDELL, E.R.; SCHAWART, J.H.; JESSEL, T.M. Fundamentos da Neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Editra Guanabara Koogan, **2000**.

KAROUSOS, N.G.; AOUABDI, S.; WAY, A.S.; REDDY, S.M.; Quartz crystal microbalance determination of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 469, 189-196, **2002**.

KHAN, B.A.; FARID, A.; ASI, M.R.; SHAH, H.; BADSHAH, A.K. Determination of residues of trichlorfon and dimethoate on guava using HPLC. *Food Chemistry*, 114, 286-288, **2009**.

KIENTZ, C.E.; LANGENBERG, J.P.; DE JONG, G.J.; BRINKMAN, U.A.T. Microcolumn liquid chromatography of the enantiomers of organophosphorus pesticides with thermionic and ultraviolet detection. *Journal of High Resolution Chromatography*, 14, 7, 460-464, **1991**.

KORMOS, F.; SZIRÁKI, L.; TARSICHE, I. Potentiometric biosensor for urinary glucose level monitoring. *Laboratory Robotics and Automation*, 12, 6, 291-295, **2000**.

KOSHLAND, D.E., Jr. Effect of catalysts on the hydrolysis of acetyl Phosphate. nucleophilic displacement mechanisms in enzymatic reactions J. Am. Chem. Soc., 74, 2286, **1952**.

KOVAI, N.; PROSEN, H.; ZUPANI-KRALJ, L. Determination of triazines and atrazine metabolites in soil by microwave assisted solvent extraction and high pressure liquid chromatography with photodiode-array detection. Acta Chimica Slovenica, 51, 395-407, **2004**.

KUNIMURA, S.; OHSAKA, T.; OYAMA, N. Preparation of thin polymeric films on electrode surfaces by electropolymerization of o-aminophenol. Macromolecules, 21, 894-900, **1988**.

KURALAY, F.; OZYORUK, H.; YILDIZ A. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. Sensors and Actuators B, 109, 194–199, **2005**.

LAKARD, B.; HERLEM, G.; LAKARD, S.; ANTONIOU, A.; FAHYS, B. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. Biosensors and Bioelectronics, 19, 1641–1647, **2004**.

LAPUENTE, R.; CASES, F.; GARCES, P.; MORALLON, P.; VARQUEZ, J.L. A voltammetric and FTIR-ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium: Influence of sulfide. Journal of Electroanalytical Chemistry, 451, 163-171, **1998**.

LARTIGES, S.B.; GARRIGUES, P. Gas chromatographic analysis of organophosphorus and organonitrogen pesticides with different detectors. Analysis, 23, 8, 418-421, **1995**.

LASIA, A. Nature of the two semi-circles observed on the complex plane plots on porous electrodes in the presence of a concentration gradient. Journal of Electroanalytical Chemistry, 500, 30–35. **2001**.

LEANDRO, C.C.; HANCOCK, P.; FUSSELL, R.J.; KEELY, B.J. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1103, 94–101, **2006**.

LEHNINGER, A.L. Bioquímica: componentes moleculares das células. São Paulo: Ed. Edgar Blucher, p. 126-145, **1995**.

LI, Y.G.; ZHOU, Y.X.; FENG, J.L.; JIANG, Z.H.; MA, L.R.; Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 382, 277-282, **1999**.

LIAO C.W.; CHOU J.C., SUN T. P.; HSIUNG S.K.; HSIEH J.H. Preliminary investigations on a glucose biosensor based on the potentiometric principle *Sensors and Actuators B*, 123, 720–726, **2007**.

LIU, B.; YANG, Y.H., WU, Z.Y.; WANG, H.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. A potentiometric acetylcholinesterase biosensor based on plasma-polymerized film *Sensors and Actuators B*, 104, 186–190, **2005**.

LLASERA, M.P.G.; REYES-REYES, M.L. A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food Chemistry*, 114, 1510–1516, **2009**.

LOBO, R.F.M.; PEREIRA da SILVA, M.A.; RAPOSOS, M.; FARIA, R.M.; OLIVEIRA Jr, O.N. In situ thickness measurements of ultra-thin multilayer polymer films by atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 10, 389-393, **1999**.

LOFRANO, R.C.Z.; MADURRO, J.M.; ROMERO, J.R. Preparation and properties of an electrode coated with a cerium poly(allyl ether p-benzenesulfonate) film for electroorganic reactions. *J. Mol. Catalys. A: Chemical*. 153, 237-242, **2000**.

LOFRANO, R.C.Z.; MADURRO, J.M.; ABRANTES, L.M.; ROMERO, J.R. Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether p-(2-aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether. *Journal Molecular Catalysis A: Chemical*, 218, 73-79, **2004**.

LOFRANO, R.C.Z.; QUEIROZ, J.V.; ROMERO, J.R. Preparation and properties of electrode with platinum microcrystals dispersed in films of poly(allyl ether p-benzeneammonium derivatives). *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 174, 231-238, **2001**.

LONG, D.D; MARX, K.A; Amperometric hydrogen peroxide sensor electrode coated with electropolymerized tyrosine derivative and phenolic films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 501, 107, **2001**.

LUKE, M.A.; FROBERG, J.E.; MASUMOTO, H.T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58, 5, 1020-1026, **1975**.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em fevereiro de **2008**.

MARQUES, P.R.B.O.; NUNES, G.S.; SANTOS, T.C.R.; ANDREESCU, S.; MARTY, J.L. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*: application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 4, 825-832, **2004**.

MARTÍNEZ, R.C.; GONZALO, E.R.; CORDERO, B.M.; PAVÓN, J.L.P.; PINTO, C.G.; LAESPADA, E.F. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 902, 251-265, **2000**.

MARTORELL, D.; CÉSPEDES, F.; MARTÍNEZ-FÀBREGAS, E.; ALEGRET, S. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7,7,8,8-tetracyanoquino-dimethane-modified, graphite-epoxy biocomposite. *Analytica Chimica Acta*, 337, 305-313, **1997**.

MARTY, J.L.; GARCIA, D.; ROUILLON, R. Biosensors: potential in pesticides detection. *Trends. Analytical Chemistry*, 14, 7, 329-333, **1995**.

MATTERN, G.C.; SINGER, G.M.; LOUIS, J.; ROBSON, M.; ROSEN, J.D. Determination of several pesticides with a chemical ionization ion-trap detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 2, 402-407, **1990**.

MELLO L.D.; KUBOTA, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77, 237-256, **2002**.

MENEZES, H.A.; MAIA, G. Films formed by the electrooxidation of p-aminophenol (p-Aph) In aqueous medium: what do they look like? *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 586, 39, **2006**.

MERIC B.; KERMAN K.; OZKAN D.; KARA P.; ERENDOY S.; AKARCA U.S.; MASCINI, M, OZSOZ, M. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta*, 56, 46-837, **2002**.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. Die kinetik der invertinwirkung. *Brochem*, 49, 333-369, **1913**.

MILARDOVIC, S.; KEREKOVIC, I.; NODILO, M. A Novel Biamperometric Biosensor for Urinary Oxalate Determination Using Flow Injection Analysis. *Talanta*, 77, 222–228, **2008**.

MILIADIS, G.E.; TSIROPOULOS, P.G, High-Performance Liquid chromatography Determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 835, 113, **1999**.

MORAES, S.L.; REZENDEM. O.O.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C. Análise de Resíduos de Pesticidas em Tomates por cromatografia em camada Delgada. *Química Nova*, 25, 196, **2002**.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY R.W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. *Analytical Chemistry*, 47, 12, **1975**.

MOTOHASHI, N.; NAGASHIMA, H.; PÁRKANYI, C.; SUBRAHMANYAN,B.; ZHANG, G.W. Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. *Journal of Chromatography A*. 754, 333-346, **1996**.

MU, S. Electrochemical copolymerization of aniline and o-aminophenol. *Synthetic Metals*, 143, 259–268, **2004**.

MULCHANDANI, P.; MULCHANDANI, A.; KANEVA, I.; CHEN, W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 77–85, **1999**.

NAKABAYASHI, Y.; YOSHIKAWA, H. Amperometric biosensors for sensing of hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator. *Analytical Sciences*, 16, 609–613, **2000**.

NAKABAYSHI, Y.; WAKUDA, M.; IMAI, H. Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as electron transfer mediator. *Analytical Sciences*, 14, 1069–1077, **1998**.

NAKAMURA, Y.; TONOGAI, Y.; SEKIGUCHI, Y.; TSUMURA, Y.; NISHIDA, N.; TAKAKURA, K.; ISECHI, M.; YUASA, K.; NAKAMURA, M.; KIFUNE, N.; YAMAMOTO, K.; TERASAWA, S.; OSHIMA, T.; MIYATA, M.; KA, AKURA, Y. Multiresidue Analysis of 48 Pesticides in Agricultural products by capillary gás chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2508, **1994**.

NAVICKINE, S.; RIBEIRO, M.L. Procedimento Simplificado de extração para análise de Resíduos de Carbendazim em Uva por cromatografia Líquida de Alta eficiência. *Pesticidas, Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 10, 23, **2000**.

NORBERG, J.; SLOBODINIK, J.; VREULS, R.J.J.; BRINKMAN, U.A. T. Online solid-phase extraction-liquid chromatography for screening and quantification of organophosphorus pesticides in surface water. *Analytical Methods Instrumentals*, 2, 5, 266-276, **1995**.

NUNES, G.S.; JEANTY, G.; MARTY, J. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides comparative study. *Analytica Chimica Acta* 523, 107–115, **2004**.

NUNES, G.S. Métodos Imunoquímicos para análise de resíduos de pesticidas: uma revisão. *Revista Analytica*, 50-59, 10, **2004**.

NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L. Pesticidas: Uso, Legislação e Controle. *Pesticidas, Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 9, 31, **1999**.

NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L.; POLESE, L.; BARCELÓ, D. Comparison of different clean-up Procedures for the Determinations of N-Methylcarbamate Insecticides in vegetable matrices by high-performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Journal chromatografy A*, 795, 43, **1998**.

NÚÑES, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M.T. Capillary electrophoresis mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. *Journal chromatografy A*, 974, 243, **2002**.

OBANA, H.; KIKUCHI, M.; OKIHASHI, M.; HORI, S. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst*, 122, 3, 217-220, **1997**.

OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSU, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fluits by high-performance liquid chromatography with diode-Array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4464, **2002**.

OGAWA, K.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; NAKAHARA, T.; KOKUFUTA, E. Coimmobilization of gluconolactonase with glucose oxidase for Improvement in Kinetic Property of enzymatically induced volume collapse in ionic gels. *Biomacromolecules*, 3, 625-631, **2002**.

OGAWA, K.; WANG, B.; KOKUFUTA, E. Enzyme-regulated microgel collapse for controlled membrane permeability. *Langmuir*, 17, 4704-4707, **2001**.

ORTEGA, J.M. Conducting potential range for poly-o-aminophenol. *Thin Solid Films*, 371, 28-35, **2000**.

PAN, D.; CHEN, J.; YAO, S.; NIE, L.; XIA, J.; TAO, W. Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at copper-modified gold electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 104, 68-74, **2005**.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, 25, 1012-1021, **2002**.

PEREZ, M.; ALARIO, J.; VAZQUEZ, A.; VILLÉN J. Pesticide Residue Analysis by off-line SPE and on-line reversed-phase LC-GC using the through-oven-transfer adsorption/desorption interface. *Analytical Chemistry*, 72 (4), 846-852, **2000**.

PERSSON, B.; LAN, H.L.; GORTON, L.; OKAMOTO, Y.; HALE, P.D.; BOGUSLAVSKY, L.I.; SKOTHEIM, T. Amperometric biosensors based on electrocatalytic regeneration of NAD^+ at redox polymer-modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 8, 81-88, **1993**.

PEDROTTI, J.J.; ANGNES, L.; GUTZ, I.G.R.; Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. *Electroanalysis*, 8, 673, **1996**.

POGHOSSIAN, A.; YOSHINOBU, T.; SIMONIS, A.; ECKEN, H.; LUTH, H.; SCHONING, M.J. Penicillin detection by means of field-effect based sensors: EnFET, capacitive EIS sensor or LAPS? *Sensors and Actuators B*, 78, 237-242, **2001**.

POSADAS, D.; TUCCERI, R.I.; BARBERO, C.; SILBER, J.J.; SERENO, L. Spectroelectrochemical study of poly-o-aminophenol. *Electrochimica Acta*, 42(6), 919- 927, **1997**.

RAHMAN, MD.A.; SUN LEE, K.; SU PARK, D.; WON, M.S.; SHIM, Y.B. An amperometric bilirubin biosensor based on a conductive poly-terthiophene–Mn(II) complex. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 857–864, **2008**.

RAJESH, V.; BISHT, V; TAKASHIMA, W.; KANETO, K. Development of potentiometric urea biosensor based on copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Reactive and Functional Polymers*, 62, 1, 51-59, **2005**.

RASTRELLI, L.; TOTARO, K.; SIMONE, F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chemistry*, 79, 303–305, **2002**.

REHER, S.; LEPKA, Y.; SCHWEDT, G. The potentiometric biosensor acetylcholine esterase as a model system. *Microchimica Acta*, 140, 15-20, **2002**.

RINKEN T.; RIIK, H. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 66, 13–21, **2006**.

ROSATTO, S.S.; KUBOTA, L.T.; OLIVEIRA, G. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Analytica Chimica Acta*, 390, 65-72, **1999**.

ROTARIU, L.; BALA, C.; MAGEARU, V. New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Anal. Chim. Acta*, 513, 119-123, **2004**.

SALAVAGIONE, H.J.; ARIAS, J.; GARCES, P.; MORALLON, E.; BARBERO, C.; VAZQUEZ, J.L. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 565, 375–383, **2004**.

SANKARAPAPAVINASAM, S. Kinetics and mechanism of electropolymerization of m-aminophenol. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31, 1105-1109, **1993**.

SANTOS, A.S.; FREIRE, R.S.; KUBOTA, L.T. Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547, 135-142, **2003**.

SANTOS, W.T.P; CEOLIN, M.P.; ALBUQUERQUE, Y.D.; RICHETER, E.M. Uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas de análises em fluxo. *Química Nova*, 30, 7, 1754-1758, **2007**.

SAURINA, J.; CASSOU, S. H.; ALEGRET, S.; FABREGAS, E. Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 67-75, **1999**.

SAURINA, J.; CASSOU, S. H.; ALEGRET S.; FABREGAS, E. Potentiometric biosensor for lysine analysis based on chemically immobilized lysine oxidase membrane. *Analytica Chimica Acta*, 371, 49-56, **1998**.

SHELLER, F.; SCHUBERT, F.; PFEIFFER, D.; HINTSCHE, R.; DRANSFELD, I.; RENNEBERG, R.; WOLLENBERG, U.; RIEDEL, K.; PAVLOVA, M.; KÜHN, M. Research and development of biosensors. A review. *Analyst*, 114, 653-662, **1989**.

SCHEPER, T. H.; HILMER, J. M.; LAMMERS, F.; MÜLLER, C.; REINECKE, M. Biosensors in bioprocess monitoring. *Journal Chromatography A*, 725, 1, 3-12, **1996**.

SCHÖNING, M.J.; KRAUSE R.; BLOCK, K.; MUSAHMEH, M.; MULCHANDANI, A.; WANG J. A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides. *Sensors and Actuators B*, 95, 291-296, **2003**.

SCHULZE, H.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; VORLOVA, S.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T.T. Development, validation, and application of an acetylcholinesterase biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 1095-1105, **2002**.

SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E.J.; MACDIARMID, A.G.; CHIANG, C.K.; HEEGER, A.J. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 16, 578, **1977**.

SHULGA, O.; KIRCHHOFF, J.R. An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. Electrochemistry Communications, 9, 935–940, **2007**.

SILVA, M.; GULNAR, A.E. Measuring exposure to organochlorinated pesticides. Caderno de Saúde Pública, 14, 3, 177-179, **1998**.

SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola - <http://www.sindag.org.br> acessado em outubro de **2006**.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; Fundamentals of Analytical Chemistry, 6^a ed., Saunders College Pub.: Fort Worth, **1992**.

SOLER, C.; MAÑES J.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. Journal of Chromatography A, 1048, 41–49, **2004**.

STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.F.; ABOUL-ENEIN H.Y. Determination of S-perindopril using a flow injection system with an amperometric biosensor. Sensors and Actuators B, 54, 261–265, **1999**.

STEFAN, R.I.; BALA, C.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Biosensor for the enantioselective analysis of S-captopril. Sensors and Actuators B, 92, 228–231, **2003**.

TAJ, S.; AHMED; M. F; SANKARAPAPAVINASAM, S. Poly(para-aminophenol): anew soluble, electroactive conducting polymer. Journal of Electroanalytical Chemistry, 338, 347, **1992**.

TAO, W.; LIU, Y.; PAN, D.; NIE, L.; YAO, S. Study on the enhancement of catalytic activity for hemoglobin by quinhydrone in poly(o-aminophenol) film. Bioelectrochemistry, 65, 51-58, **2004**.

THERMO SCIENTIFIC. <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683>, acessado em 22 de julho de **2008**.

THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 121–131, **2001**.

THIER, H.P.; ZEUMER, H. Manual of pesticide analysis, v.1 Pesticides Commission, DEG, VCH, Fed. Rep. Germany, 432, **1987**.

TINKILIC, N.; CUBUK O.; ISILDAK I. Glucose and urea biosensors based on all solid-state PVC–NH₂ membrane electrodes *Analytica Chimica Acta*, 452, 29–34, **2002**.

TORES, C.M.; PICÓ, Y; MAÑES, J. Determination of Pesticides Residues in Fruits and Vegetables. *Journal Chromatography A*, 754, 301, **1996**.

TRAN-MINH, C.; PANDEY, P.C.; KUMARAN S. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*, 5, 461–471, **1990**.

TREVISAN, L.R.P. Resíduos de Acefato, de seu metabólito metamidofós e de Clorotalonil em cultura protegida de tomate (*lycopersicon esculentum* Mill) e de campo. Tese (doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, **2002**.

TUCCERI, R.I. Surface resistance measurements on thin gold film electrodes coated with poly(o-aminophenol) films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 505, 72–84, **2001**.

TUCCERI, R.I. The change of the electron scattering at the gold film–poly(o-aminophenol) film interface after partial degradation of the polymer film: its relation with the electron transport process within the polymer film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 562, 173–186, **2004**.

UMANA, M.; WALLER, J. Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system. *Analytical Chemistry*, 58, 2979–2983, **1986**.

VAKUROV, A.; SIMPSON, C.E.; DALY, C.L.; GIBSON, T.D.; MILLNER, P.A. Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1118–1125, **2004**.

VALDÉS-RAMÍREZ, G.; FOURNIER, D.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; MARTY, J.L. Sensitive amperometric biosensor for dichlorvos quantification: Application to detection of residues on apple skin. *Talanta*, 74, 741–746, **2008**.

VAMVAKAKI V.; CHANIOTAKIS N.A. Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2650–2655, **2007**.

VAN DER HOFF, G.; VAN ZOONEN, P. Trace analysis of pesticides by gás chromatography. *Journal Chromatografy A*, 843, 1-2, 301-322, **1999**.

VAN ZOONEN, P. (Ed.). Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs. Multi-residue method -Part 1. Inspectorate for Health Protection. 6th ed, **1996**.

VENKATESWARLU P.; MOHAN K.R.; KUMAR Ch.R.; SESHIAIAH K. Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105, 1760–1766, **2007**.

VIEIRA, S.N; AFONSO, A.S; MADURRO, A.G.B; FERREIRA, L.F; ARIZA, R.G; FILHO, L.R.G; MADURRO, J.M. Electrochemical Modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). *Macromolecular Symposio*, 236, 246, **2006**.

VILLAR, N.G.; SAURINA, J.; CASSOU, S.H. Flow injection differential potentiometric determination of lysine by using a lysine biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 477, 315–324, **2003**.

WALLACE G.G.; SMYTH M.; ZHAO H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 245-251, **1999**.

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

WANG J.; ZHANG, C.; WANG, H.; YANG, F.; ZHANG, X. Development of a luminol-based chemiluminescence flow-injection method for the determination of dichlorvos pesticide. *Talanta*, 54, 1185–1193, **2001**.

WANG, J.; KRAUSE, R.; BLOCK, K.; MUSAMEH, M.; MULCHANDANI, A.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; SCHÖNING M.J. Dual amperometric–potentiometric biosensor detection system for monitoring organophosphorus neurotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 469, 197–203, **2002**.

WANG, J.Q.; CHOU J.C.; SUN, T.P.; HSIUNG S.K.; HSIUNG G.B. pH-based potentiometrical flow injection biosensor for urea. *Sensors and Actuators B*, 91, 5–10, **2003**.

WANG, Q.; LU, G.; YANG, B. Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by a silica sol–gel film. *Sensors and Actuators B*, 99, 50–57, **2004**.

WASSER C.R.; KAVALALI E.T. Leaky synapses: Regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses, *Neuroscience*, 10.1016/j.neuroscience.2008.03.028, **2008**.

WILKINS, E.; CARTER, M.; VOSS, J.; IVNITSKI, D. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents. *Electrochemistry Communications*, 2, 786–790, **2000**.

WYLIE, P.L.; UCHYAMA, K. Improved gas-chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection. *Journal of AOAC International*, 79, 2, 571–577, **1996**.

XIANG-QIN, L.; GUANG-FENG, K.; YING, C. A Nafion and choline bi-layer modified carbon fiber electrode for in-vivo detection of dopamine in mouse cerebrum. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36, 157–161, **2008**.

XIAO,Q.; HU, B.; YU, C.; XIA, L.; JIANG, Z. Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. *Talanta*, 69, 848–855, **2006**.

YANG, G.; WANG, C.; ZHANG, R.; WANG, C.; QU, Q.; HU, X. Poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode for determination of isoniazid in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 73, 37–42, **2008**.

YANG, L.; WANG, B.; LONG, C.; WU, G.; ZHENG, H. Increased Asynchronous release and aberrant calcium channel activation in amyloid precursor protein deficient neuromuscular synapses. *Neuroscience*, 149, 768–778, **2007**.

YING-SING, F.; SHI-HUI, SI.; DE-RONG, Z. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. *Talanta*. 51, 151–158, **2000**.

YOKOMIZO, Y.; LARA, W.H.; PUGA, F.; BAPTISTA, G.C.; CARVALHO, P.R.N.; BARRETO, H.C.; MALTONE, C.A.; DOECE, M. Resíduos de Pesticidas em Alimentos. Campinas – Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, p.13, **1985**.

ZENG, K.; TACHIKAWA, H.; ZHU,Z.Y.; DAVIDSON, V.L. Amperometric detection of histamine with a methylamine dehydrogenase polypyrrole-based sensor. *Analytical Chemistry*, 72, 2211-2215, **2000**.

ZHANG, J.; SHAN, D.; MU, S. Electrochemical copolymerization of aniline with m-aminophenol and novel electrical properties of the copolymer in the wide pH range. *Electrochimica Acta*, 51, 4262–4270, **2006**.

ZHU, L.Y.; EE, K.H.; ZHAO, L.M.; LEE, H.K. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquidliquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane. *Journal Chromatografy A*, 963, 335-343, **2002**

ZONG-MAO, C.; YUN-HAO, W. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 754, 367-395, **1996**.

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