

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

*Desenvolvimento de sistema biomimético para
análise de 3,5,6-Tricloro-2-piridinol, o principal
metabólito do clorpirifós*

André Luiz dos Santos

Dissertação de Mestrado
2012



Instituto de Química

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIOMIMÉTICO PARA
ANÁLISE DE 3,5,6-TRICLORO-2-PIRIDINOL, O PRINCIPAL
METABÓLITO DO CLORPIRIFÓS

ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado

2012

ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIOMIMÉTICO PARA ANÁLISE DE 3,5,6-TRICLORO-2-PIRIDINOL, O PRINCIPAL METABÓLITO DO CLORPIRIFÓS.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S237d Santos, André Luiz dos
Desenvolvimento de sistema biomimético para análise de 3,5,6-Tricloro-2-piridinol, o principal metabólito do clorpirifós / André Luiz dos Santos . – Araraquara : [s.n], 2012
97 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

1. Química analítica. 2. Sensor biomimético . 3. Polímero molecularmente impresso. I. Título.

ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS

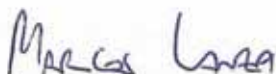
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 22 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza
Instituto de Química – USP, São Carlos - SP



Profª Drª Rosa Amália Fireman Dutra
Universidade Federal de Pernambuco– UFP, Recife - PE

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: André Luiz dos Santos

Nascimento: 26/04/86

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Araraquara-SP

Estado Civil: Casado

Filiação: André Pereira dos Santos e Aparecida de Souza Santos

Endereço: Rua: Miguel Veltri, 197, Bairro Jardim Itabapuã CEP: 14810-090
Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação: Licenciatura em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 03/2004 a 07/2010

2.2 Pós-graduação: Mestrado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 08/2010 a 10/2012

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

3.1. André L. Santos, Eduardo C. Figueira e Maria D.P.T. Sotomayor, “Desenvolvimento de sensor biomimético para análise de 3,5,6-Tricloro-2-piridinol o principal metabólito do clorpirifós”, XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado entre 28/08/2011 e 01/09/2011, em Bento Gonçalves – RS.

Eu Dedico este trabalho...

A todos que conviveram comigo nesse período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha esposa Morgana meus pais André e Aparecida a meu irmão Lucas meus amigos Ademar, Diego, Eduardo, Elsa, Marcos, Mayara, Maricely, todos os integrantes do grupo de eletroanalítica, todos os funcionários do IQ e principalmente a minha orientadora Prof^a Dra. Maria Del Pilar.

A todos, muito obrigado.

"Ser solidário com Deus é saber procurar o Pai no silêncio do coração, e quando senti-lo plenamente guardar a paz para depois oferecê-la aos sofredores do caminho"

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O presente trabalho está baseado no desenvolvimento de um sistema biomimético para monitoramento sensível e seletivo do metabólito TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), proveniente do agrotóxico clorpirifós, o qual é mais solúvel que o próprio agrotóxico e cuja ocorrência em águas subterrâneas e superficiais é mais provável e perigosa. Foi construído um sensor biomimético com detecção voltamétrica por onda quadrada, os eletrodos, foram confeccionados à base de pasta de carbono modificada com o complexo cloro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina ferro (III), o qual apresenta uma estrutura química semelhante à do sítio ativo da enzima P450. O sensor construído apresentou as melhores respostas em tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ e pH 6,0, usando a voltametria de onda quadrada a 50 Hz, 150 mV de amplitude e 1,5 mV de ΔE. Com os parâmetros otimizados o sensor apresentou limites de detecção e de quantificação de 1,9 e 5,2 μmol L⁻¹, respectivamente. Estudos realizados para averiguar a biomimetecidade do sensor, incluíram: velocidade de varredura por voltametria cíclica, exploração do perfil hiperbólico da resposta no sensor e avaliação da seletividade. O sensor foi satisfatoriamente usado na análise em diversos tipos de amostras de interesse ambiental. Foram feitos testes de recuperação e nas amostras de solo, águas superficiais e subterrâneas obtendo recuperação de 91%, 107% e 96% respectivamente, mostrando que o sensor pode ser usado como método alternativo para quantificação de TCP em diferentes matrizes. O sensor também foi empregado no monitoramento da eficiência de polímeros de impressão molecular (MIP) para TCP. Buscando obter o polímero biomimético mais eficiente para o analito, foram usadas ferramentas computacionais que permitiram escolher o melhor monômero (acrilonitrila). Para verificar os resultados obtidos pela simulação teórica, foram realizados experimentos de afinidade, que consistiram no monitoramento da capacidade de ligação do analito ao MIP e ao seu correspondente NIP (polímero sem impressão molecular), utilizando o sensor biomimético desenvolvido e como método de referência a espectrofotometria. Os resultados obtidos, embora preliminares, mostraram que o MIP (retenção de 57% de TCP) é mais eficiente em relação à ligação/extração, que seu respectivo NIP (13% de retenção) para uma massa de polímeros de 20 mg e inicial de analito em solução de 7,94 x 10⁻⁵ g. Os resultados obtidos estão em concordância com o método de referência. Desta forma, conclui-se que o sensor biomimético desenvolvido neste trabalho mostrou-se sensível, eficiente e seletivo para monitoramento do TCP em diversos tipos de amostras e para diversas aplicações, como no caso de monitoramento da eficiência de um MIP.

Palavras-chave: 3,5,6-tricloro-2-piridinol, clorpirifós, sensor biomimético, polímero molecularmente impresso.

ABSTRACT

This work is based on developing a biomimetic system for sensitive and selective monitoring of the TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), the principal metabolite of the pesticide chlorpyrifos, which is more soluble than the pesticide and whose occurrence in groundwater and surface water is more likely and dangerous. For this, a biomimetic sensor was constructed and the square wave voltammetric was used for measurements. The electrodes were fabricated using carbon paste modified with the complex chloro-5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphyrin iron(III), which has a chemical structure similar to the active site of the enzyme P450. The sensor presented the best responses in phosphate buffer 0.20 mol L⁻¹ and pH 6.0, using the square wave voltammetry with 50 Hz, amplitude of potential of 150 mV and ΔE of 1.5 mV. With the optimized parameters the sensor showed limits of detection and quantification of 1.9 and 5.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Studies conducted to investigate the mimicking of the sensor, included evaluation of the influence on scan rate in the cyclic voltammetry, the verification of the hyperbolic profile of the sensor response and evaluation of selectivity. The sensor has been satisfactorily applied in the analysis of different samples of environmental interest. Recovery experiments in samples of soil, surface water, and groundwater showed values of 91%, 107% and 96% respectively, showing that the sensor can be used as an alternative method for the quantification of TCP in different matrices. The sensor was also used to monitor the efficiency of molecularly imprinted polymers (MIP) for TCP. In order to obtain the most efficient biomimetic polymer to this analyte were used computational tools that allowed select the best monomer (acrylonitrile). In order to verify the results obtained by the theoretical simulation, were performed affinity experiments, which consisted in monitoring the binding ability of the analyte to the MIP and its corresponding NIP (non-imprinted polymers), and for this, was used the biomimetic sensor and like reference method the spectrophotometry. The results, although preliminary, have shown that MIP (57% retention TCP) is more effective for the binding/extraction than its respective NIP (13% retention) for a mass of polymers of 20 mg and of the analyte in solution of 7.94×10^{-5} g. These results are in agreement with the reference method. Thus, could be concluded that the biomimetic sensor developed in this work was sensitive, efficient and selective for monitoring TCP in various kinds of samples and for several applications, such as in monitoring the effectiveness of a MIP.

Keywords: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, chlorpyrifos, biomimetic sensors, square wave voltammetry, molecularly imprinted polymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Divisão das bacias hidrográficas do estado de São Paulo	26
Figura 2:	Localização do aquífero Guarani	27
Figura 3:	Localização do aquífero Bauru	28
Figura 4:	Fórmula estrutural do Clorpirifós	29
Figura 5:	Mecanismo de Hidrolise do Clorpirifós	30
Figura 6:	Metabólito minoritário do clorpirifós a TMP	31
Figura 7:	Reação da oxidação parcial do clorpirifós	31
Figura 8:	Publicações relacionadas à determinação de TCP	32
Figura 9:	(A) Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (B) e de um sistema irreversível (C)	38
Figura 10:	Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450	41
Figura 11:	Estrutura química do complexo cloro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porfirina ferro (III) [TKFPcFe].	41
Figura 12:	Esquema representativo do processo de síntese de MIP	43
Figura 13:	Fotografia de uma localidade do rio Tietê que corresponde à região do rio após a barragem da cidade de Barra Bonita	48
Figura 14:	(A) Fotografia da entrada do instituto florestal de Araraquara localidade em que se encontra a (B) nascente de onde foi retirada a amostra de água	48
Figura 15:	Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor	51
Figura 16:	Resultados obtidos da média das energias liberadas na formação do MIP do TCP. No destaque MP8 (acrilonitrila) o melhor monômero sugerido pela simulação computacional.	52
Figura 17:	Desenho representativo da preparação dos polímeros molecularmente impressos.	53
Figura 18:	Aparelhagem para lavagem dos polímeros. (A) NIP à esquerda e MIP à direita no processo lavagem através do refluxo por Soxhlet.	54

	(B) detalhe de como o sólido é armazenado no processo na forma de cartuchos preparados com papel de filtro	
Figura 19:	Representação do sistema de análise (A) Esquema representativo e (B) Fotografia da aparelhagem	56
Figura 20:	Voltamogramas de onda quadrada registrados para o EPC (A) e EPCM (B) com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em: Solução tampão Britton Robson (B.R.) $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5); $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento = 1,5 mV. Varredura iniciando em 1,1V até -0,7V.	58
Figura 21:	Voltamogramas cíclicos para o EPC na presença de TCP. Medidas realizada em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e velocidade de varredura (v) de 10 mV s^{-1} . Varredura efetuada entre iniciando em 1,1V à -0,7V	59
Figura 22:	Voltamogramas cíclicos para o EPC na presença de TCP. Medidas realizada em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e velocidade de varredura (v) de 10 mV s^{-1} . Varredura efetuada entre -0,7V à 1,1V	60
Figura 23:	Perfil de resposta do sensor na ausência de oxigênio. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; frequência de 50 Hz. A eliminação do O_2 foi realizada borbulhando N_2 na cela de medida durante 20 min. Varredura iniciando em 1,1V até -0,7V.	62
Figura 24:	Perfil de resposta do sensor na ausência de oxigênio. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; frequência de 50 Hz. A eliminação do O_2 foi realizada borbulhando N_2 na cela de medida durante 20 min. Varredura iniciando em 1,1V até -0,7V.	62
Figura 25:	Perfil da sensibilidade apresentada pelo sensor proposto em função do pH. Medidas realizadas em tampão B.R. $0,08 \text{ mol L}^{-1}$.	63
Figura 26:	Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão B.R. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento=1,5 mV. Varredura efetuada iniciando em 1,1V à -0,7V.	64
Figura 27:	Curva analítica referente aos voltamogramas representados na Figura 26.	65

Figura 28:	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do tipo de tampão. Medidas realizadas em tampões $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 20,0 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV , incremento = $1,5 \text{ mV}$.	65
Figura 29:	Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH $6,0$; $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento= $1,5 \text{ mV}$. Varredura efetuada iniciando em $1,1\text{V}$ à $-0,7\text{V}$.	65
Figura 30:	Curva analítica referente aos voltamogramas representados na Figura 29.	66
Figura 31:	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão fosfato.	66
Figura 32:	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da frequência. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH $6,0$; amplitude = 150 mV e incremento = $1,5 \text{ mV}$.	67
Figura 33:	Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH $6,0$; $f = 50 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento = $1,5 \text{ mV}$.	68
Figura 34:	Curva analítica referente aos voltamogramas representado na Figura 34	68
Figura 35:	Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH $6,0$; $f = 50 \text{ Hz}$, amplitude = 300 mV e incremento = $1,5 \text{ mV}$. Varredura efetuada iniciando em $1,1 \text{ V}$ à $- 0,7 \text{ V}$.	69
Figura 36:	Curva analítica referente aos voltamogramas representado na Figura 35.	70
Figura 37:	Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP nas condições otimizadas. Varredura efetuada iniciando em $1,1 \text{ V}$ à $0,7 \text{ V}$.	71
Figura 38:	Curva analítica obtida com os voltamogramas da Figura 39.	72
Figura 39:	Gráfico obtido, mostrando a estimativa do tempo de vida do sensor proposto. A porcentagem no eixo "Y" refere-se ao valor da sensibilidade no primeiro dia do estudo.	73
Figura 40:	Estruturas químicas do TCP e dos agrotóxicos avaliados no estudo da seletividade do sensor.	75

Figura 41:	Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para cálculo da K_{MM}^{app} .	76
Figura 42:	Voltamogramas cíclicos para varreduras efetuadas em diferentes velocidades. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,0) com concentração de TCP de 1,05 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ .	77
Figura 43:	Variação da corrente de pico catódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de ferro e na presença do TCP. Indicando que o movimento do analíto até a superfície do eletrodo é controlado por difusão. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,20 mol L ⁻¹ (pH 6,0) concentração de TCP de 1,05 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ .	78
Figura 44:	Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Indicando um perfil catalítico. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,20 mol L ⁻¹ (pH 6,0) concentração de TCP de 1,05 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ .	78
Figura 45:	Voltamogramas (A) adições sucessivas de TCP (B) adição da amostra problema. Medidas realizadas f = 50 Hz, amplitude = 150 mV e $\Delta E = 1,5$ mV. Varredura efetuada iniciando em 1,1V à 0,7V.	80
Figura 46:	Curva analítica referente ao voltamograma da Figura 45(A).	81
Figura 47:	Absorbância em relação ao comprimento de onda com sucessivas adições de TCP	85
Figura 48:	Curva analítica referente aos dados da Figura 47.	86
Figura 49:	Espectros obtidos para as amostras dos sobrenadantes do MIP (A) e do NIP (B)..	87
Figura 50:	Porcentagem em massa de TCP aderida em relação massa de TCP adicionada.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Alguns dos principais grupos, funções e classes de pesticidas.	23
Tabela 2:	Classificação toxicológica dos inseticidas pelo ministério da saúde.	24
Tabela 3:	Propriedades físicas e químicas do clorpirifós.	29
Tabela 4:	Estudos realizados com EQMs.	34
Tabela 5 :	Métodos utilizados para a introdução de um agente modificador sobre eletrodo base.	34
Tabela 6:	Agrotóxicos analisados no estudo da seletividade.	74
Tabela 7:	Dados obtidos na cela de medida na recuperação de TCP em amostras de solo enriquecidas.	79
Tabela 8:	Dados obtidos na recuperação de TCP em amostras de água superficial.	82
Tabela 9:	Dados obtidos na recuperação de TCP em amostras de água subterrânea.	82
Tabela 10:	Comparação da eficiência do MIP frente ao NIP.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ONU	Organização das nações unidas
Abiquim	Associação brasileira da indústria química
DDT	<i>Dicloro-difenil-tricloroetano</i>
Anvisa	Agencia nacional de vigilância sanitária
Conama	Conselho nacional do meio ambiente
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (inglês: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>).
IBAMA	Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência (inglês: <i>hplc high-performance liquid chromatography</i>)
CG	<i>cromatografia gasosa</i>
OF	<i>Organofosforados</i>
AChE	Acetilcolinesterase
SNC	Sistema nervoso central
ACh	<i>Acetilcolina</i>
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridinol
TMP	3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina
VC	voltametria cíclica
E_{Pc}	Potencial de pico catódico
E_{Pa}	Potencial de pico anódico
I_{Pc}	corrente de pico catódica
I_{Pa}	corrente de pico anódica
VOQ	voltametria de onda quadrada
EQM	eletrodo quimicamente modificado
EPC	eletrodo de pasta de carbono
P450	citocromo p450
TKFPcFe	cloro-5,10,15,20-tetra $quis$ (pentafluorofenil)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porfirina ferro (III)
MIP	polímeros de impressão molecular

NIP	polímeros não impresso – polímero de controle
B.R.	Tampão Britton-Robson
Tris	<i>tris</i> (hidroxi-metil)aminometano
PIPES	Tampão piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico)
EDGM	etilnoglicol dimetacrilato
AIBN	<i>2,2'-azo-bis</i> -isobutironitrila
EC	mecanismo com etapa eletroquímica seguida de etapa química
UV	ultra-violeta

Lista de Símbolos

i – corrente elétrica

V – Volts

v - velocidade de varredura

μ – micro

A – ampères

t – tempo

$^{\circ}C$ – graus Celsius

Ω - ohm

σ - desvio padrão

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Aspectos gerais	20
1.2.	Agrotóxicos	21
1.2.1.	Impacto da poluição por agrotóxicos na região de Araraquara	25
1.2.2.	Organofosforados “Clorpirifós”	28
1.3.	Métodos de determinação de TCP	31
1.4.	Eletrodos quimicamente modificados	33
1.4.1.	Eletrodo de pasta de carbono	35
1.4.2.	Técnicas eletroanalíticas	36
1.4.2.1.	Voltametria	36
1.4.2.2.	Voltametria cíclica	37
1.4.2.3.	Voltametria de onda quadrada	38
1.5.	Sensores eletroquímicos	39
1.5.1.	Sensores e catalisadores biomiméticos	40
1.6.	Polímeros de impressão molecular – MIPS	42
2.	OBJETIVOS	45
3.	PARTE EXPERIMENTAL	46
3.1.	Instrumentação básica	46
3.2.	Reagentes e soluções	46
3.2.1.	Preparo das soluções utilizadas	47
3.3.	Construção do sensor biomimético à base de pasta de carbono modificada	49
3.4.	Síntese dos MIPs e NIPs	51
3.5.	Medidas eletroquímicas	55
3.6.	Medidas espectrofotométricas	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1.	Sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo [TkfPcFe]	57
4.1.1.	Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos voltamétricos	57
4.1.2.	Otimização da resposta do sensor	63

4.1.3. Características Analíticas do sensor	71
4.1.4. Estudos relacionados à resposta biomimética do sensor.	74
4.1.4.1. Cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten, através do gráfico do duplo recíproco.	74
4.1.4.2. Avaliação da seletividade do sensor	75
4.1.4.3. Caracterização eletroquímica do sensor usando voltametria cíclica	77
4.1.5. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras de interesse ambiental.	79
4.1.5.1. Análise de solos	79
4.1.5.2. Análise de águas superficiais	81
4.1.5.3. Análise de águas subterrâneas	82
4.2. Análises de acompanhamento do desempenho dos MIPs e NIPs usando o sensor desenvolvido e comparação com método de referência	83
5. CONCLUSÕES	89
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	90
7. REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Ao final do ano de 2011, éramos aproximadamente 7 milhões de humanos povoando o planeta, segundo recente estudo da ONU. O mesmo estudo prevê um crescimento populacional de 33% para os próximos 39 anos, sendo assim, a população mundial em 2050 alcançaria o número de 9,3 bilhões de humanos habitando a terra¹.

Correlacionado com o crescimento populacional está a demanda por alimentos, será necessário dobrar a produção agrícola mundial até o ano de 2050, só assim, a produção conseguiria suprir a demanda por alimentos. Esses dados partem de estudos da Universidade de Minnesota nos EUA. O fator preocupante desse estudo é a necessidade de crescimento na produção agrícola, sem afetar o solo, leitos de rios e lençóis freáticos com agrotóxicos.

Atualmente é difícil imaginar a produção de alimentos sem uso de agrotóxico, e com o aumento na demanda mundial por alimentos existe a preocupação no uso demasiado destas substâncias, representando uma fonte de poluição em solos, subsolos e corpos de água doce.

Com o interesse exarcebado pelo aumento da produtividade, apareceram algumas opções; dentre elas a síntese de novos pesticidas e o aumento excessivo e indiscriminado dos já existentes.

O Brasil é o terceiro maior exportador mundial agrícola, ficando atrás apenas da União Européia (primeiro) e dos Estados Unidos (segundo), podemos anteciper um grande estímulo para a produção nacional destinada para exportação, conseqüentemente, ocorrerá aumento no uso de agrotóxicos. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim)², o Brasil é maior consumidor de agrotóxicos do planeta, com o aumento de produção e consumo nos próximos anos, os prejuízos ao ambiente podem ser potencialmente irreversíveis

É necessário um estudo para avaliar e minimizar os riscos ambientais e impactos sociais causados pelos agrotóxicos, além de tentar maximizar os benefícios na produção e nos custos relacionados a esta.

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países como a EPA (*Environment Protection Agency*) nos Estados Unidos, REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) na União Europeia e o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) no Brasil, têm criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos³, e desta forma, ainda justifica-se a importância do desenvolvimento de métodos analíticos eficientes, rápidos e de baixo custo para este tipo de poluentes⁴.

1.2. AGROTÓXICOS

As primeiras moléculas de DDT⁵ (diclorodifeniltricloroetano), foram sintetizadas por Othmar Zeidler, (estudante de doutorado do professor Adolf Bayer) em 1873, na Universidade de Estrasburgo⁶.

O pesticida DDT ficou esquecido por 65 anos para ser redescoberto por Paul Müller, na Suíça, em 25 de setembro de 1939. Nesta época, Müller trabalhava na síntese de novos corantes industriais e, ao repetir o processo descrito por Zeidler (1873), descobriu o poder surpreendente do DDT contra traças, besouros e uma grande variedade de insetos, incluindo mosquitos e outras pragas. A importância de sua descoberta pode ser evidenciada pelo Prêmio Nobel que recebeu em 1948 “pela descoberta da forte ação do DDT contra uma ampla variedade de artrópodes”⁵.

Embora a indústria de agrotóxicos tenha surgido após a Primeira Guerra Mundial, seu uso foi difundido nos Estados Unidos e na Europa após a Segunda Guerra Mundial, e no Brasil durante o período que ficou conhecido como a *modernização da agricultura nacional* situado entre 1945 e 1985⁶ desde então o consumo expandiu em média 10% ao ano (até 2006). Em 2008 o Brasil se torna o maior consumidor de agrotóxicos⁷, neste mesmo ano as vendas destas substâncias, comparadas com o ano anterior apresentaram, um crescimento acumulado de 24%, totalizando um mercado de quase 13 milhões de reais⁸.

É comum em muitos textos usar-se da palavra pesticidas ao invés de agrotóxico, contudo neste trabalho será usado o termo agrotóxico para enfatizar o caráter tóxico destas substâncias.

Abaixo estão as definições de agrotóxico da IUPAC (órgão internacional) e ANVISA (órgão nacional).

- Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC): agrotóxicos são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados da madeira⁹.
- Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Agrotóxico e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso no setor de produção, no armazenamento e benefício de produtos agrícolas, nas pastagens, e em florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja a finalidade seja alterar a composição da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como desfolhantes, dessecantes estimuladores e inibidores de crescimento¹⁰.

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (grupo funcional) em organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, triazinas, clorofenóis, entre outros, e com base no tipo de pragas alvo que combatem, tal como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Alguns dos principais grupos, funções e classes de agrotóxicos¹¹.

Grupo e função	Classes
Inseticidas (controle de insetos)	Organofosforados, organoclorados, carbamatos, benzoiluréias e organometálicos.
Herbicidas (controle de plantas daninhas)	Triazinas, uréias, tiocarbamatos, amidas substituídas, ácidos benzóicos, piridinas, dinitrofenóis
Fungicidas (controle de fungos)	Ditiocarbamatos, dicaroximidas, ftalimidas, benzimidazóis, imidazóis, acilaminas, sais inorgânicos (sulfato de cobre) fosfito de zinco, fósforo branco cumarina.
Rodenticidas (controle de roedores)	Sais de ferro, acetato de fentina, clinoclamina, cloretos, brometos de alquibenzilamônio, hipocloritos de cálcio metanal
Algicidas (controle de algas)	Sais de ferro, acetato de fentina, clinoclamina, cloretos, brometos de alquibenzilamônio, hipocloritos de cálcio.
Molusquicidas (controle de moluscos)	Metaldeído
Nematicidas (controle de nematóides)	Metilcarbamatos de benzofuralina, metilcarbamadto de oxima e organofosforado.

Os agrotóxicos segundo a ANVISA podem ser classificados quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseando-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico dividindo-os em quatro classes¹², tal como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das substâncias segundo via de absorção e toxicidade aguda, expressa em DL50.¹³.

Toxicidade	Classe	Formulação	DL 50 oral (mg Kg ⁻¹)	DL dérmica (mg Kg ⁻¹)	Cor da faixa no rótulo
Extremamente Tóxico	I	Líquida	<20	<40	Vermelha
		Sólida	<5	<10	
Altamente Tóxico	II	Líquida	>20 e <200	>40 e >400	Amarela
		Sólida	>5 e <50	>10 e >100	
Medianamente Tóxico	III	Líquida	>200 e <2000	>400 e >4000	Azul
		Sólida	>50 e <500	>100 e >1000	
Pouco Tóxico	IV	Líquida	>2000	>4000	Verde
		Sólida	>500	>1000	

DL 50: (Dose Letal 50%) ou dose letal média de uma substância expressa o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas. Correspondem às doses que provavelmente matam 50% dos animais de um lote utilizados para experiência¹⁴.

Atualmente centenas de agrotóxicos são analisados em frutas, vegetais, águas e solos, buscando controlar níveis de resíduos, e assim melhorar a qualidade do meio ambiente e da saúde pública¹⁵.

As análises de resíduos de agrotóxicos foram inicialmente reportadas na década de 50, primeiramente utilizando espectrofotometria¹⁶ e em seguida, por volta dos anos 70, através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As técnicas cromatográficas começaram a se destacar como técnica de análise de pesticidas, juntamente com a cromatografia gasosa (CG), sendo estas duas técnicas as mais utilizadas até os dias atuais.¹⁷

A análise dos agrotóxicos, em geral não é realizada diretamente, pois esta requer algumas etapas prévias como a extração do analito da matriz, muitas vezes complexa; a remoção de interferentes, que são extraídos junto com os analitos, e a separação, identificação e quantificação dos compostos de interesse. Geralmente, faz-se necessário uma etapa adicional, a pré-concentração dos analitos que é realizada antes da quantificação, pois é comum encontrar pesticidas em baixas concentrações espalhadas no ambiente.

São centenas de registros de compostos conhecidos como agrotóxicos ou de metabólitos destes¹⁸. Uma das classes de agrotóxicos é a dos organofosforados

(OF), a maioria dos quais são ésteres e tio-ésteres de ácido fosfórico, substituindo os organoclorados¹⁹.

Os compostos organofosforados (OF) são os inseticidas mais amplamente usados no mundo e os que mais causam intoxicações e grande número de mortes²⁰ estes inseticidas agem como inibidores da colinesterase, ligando-se ao centro esteárico da molécula de acetilcolinesterase (AChE). Essa inibição ocorre porque os inseticidas deste grupo químico fosforilam a enzima, formando um complexo estável e irreversível²¹. Seus efeitos tóxicos estão associados à inibição dessa enzima. A função da AChE é hidrolisar a acetilcolina, com esta sendo sintetizada nos neurônios a partir da acetil-co-enzima e da colina. A acetilcolina é inativada por hidrólise sob ação da AChE, com formação de colina e de ácido acético, que, por sua vez, são reutilizados para formação da acetilcolina²².

A acetilcolina é o mediador químico necessário para a transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo (SNA), presentes em insetos e animais²³.

As manifestações de intoxicação por organofosforados estão associadas com o aumento da concentração de acetilcolina (neurotransmissor tóxico) nas fendas sinápticas. O excesso de acetilcolina gera efeitos periféricos e centrais, decorrentes da estimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos e no Sistema Nervoso Central (SNC)²⁴.

Os principais sintomas de intoxicações em mamíferos são caracterizados por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas, e bradicardia, bem como da depressão do SNC, sendo as principais causas de morbidade e da mortalidade.

1.2.1. Impacto da poluição por agrotóxicos na região de Araraquara

Há diversos tipos de poluição, entre elas a atmosférica, a do solo, das águas, sonora e visual, neste trabalho será abordada principalmente a poluição das águas superficiais, subterrâneas e do solo.

A Poluição das águas é definida como sendo o lançamento ou infiltração de substâncias nocivas na água, causada pelas atividades industriais, mineradoras e esgotos, porém o principal agente poluidor das águas são as atividades agrícolas²⁵. As principais vias de contaminação por agrotóxicos são, lixiviação do solo de áreas contaminadas e contaminação de águas subterrâneas por percolação do solo.

A área de estudo deste trabalho (região de Araraquara) pertence, segundo a subdivisão de Bacias Hidrográficas do Estado de São Paulo, à Unidade de Gerenciamento de Recursos do Tietê/Jacaré, tendo recebido o número 13, de acordo com a Lei Nº 7663 de 30 de Dezembro de 1991, tal como mostrado na Figura 1 a seguir²⁶.



Figura 1. Divisão das bacias hidrográficas do estado de São Paulo²⁶.

Os aquíferos encontrados na região de Araraquara (representados na área destacada Figura 1) são: Bauru (amostra analisada) e Guarani, o aquífero Guarani possui dimensões continentais equivalentes a vários países europeus, estendendo-se além dos domínios brasileiros, também em países como Uruguai, Argentina e Paraguai como mostrado na Figura 2.



Figura 2. Localização do Aquífero Guarani

Estudos têm revelado que as águas do aquífero Guarani ainda estão livres de contaminação. Contudo, considerando que a área de recarga coincide com importantes áreas agrícolas brasileiras, onde se tem usado intensamente agrotóxicos, é de se esperar medidas urgentes para o controle e monitoramento dessas substâncias nesta importante reserva aquífera^{27,28}.

Na região de estudo deste trabalho como se trata de uma monocultura (cana-de-açúcar principalmente) na qual são utilizados agrotóxicos no cultivo, a poluição do solo e das águas é inevitável. Geralmente, são usados agrotóxicos desde o processo de preparação do solo para inibir o nascimento de pragas e eliminar insetos, até após o nascimento das plantas, em que novamente são aplicados estes produtos. Desta forma, esses contaminantes chegam ao leito dos rios, provocando a poluição de todo o meio ambiente, quer seja, água ou solo.

O Aquífero Bauru é constituído por rochas sedimentares do Grupo Bauru e Grupo Caiuá, e ocorre em todo o Planalto Ocidental do Estado de São Paulo, ocupando pouco mais de 40% da área do Estado, ocupa aproximadamente a metade oeste do território do Estado de São Paulo (Figura 3), possuindo uma área aproximada de 96.880 km² daí sua grande importância como manancial.

Importantes cidades do interior paulista localizam-se nesta região, tais como, Araraquara, São José do Rio Preto, Marília, Araçatuba e Presidente Prudente, e, centenas de outras, que tem na utilização das águas subterrâneas dos aquíferos pertencentes ao Grupo Bauru, uma das bases para o seu desenvolvimento, em função da fácil perfurabilidade e grande volume de água armazenada, uma vez que o Grupo Bauru é aflorante nesta região e constitui-se de rochas sedimentares porosas e permeáveis, fatores que facilitam a sua utilização²⁸.

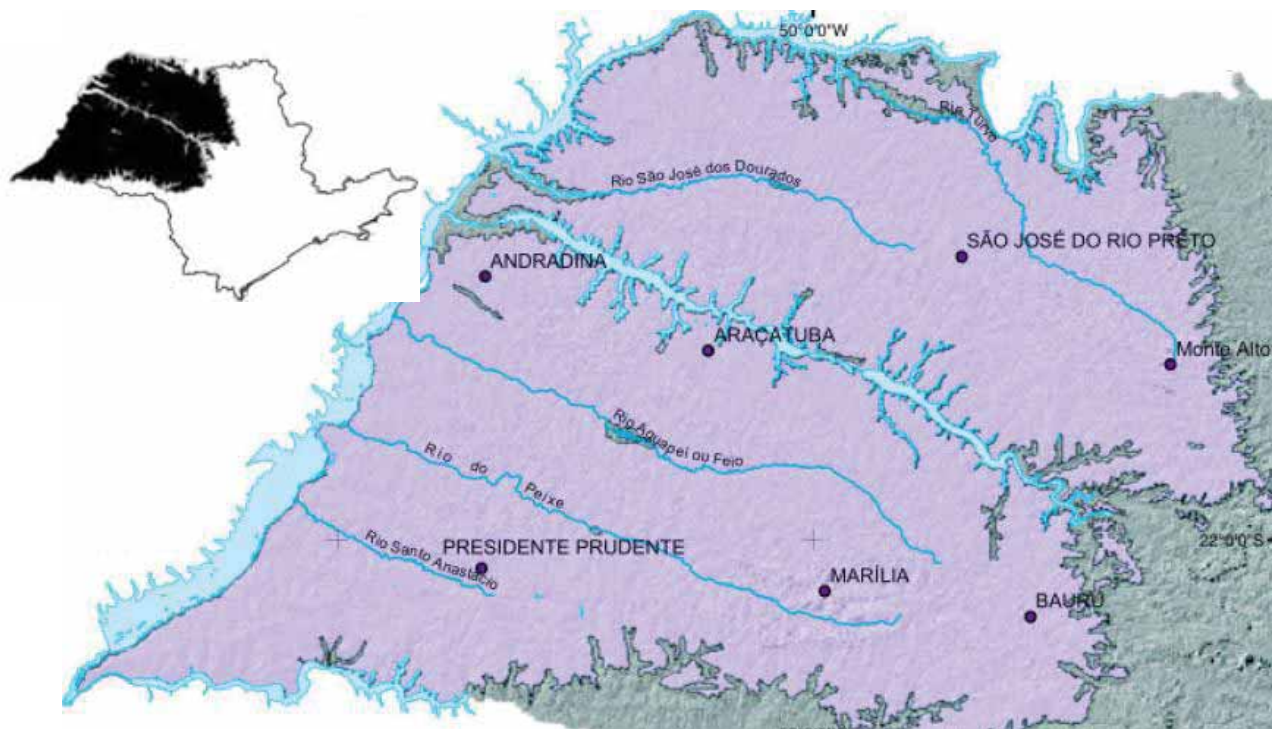


Figura 3. Localização do aquífero Bauru²⁸.

1.2.2. Organofosforado Clorpirifós

O clorpirifós um dos inseticidas pertencente à classe dos organofosforados usado para o controle de mosquitos (larvas e adultos) e moscas²⁹, Foi inicialmente fabricado e comercializado em 1965 pela Dow Chemical Company, nos Estados Unidos, e, atualmente, é um dos cinco inseticidas mais vendidos no mundo todo²³.

Segundo a classificação da ANVISA, o clorpirifós (Figura 4) é considerado um produto altamente tóxico (classe II), e é um dos inseticidas mais utilizados no Brasil. Apresenta baixa solubilidade em água e alto coeficiente de sorção no solo.

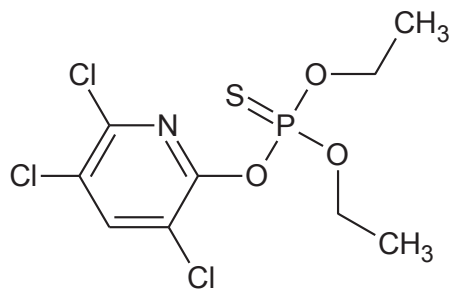


Figura 4. Fórmula estrutural do Clorpirifós³⁰.

A Tabela 3 mostra algumas propriedades físicas e químicas do clorpirifós de acordo com a diretoria geral de saúde e Proteção dos Consumidores da comissão europeia³⁰.

Tabela 3. Propriedades físicas e químicas do clorpirifós³⁰.

Nome Comum	CLORPIRIFÓS
Nome (IUPAC)	O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridil-fosforotionato
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Massa Molecular	350,6
Ponto de fusão	41 – 42 °C (97-99%)
Ponto de Ebulição	Decompõe-se antes da ebulição. A decomposição térmica a 170 – 180°C
Densidade relativa	1,51g mL ⁻¹
Solubilidade em Água	1,05 mg L ⁻¹ a 20 °C em solução não tamponada; não depende do pH.
Solubilidade em solventes orgânicos	Hexano: 774 g L ⁻¹ Tolueno: >4000 g L ⁻¹ Diclorometano: > 4000 g L ⁻¹ Metanol: 290 g L ⁻¹ Acetona: >4000 g L ⁻¹
Estabilidade hidrolítica.	pH < 7 72 dias (25 °C) pH = 9 16 dias (25 °C)
Constante de dissociação	7,94 x 10 ⁻⁶

O clorpirifós age por contato e ingestão. Como todo inseticida do grupo organofosforado, o clorpirifós também liga-se ao centro esteárico da AChE,

impossibilitando-a de exercer sua função de hidrólise do neurotransmissor ACh, em colina e ácido acético. Nos insetos, interfere com a transmissão dos impulsos nervosos, levando os à paralisia e morte.

O clorpirifós pode causar inibição da colinesterase em seres humanos provocando náuseas, convulsão, e grandes exposições podem causar paralisia respiratória e morte. Sua exposição a mulheres grávidas representa um grave problema para os fetos, pois o agrotóxico pode causar problemas neurofisiológicos (teratogênico).

Um dos produtos da hidrólise do clorpirifós é o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) Figura 5, sendo esse o principal produto³¹; cabe ressaltar que apresenta alta solubilidade em água, quando comparada ao clorpirifós, provocando a contaminação generalizada nos solos e no ambiente aquático sendo tóxico a muitas espécies de peixes. Na degradação do clorpirifós por microorganismos o TCP prejudica o rendimento, pois possui alta atividade microbiana³².

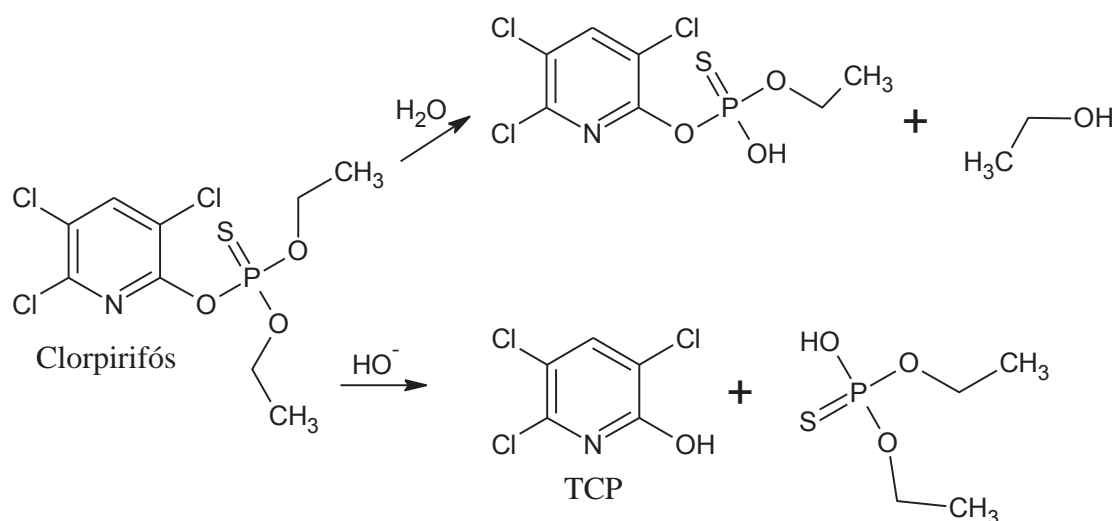


Figura 5. Mecanismo de Hidrolise do Clorpirifós¹⁹.

Outro produto proveniente da degradação do clorpirifós é o 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) mostrado na Figura 6.

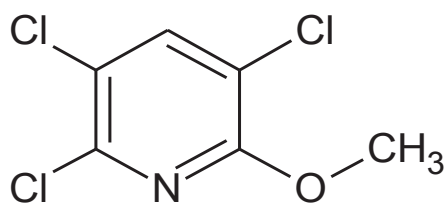


Figura 6. Metabólito minoritário do clorpirifós a TMP³².

Existe um sub-produto (clorpirifós-oxon) detectado por autores que estudaram o metabolismo do clorpirifós em animais, este composto foi detectado em urina, em plantas³³, na degradação no solo e na água¹⁹, o qual é resultado do processo de oxidação, assim como mostra a Figura 5. O clorpirifós-oxon é mais tóxico que o próprio clorpirifós, contudo a maior parte deste composto continua seu processo de degradação sofrendo hidrólise formando o TCP.

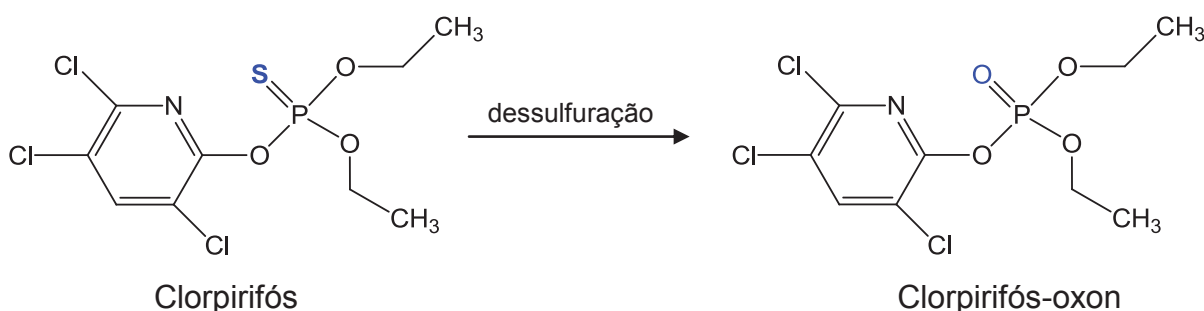


Figura 7. Reação da oxidação parcial do clorpirifós

1.3. Métodos de determinação de TCP.

Um levantamento bibliográfico foi feito em fonte de consulta eletrônica (*Scifinder Scholar*[®]) utilizando as palavras chaves: *3,5,6-trichloro-2-pyridinol and determination or analysis*, no qual foram encontradas 383 publicações sobre métodos analíticos para a determinação deste agrotóxico nos últimos 10 anos. Na Figura 8, tem-se a distribuição dessas publicações.

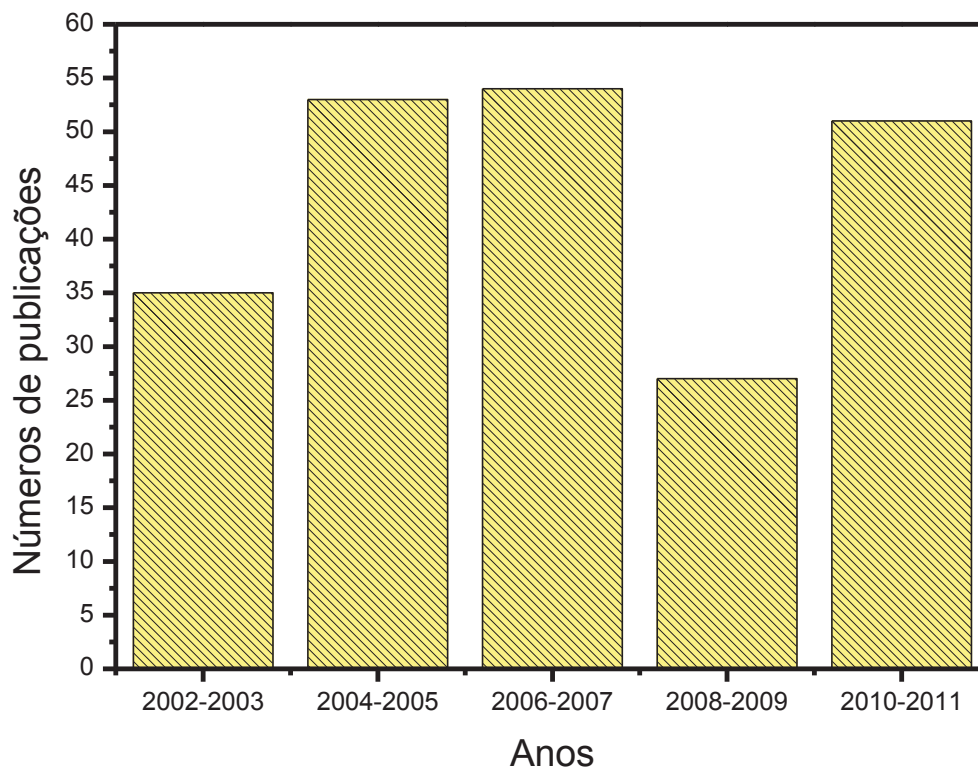


Figura 8. Publicações relacionadas à determinação de TCP

Na literatura são encontrados muitos trabalhos para determinação de TCP em amostras de solo e água. Entretanto, metodologias baseadas em métodos eletroquímicos ainda são escassas. Dentro do período descrito foram publicados quatro trabalhos relacionados à determinação eletroquímica do TCP, levantamento feito utilizando as palavras chaves: *determination electrochemical 3,5,6-trichloro-2-pyridinol*. Boa parte dos trabalhos de determinação de TCP estão relacionados a biossensores e sensores piezoelétricos, a vantagem do sensor biomimético proposto nesse trabalho é a robustez do método e o custo.

1.4. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente empregada na eletroquímica na década de 70, por Murray e colaboradores referindo-se àqueles eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos e que mudam o comportamento eletroquímico do mesmo³⁴.

O principal objetivo dessa modificação é alterar a reatividade e seletividade do eletrodo base, favorecendo assim, o desenvolvimento de sensores para vários fins e aplicações, desde catálise de reações orgânicas e inorgânicas³⁵, até a transferência de elétrons em moléculas de interesse analítico³⁶.

Para a preparação de um EQM, um aspecto importante é a escolha do material para o eletrodo base, sendo que este material deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Os materiais mais utilizados para a modificação na superfície do eletrodo são ouro, platina, mercúrio na forma de filme e materiais carbonáceos, como fibras, nanotubos e pasta de carbono, assim como carbono vítreo³⁴.

Durante anos foram feitos estudos para desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados, na busca por dispositivos altamente seletivos, e sensíveis³⁶, tal como mostrado na Tabela 4.

Existem várias formas de modificar a superfície do eletrodo base, como mostrado na Tabela 5. A técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos, pois envolve a interação física do modificador e a superfície do eletrodo, sendo um processo simples e rápido, podendo ser aplicado em vários tipos de superfícies eletródicas^{37,38}, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização (conhecido como lixiviação), resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM preparado desta forma³⁴.

Tabela 4. Alguns Estudos realizados com EQMs³⁷.

ACONTECIMENTO (ANO)	CONSEQUÊNCIA / MELHORA
Imobilização de grupos funcionais (1964)	Aumento na seletividade e sensibilidade
Incorporação de catalisadores inorgânicos (ftalocianinas metálicas) (1965)	Maior sensibilidade
Incorporação de catalisadores biológicos (Biossensores) (1967)	Maior seletividade
Utilização de filmes poliméricos (1970)	Estabilidade, seletividade
Aparecimento da denominação “Eletrodo quimicamente modificado” (1975)	Definição da terminologia
Matrizes Inorgânicas usando eletrodo de sílica modificada (1980)	Maior estabilidade
Microeletrodos modificados (1980)	Aplicação <i>in vivo</i>
Uso de membranas biológicas (1981)	Melhora da estabilidade e do tempo de vida
Incorporação de aditivos	Maior sensibilidade e seletividade.

Tabela 5. Métodos utilizados para a introdução de um agente modificador sobre eletrodo base³⁴.

Modificação	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base.
Ligação Covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos existentes na superfície do eletrodo.
Filmes Poliméricos	Imobilização de polímeros da espécie ativa na superfície do eletrodo – Ampliação da resposta eletroquímica.
Materiais Compósitos (oclusão)	Possibilidade de modificação interna do material eletrodo. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, etc.

Na imobilização por ligação covalente, o modificador é fixado na superfície eletródica pela ligação química, oferecendo um método estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo. É um método bastante estável em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo de reação, além de ser mais difícil de executar. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado na obtenção de biossensores^{34,38,39}.

Dentre os métodos citados na Tabela 5, a técnica de filmes poliméricos permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando assim a resposta eletroquímica. Esse método utiliza a preparação do eletrodo modificado a partir do recobrimento com filme polimérico, o mesmo deve ser condutor ou permeável ao eletrólito e a espécie de interesse.

Os materiais compósitos reúnem os eletrodos formados pela combinação de duas ou mais fases de diferentes naturezas, o mais usado é a pasta de carbono modificada com diferentes compostos, que variam desde compostos redox, até materiais biológicos^{38,39}.

1.4.1. Eletrodo de pasta de carbono

Com a evolução das técnicas eletroanalíticas, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços nas diversas áreas de pesquisas. Dessa maneira, vários trabalhos vêm sendo publicados, em que os autores relatam diferentes tipos de eletrodos utilizados na quantificação de espécies eletroativas⁴⁰. Pode-se destacar entre eles os eletrodos de pasta de carbono (EPCs).

Os eletrodos preparados à base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície e são fáceis de preparar. Uma das maneiras de obter um EPC é misturar grafite em pó e um líquido orgânico (aglutinante) que é imiscível em contato com soluções aquosas e que fornecerá a consistência de pasta à mistura.

Uma das principais vantagens da pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a

co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, etc., resultando em um sistema de medida que dispensa a necessidade de adição de reagentes em solução durante a análise.

O primeiro EPC foi desenvolvido por Adams ⁴¹, com intuito de substituir o eletrodo gotejante de mercúrio. Seu objetivo era atingir potenciais mais positivos, nos quais o eletrodo de mercúrio não podia ser aplicado. Os primeiros trabalhos de Adams visaram a caracterização do EPC, aplicando técnicas básicas em eletroquímica ⁴². O emprego de sensores eletroquímicos à base de pasta de carbono tem demonstrado um aumento nos últimos 40 anos, como consequência da aplicabilidade nos mais diversos meios, assim como a versatilidade na preparação da pasta. Deve-se ressaltar que quando construídos sensores à base de pasta de carbono, onde o modificador é imobilizado apenas por oclusão, o mesmo deverá ser insolúvel no eletrólito no qual serão realizadas as medidas eletroquímicas.

O uso de pasta de carbono continua a ser atraente porque esses sensores demonstram ter alta estabilidade química, elevada atividade catalítica e ampla possibilidade de modificação da pasta.

1.4.2. Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas se baseiam em processos eletroquímicos, processos em que uma determinada reação química é forçada a ocorrer devido a aplicação de uma diferença de potencial elétrico em um eletrodo.

1.4.2.1. Voltametria

A voltametria é um exemplo de técnica eletroanalítica onde é possível obter informações sobre espécies químicas de interesse, e que podem ser qualitativas ou quantitativas, (corrente de pico, largura do pulso etc.) os dados são obtidos a partir do registro de curvas corrente versus potencial, registradas durante o processo de eletrólise da espécie de interesse. Ou seja, na superfície do eletrodo deve ocorrer uma oxidação ou redução nas regiões de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinâmica e cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (corrente elétrica) na interface eletrodo-solução. A força motriz para a ocorrência da reação eletroquímica é o potencial aplicado no eletrodo de trabalho.

Na medida em que o potencial se torna mais negativo (varredura catódica), a energia dos elétrons aumenta e o eletrodo se torna uma fonte de elétrons o que provoca um fluxo de elétrons do eletrodo para a solução (corrente de redução), favorecendo a redução da espécie eletroativa na interface solução/eletrodo. Para potenciais mais positivos, ocorre o efeito contrario, e desta forma é favorecida a oxidação da espécie eletroativa (varredura anódica) na interface eletrodo/solução.

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa/qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho⁴³. Neste trabalho duas técnicas eletroanalíticas foram escolhidas: a voltametria cíclica para obter dados qualitativos do processo envolvido e a voltametria de onda quadrada para obter dados quantitativos, na detecção do analito proposto.

1.4.2.2. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) constitui-se numa técnica eficaz usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica é resultado da habilidade de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica do processo redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos⁴². Esta técnica frequentemente é a primeira a ser utilizada em um estudo eletroquímico, para caracterização e reconhecimento do sistema, pois oferece uma maneira simples da localização do potencial redox da espécie eletroativa, assim como permite uma avaliação conveniente do efeito do meio eletrolítico no processo redox.

A voltametria cíclica consiste na varredura de potencial em um eletrodo de trabalho utilizando uma onda de forma triangular. Para isto, inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto na interface eletrodo/solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e

se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes, são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{p_c} e E_{p_a}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{p_c} e I_{p_a}), e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido.

1.4.2.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ), do inglês “Square Wave Voltammetry”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas⁴³. Do ponto de vista prático, a maior vantagem da VOQ é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica. Além disto, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente com componente faradaica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente com componente capacitiva seja minimizada⁴³. Na VOQ a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, em que pulsos de potencial (ΔE_s) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_p) e duração $2t_p$ (período). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto (A-catódico) e reverso (B-anódico), originando um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado⁴⁴.

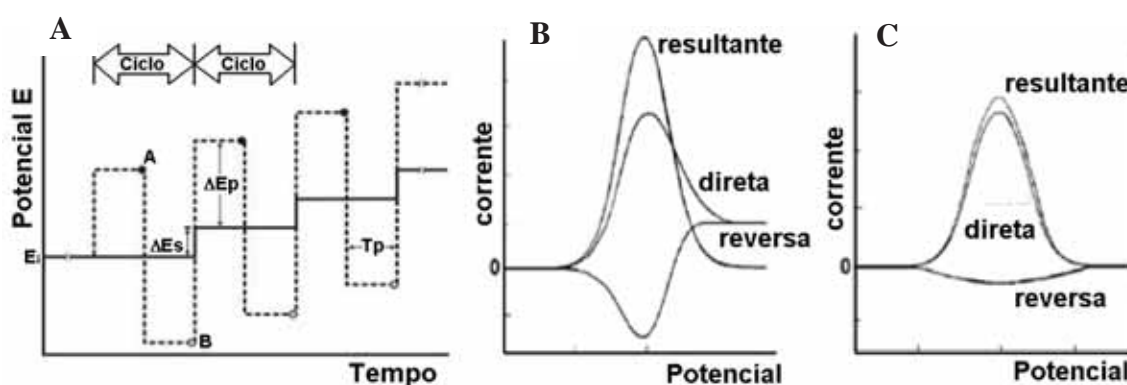


Figura 9. (A) Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (B) e de um sistema irreversível (C)⁴⁴.

A VOQ apresenta as seguintes vantagens em comparação às outras técnicas de pulso:

- Redução no ruído de fundo por meio de varreduras repetitivas;
- Registro de correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, com excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a faradaica, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica;
- Baixo consumo de espécies eletroativas e redução nos problemas de passivação dos eletrodos;
- Em muitos casos, a interferência do O₂ dissolvido é pouco significativa em medidas com VOQ.

1.5. SENSORES ELETROQUÍMICOS

Sensores químicos são dispositivos que baseiam-se em reações de oxidação e redução e permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Desta forma, os resultados obtidos podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros no ambiente em que estão inseridos⁴⁶. Estes dispositivos possuem características peculiares que os distinguem de métodos instrumentais de largo porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real⁴⁶. Dados nestas condições experimentais são facilmente obtidos com sensores e, mesmo que as medidas em alguns casos não tenham precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais convencionais e bem estabelecidos, em muitas ocasiões têm-se elementos suficientes para tomadas de decisão⁴⁶. Dentre as diversas características que apresentam os sensores químicos, destacam-se a portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

Um sensor químico consiste em um elemento de transdução acoplado a uma camada de reconhecimento química ou biológica⁴⁷. Esta camada interage com o analito, resultando em alterações químicas ou bioquímicas que são traduzidas pelo transdutor em sinais fisicamente mensuráveis, como geração de corrente elétrica, por exemplo, obtendo assim um sensor eletroquímico. É importante salientar que as reações eletrolíticas nos sensores eletroquímicos são heterogêneas e tem lugar

apenas na pequena região interfacial entre o eletrodo e a solução, região onde a distribuição de carga e concentração do analito difere do restante da solução.

1.5.1. Sensores e catalisadores biomiméticos

Os sensores biomiméticos têm sido usados para obter respostas mais estáveis, que os biossensores convencionais, que possuem como base materiais biológicos. Estes dispositivos visam vencer as limitações dos biossensores enzimáticos tais como disponibilidade, custo e instabilidade, espera-se também que sejam mais duradouros, porém mantendo a mesma seletividade.

Os sensores biomiméticos promovem uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox)/ substrato, uma vez que, nos sensores biomiméticos o “sítio ativo” encontra-se descoberto diferentemente do que acontece nas enzimas, onde o sítio ativo encontra-se rodeado pela densa camada de aminoácidos residuais^{47,48,49}.

Uma condição para mimetizar ou escolher uma enzima adequada para a construção de sensores biomiméticos é que a química da catálise da reação enzimática e a estrutura do sítio ativo da enzima sejam muito bem conhecidas, e neste sentido as enzimas P450, encaixam-se perfeitamente nestes requerimentos. O nome enzima P450 ou citocromo P450 deriva das propriedades espectrais dessa proteína e a letra P é a abreviatura de pigmento, lembrando a cor rosa do grupo hemina. Atualmente são conhecidos mais de 400 diferentes enzimas P450, as quais catalisam os mais diversos tipos de reações químicas nos organismos, produzindo na maioria das vezes metabólitos que são fisiologicamente essenciais ou benéficos aos organismos vivos, por exemplo a degradação de xenobióticos como pesticidas e a metabolização de fármacos e hormônios⁴⁹.

Todas as enzimas P450 contêm um sítio ativo comum que é a protoporfirina de ferro IX (Figura 9), que é o grupo prostético encontrado em todas as enzimas citocromo P450. O papel deste grupo hemino nas diferentes citocromo P450, varia em função da natureza dos ligantes próximos ao grupo prostético e do substrato que será catalisado.

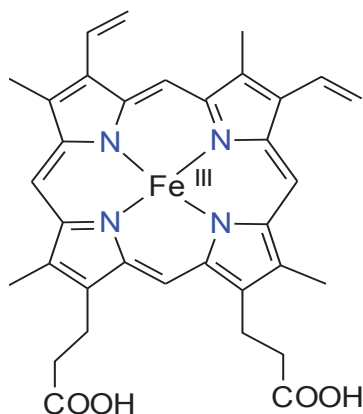


Figura 10: Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450

Compostos derivados das ftalocianinas e porfirinas de ferro, manganês e cobalto, têm sido satisfatoriamente empregados em meio aquoso na tentativa de mimetizar o sítio ativo das P450^{50,51,52}.

Dentre os complexos que podem ser avaliados como possíveis catalisadores biomiméticos da P450, devido à semelhança com a protohemina IX, encontra-se a cloro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina ferro (III) (Figura 10).

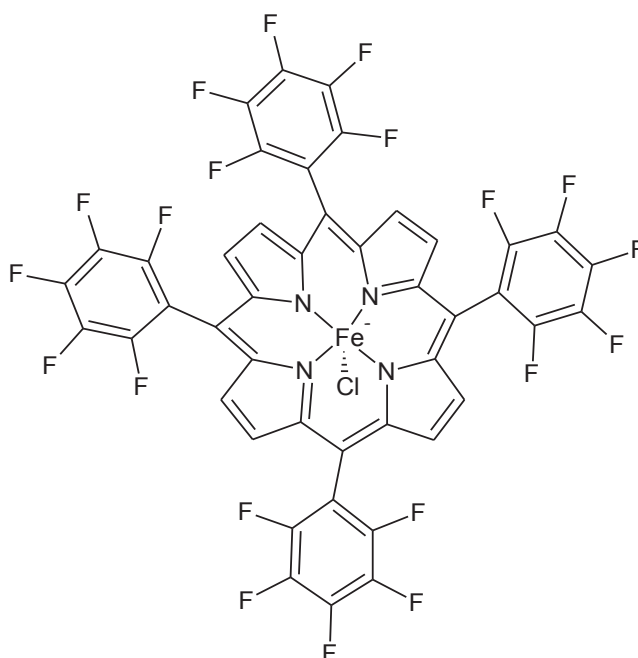


Figura 11. Estrutura química do complexo cloro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina ferro (III) [TKFPcFe].

Este complexo apresentado acima que é um possível catalisador biomimético da P450 foi usado para a preparação do eletrodo composto de pasta de carbono modificado usado neste trabalho.

1.6. POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR – MIPS

Os polímeros de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) também designados como materiais biomiméticos da interação anticorpo-antígeno; são formados por materiais poliméricos rígidos que apresentam propriedades de reconhecimento molecular para uma molécula alvo, denominada molde⁵³.

O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Pauling para formação de anticorpos, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos⁵⁴. A partir desta concepção, surgiu a idéia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular. Os primeiros relatos de impressão datam do início da década de 30, quando o químico soviético Polyakov (1931) preparou uma série de géis de sílica e observou que, quando preparadas na presença de um aditivo de solvente, a sílica resultante mostrou a capacidade de ligação preferencial para esse aditivo.⁵⁴

Os experimentos realizados por Polyakov consistiam na acidificação de uma solução de silicato de sódio empregando carbonato de amônio como iniciador da polimerização, após duas semanas diferentes aditivos (benzeno, tolueno ou xileno) eram acrescentados as sílicas e estas eram levadas a secagem por cerca de 20 a 30 dias. Os aditivos eram então removidos por um demorado processo de lavagem com água quente. Em estudos de adsorção subsequentes, Polyakov observou que as sílicas preparadas apresentavam uma alta capacidade de retenção frente aos aditivos empregados na polimerização e conseqüentemente melhor seletividade.⁵⁴

Diversos trabalhos foram relatados a partir das primeiras descobertas realizadas por Polyakov. Após duas décadas de intensa investigação na área, verificou-se entretanto uma diminuição nos estudos envolvendo impressão molecular

de sílicas, concomitantemente com a introdução dos primeiros trabalhos de polímeros orgânicos molecularmente impressos.

Para a síntese dos MIPs, uma molécula utilizada como molde (analito) interage por meio de ligações com as moléculas do monômero. Posteriormente, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no polímero a fim de formar uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar. Por fim, a molécula molde é removida da matriz polimérica por meio de solvente. Com a remoção da molécula molde, o polímero resultante disporá de microcavidades com tamanhos uniformes capazes de reter seletivamente a molécula molde presente numa amostra complexa. O princípio de preparo dos MIP é bastante simples, porém, cabe lembrar que sem a adequada combinação dos constituintes da reação, bem como o tipo de procedimento empregado na síntese, o polímero resultante pode adquirir características indesejáveis no que diz respeito à morfologia e à uniformidade das partículas e dos sítios seletivos. O processo geral de síntese de um MIP, bem como seu mecanismo de atuação é mostrado na Figura 11.

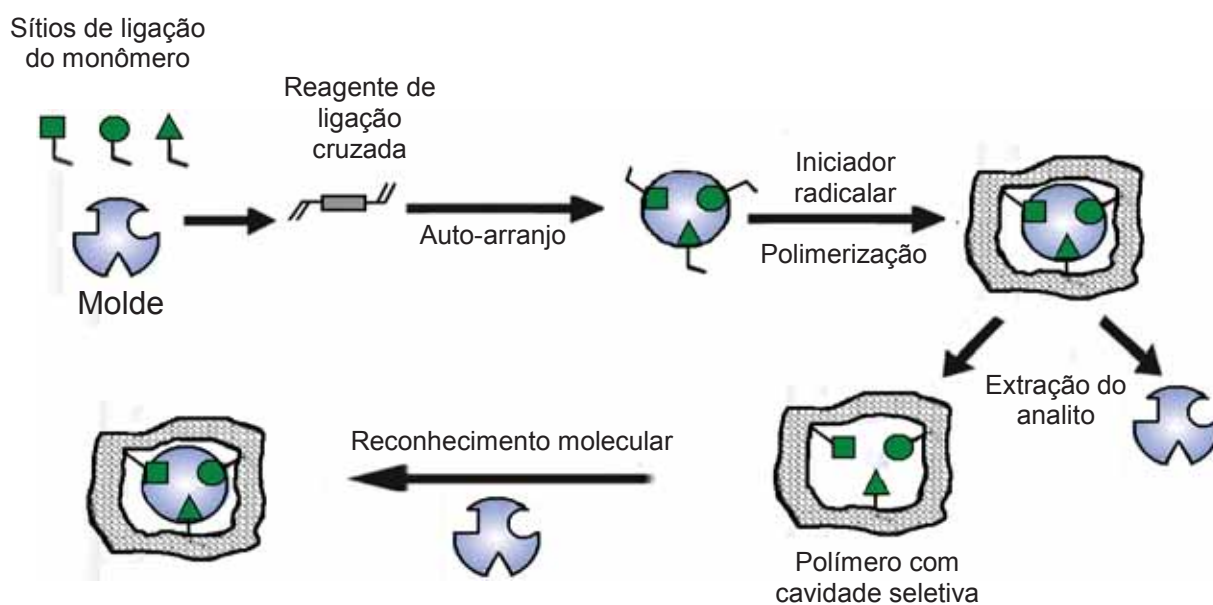


Figura 12: Esquema representativo do processo de síntese de MIP.⁵⁵

Um fato interessante é que a seletividade dos MIPs é influenciada pelo tamanho do molde, normalmente, uma molécula que possui grupos estéricos

distantes da função orgânica do analito que se liga ao monômero produz polímeros pouco seletivos^{56,57} para minimizar esse problema existe programas computacionais que calculam e fornecem os melhores monômeros para a síntese do polímero.

As vantagens dos MIP em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem a facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes, a estabilidade por longos períodos de tempo, a resistência a condições drásticas, tal como altas concentrações de solventes orgânicos, elevadas temperaturas e pressão, e a capacidade/possibilidade de reutilização do material após a limpeza do mesmo⁵⁸.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa o desenvolvimento de sistemas biomiméticos de análise para detecção e quantificação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), o principal metabólito do agrotóxico clorpirifós, em amostras de interesse ambiental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Construção de um sensor voltamétrico à base de um catalisador biomimético para TCP e otimização dos parâmetros experimentais para melhor desempenho do sensor;
- 2.2.2. Determinação das principais figuras de mérito da metodologia proposta;
- 2.2.3. Aplicação do método para a determinação do TCP em amostras ambientais e no monitoramento da eficiência de polímero molecularmente impresso seletivo a este analito.
- 2.2.4. Estudos iniciais relacionados à síntese, otimização e avaliação da eficiência (usando o sensor biomimético proposto) de um polímero de impressão molecular (MIP) seletivo ao TCP.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA

As medidas de volume foram efetuadas com micropipetas Eppendorf® (10 – 100 µL) e (100 – 1000 µL). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica (Mettler-Toledo®) que possui calibração externa e tara automática, possibilitando pesagens rápidas e precisas.

O pH das soluções tampão foi medido com pH-metro da Thermo Scientific® (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA) empregando um eletrodo de vidro combinado.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes usados para este trabalho foram de grau analítico e usados tal como recebidos. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os agrotóxicos metribuzin, clorpirifós, carbendazim, 2,4 D, carbofurano, hexazinona e diuron e o TCP (principal metabólito do clorpirifós), todos provenientes da Sigma-Aldrich®, também foram usados complexos ftalocianinacobre (II); ftalocianinacobalto (II); 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25–hexadecafluoro–29H–31H–ftalocianinacobalto; *bis*(piridil)ftalocianinaferrosa; ftalocianinacloradaférrica; 5,10,15,20-tetra*quis*-metoxifenilporfirinacobalto e cloro-5,10,15,20-tetra*quis*(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirinaferro (III); óleo mineral; grafite em pó e ácido bórico; todos provenientes da Sigma-Aldrich®; nanotubos de carbono de paredes múltiplas da Dropsens®; o dihidrogênio fosfato de potássio, o acetato de sódio, peróxido de hidrogênio, metanol, ácido sulfúrico, ácido acético e o hidróxido de sódio foram da Synth®; os tampões orgânicos *tris*(hidroxi-metil)aminometano (TRIS) foram adquiridos da Merck®; ácido fosfórico foi adquirido pela Mallinckrodt® e a acetonitrila da VETEC®.

3.2.1 Preparo das soluções utilizadas

Solução estoque do metabólito (TCP): A solução estoque do analito foi preparada pela dissolução de 5 a 15 mg de TCP em 10 mL de solução tampão, esta mistura é submetida a agitação até total solubilização, a solução resultante é transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25,0 mL tendo seu volume completo com a mesma solução tampão. Obtendo soluções de concentração na faixa de $1,0$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão Britton-Robinson (BR): foi preparada a partir do ácido acético $0,08 \text{ mol L}^{-1}$, ácido bórico $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido fosfórico $0,08 \text{ mol L}^{-1}$. O valor do pH foi ajustado pela adição de uma solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão fosfato: Preparada pela dissolução do KH_2PO_4 em água a fim de obter uma solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ até o valor desejado.

Solução dos possíveis compostos interferentes: Para o estudo da seletividade, uma massa adequada (equivalente à quantidade necessária para preparar soluções com concentração na faixa de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de cada um dos agrotóxicos avaliados foi pesada e colocada na solução tampão sob agitação. Obtendo soluções saturadas dos agrotóxicos neste meio tamponado. Nas análises foram utilizados os sobrenadantes destas soluções.

Obtenção e preparação das amostras ambientais (rios): A amostra de água do rio Tietê na região central do estado após a barragem de Barra Bonita (Figura 12) foi coletada e enriquecida com TCP na faixa de concentração de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a seguir, analisadas pelo sensor proposto em sistema em batelada, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.



Figura 13. Fotografia de uma localidade do rio Tietê que corresponde à região do rio após a barragem da cidade de Barra Bonita.

Obtenção e preparação das amostras ambientais (nascente): A amostra de água obtida de uma nascente proveniente do aquífero Bauru (Araraquara) (Figura 14) foi analisada sem nenhum tratamento prévio, para as análises foram misturadas a amostra e o tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção 1:1 (essa mistura foi usada como eletrólito). Uma solução enriquecida com TCP na faixa de concentração de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi feita para as análises pelo sensor proposto em sistema de batelada, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.



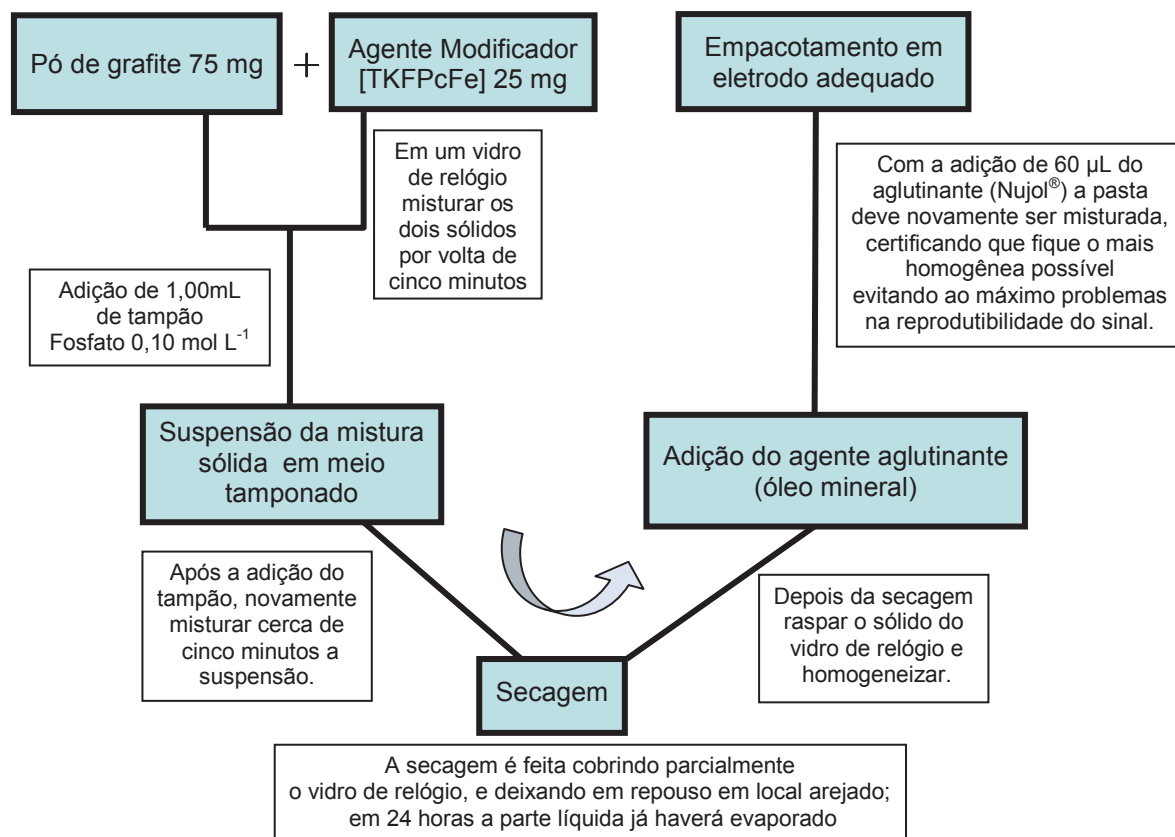
Figura 14. (A) Fotografia da entrada do instituto florestal de Araraquara localidade em que se encontra a (B) nascente de onde foi retirada a amostra de água.

Obtenção e preparação das amostras ambientais (solo): Foram analisadas amostras de solo retiradas de um sítio na cidade de Borborema próximo a região de Araraquara e coletadas de diferentes profundidades (0 – 10 e 20 – 40 cm). Uma porção de 5,00 g de cada uma das amostras de solo foi misturada com 25,00 mL de tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹, essa mistura foi sonicada para homogeneização e dissolução de algum composto que possa causar efeito de matriz. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração. Parte do sobrenadante foi enriquecido com TCP numa concentração aproximada de 10⁻³ mol L⁻¹, e a seguir, foram realizadas as análises pelo sensor proposto, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.

3.3. CONSTRUÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA

Para a construção do sensor proposto foram testados vários complexos metálicos que poderiam atuar como possíveis catalisadores biomiméticos da enzima P450. Após terem sido avaliadas algumas ftalocianinas e porfirinas metálicas, foi escolhido o complexo [TKFPcFe] (cloro-5,10,15,20-tetra*quis*(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirinaferro (III)) na modificação da pasta de carbono. A escolha baseou-se em que este complexo apresentou maior ganho de sinal em relação aos outros compostos e em relação à pasta de carbono sem modificar.

O preparo da pasta de carbono para determinação de TCP foi realizada misturando 75 mg de pó de grafite, 25 mg do complexo metálico [TKFPcFe] e 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e a seguir, deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se 60 µL do agente aglutinante (óleo mineral - Nujol[®]) para a obtenção da pasta de carbono, a qual depois de usada era armazenada a seco (Esquema 1).



Esquema 1. Preparo do eletrodo de pasta de carbono modificado.

Para obtenção do sensor, a pasta de carbono modificada é colocada na cavidade de um eletrodo constituído de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo (Figura 15).

Finalmente, a superfície do eletrodo de pasta de carbono foi uniformizada com papel sulfite limpo, a fim de obter uma superfície homogênea.

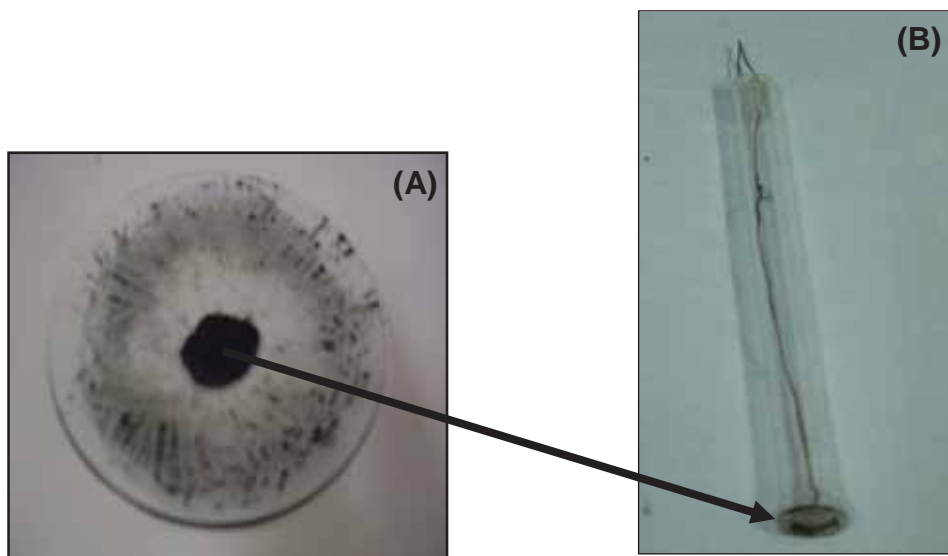


Figura 15: Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor.

Para efeitos de comparação, também foi preparada uma pasta de carbono sem modificar, misturando 100 mg de pó de grafite e 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

3.4. SÍNTESE DOS MIPS E NIPS

Para obter um MIP com melhor desempenho, foi empregada a química computacional, que vem sendo empregada neste grupo de pesquisa para auxiliar na escolha do melhor monômero para obtenção do MIP inédito para TCP. Nas simulações foram utilizados os programas Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC2009 e Granada, HyperChem[®] 8.0.5 e OpenEye[®] (pacote contendo os programas VIDA 3.0.0; Omega2 e szybki 1.2.2). Os monômeros utilizados nos testes foram *N,N'*-metileno-*bis*-acrilamida (MP1), ácido imidazol-4-acrílico (MP2), etil éster do ácido imidazol-4-acrílico (MP3), ácido acrílico (MP4), acrilamida (MP5), acroleína (MP6), alilamina (MP7), acrilonitrila (MP8), etileno glicol dimetacrilato (MP9), 2-(cietilamino) etil-metacrilato (MP10), ácido metileno-succínico (MP11), ácido metacrílico (MP12), *m*-divinilbenzeno (MP13), *p*-divinilbenzeno (MP14), estireno

(MP15), 1-vinil-imidazol (MP16), 2-vinil-piridina (MP17), 4-vinil-piridina (MP18), 2-acrilamido-2-metil-1-ácido propanossulfônico (MP19), 2-hidroxi-etil metacrilato (MP20). A simulação levou cerca de 16 horas e os resultados obtidos relacionando a energia de afinidade entre cada monômero e o TCP estão representados na Figura 15.

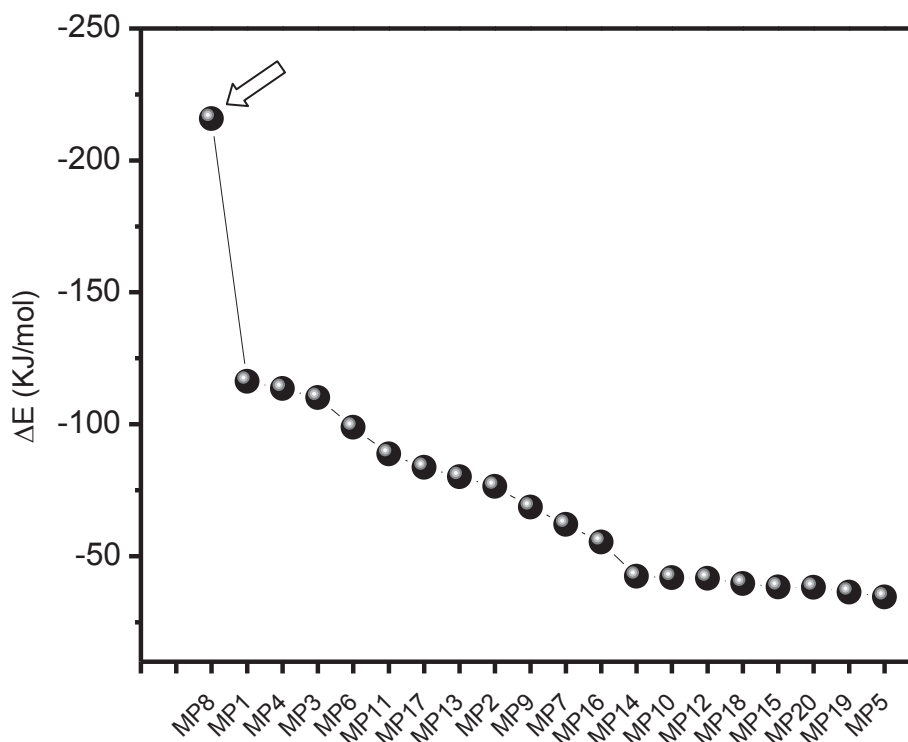


Figura 16: Média das energias liberadas na formação do MIP do TCP. No destaque MP8 (acrilonitrila) o melhor monômero sugerido pela simulação computacional.

Quanto maior a energia liberada (mais negativo for o resultado), melhor será a interação entre o monômero e o analito⁵⁸. Na Figura 15 fica evidente que o monômero acrilonitrila (MP8) é o mais indicado. Nota-se que o restante dos monômeros encontram-se concentrados em dois grupos diferentes, e, que nenhum deles apresenta interação tão grande com o analito quanto o MP8. Indicando que a maior afinidade entre o esse monômero e o metabólito viabilizará a obtenção de um polímero mais eficiente.

Desta forma, a preparação do polímero impresso (MIP) e não impresso (NIP) foram realizadas usando a polimerização em *bulk* e em atmosfera isenta de

oxigênio. Para isso, as misturas reacionais foram borbulhadas com nitrogênio durante 15 minutos, e os reagentes foram misturados conforme a Figura 16 a seguir:

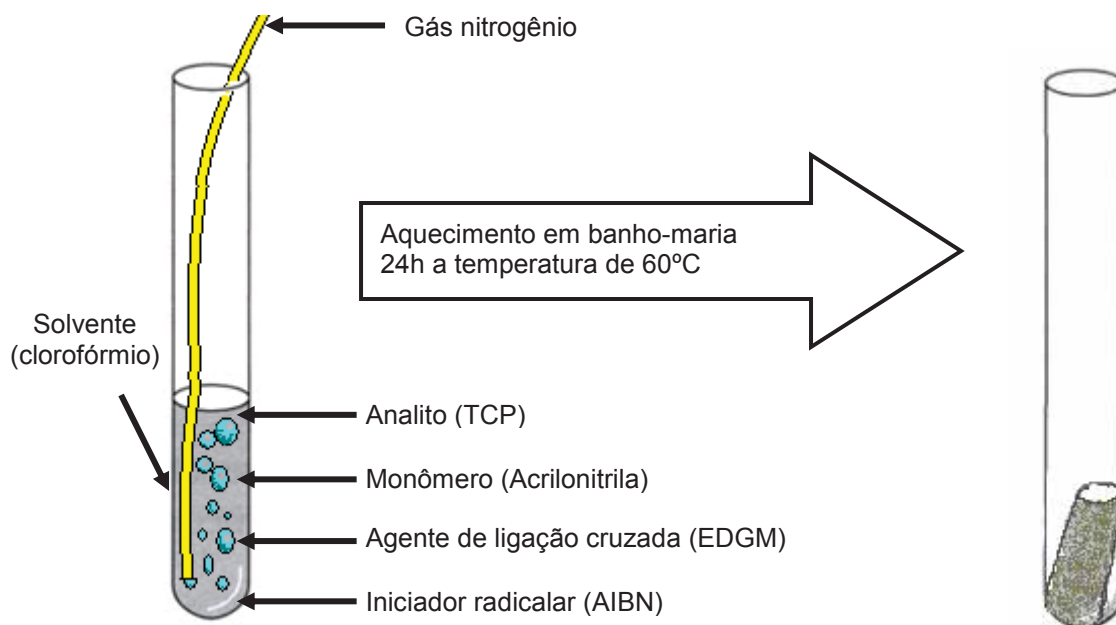


Figura 17: Desenho representativo da preparação dos polímeros molecularmente impressos.

Para a preparação do MIP foi usada a proporção em mols de 1:4:20:1 de analito (TCP), monômero (acrilonitrila), agente de ligação cruzada (etilnoglicol dimetacrilato – EDGM) e iniciador radicalar (2,2'-azo-bis-isobutironitrila – AIBN) respectivamente, e 5,00 mL do solvente (clorofórmio)⁵⁸. Cabe ressaltar que o mesmo procedimento é realizado na síntese do respectivo NIP, contudo neste caso não é adicionado o analito (TCP).

Os componentes da reação são misturados durante o borbulhamento de nitrogênio que ajuda na homogeneização da mistura. O iniciador radicalar deve ser adicionado por último, porque é ele que inicia a reação de polimerização, portanto após a adição do agente radicalar o tubo de reação deve ser vedado com papel alumínio e Parafilm[®] para evitar evaporação do solvente e a entrada de oxigênio no meio antes de se completar a reação. A mistura reacional é levada ao aquecimento em banho-maria por 24 horas a 60 °C. Já no fim desse processo é obtido um sólido. Estes sólidos obtidos (MIP e NIP) são triturados e peneirados separadamente, até atingir um tamanho de partículas de 180 µm, e o pó obtido é levado para um

processo de refluxo, como mostrado na Figura 18, com a finalidade de retirar o analito do MIP.



Figura 18: Aparelhagem para lavagem dos polímeros. (A) NIP à esquerda e MIP à direita no processo lavagem através do refluxo por Soxhlet. (B) detalhe de como o sólido é armazenado no processo na forma de cartuchos preparados com papel de filtro.

No detalhe da Figura 18 (B) é possível observar um “cartucho” de papel de filtro que contém dentro o material em pó (MIP ou NIP). Para a lavagem do material foi utilizada uma mistura de metanol: ácido acético na proporção 9:1 (v/v). Este processo de lavagem é feito para retirar o analito (TCP) dentro dos poros do MIP, e levou 48 horas. No caso do NIP, apesar de não ter o analito, este também é submetido ao processo, para que possa passar pelas mesmas condições do MIP, para fins de comparação.

Uma vez obtidos os MIPs e NIPs estes foram analisados com o EPCM e por espectrofotometria UV-vis

Para a obtenção dos dados de adsorção, dos MIPs e NIPs com o EPCM foram preparadas soluções de TCP (em tampão fosfato) com diferentes concentrações a cada uma delas foram adicionadas 20 mg de MIP ou NIP. Essas misturas foram

submetidas a agitação durante 24 horas, afim de que haja a interação do analíto com os poros do polímero.

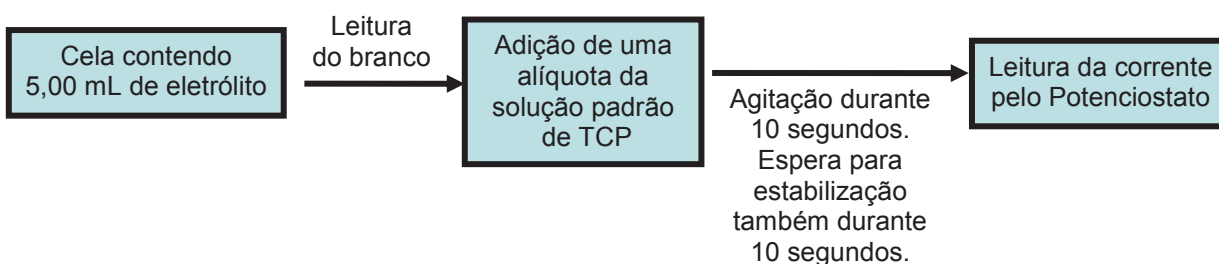
Em seguida com uma seringa e um filtro de seringa usado em HPLC (Chromatil[®]) com poros do tamanho de 0,45 μm , foi separado o sobrenadante de cada uma das misturas. As soluções de TCP obtidas foram preparadas em tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ e pH 6,0 (com concentração na faixa de $8,0 \times 10^{-5}$ à $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹).

As soluções de TCP destinadas as análises pelo espectrofotômetro foram preparadas em metanol para evitar interferentes (com concentração na faixa de aproximadamente 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

3.5. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab[®], usando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl(KCl_{sat}) da Analion[®], um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono modificado como eletrodo de trabalho (sensor biomimético).

Neste sistema de análise 5,00 mL de solução tampão (eletrólito) foram adicionados na cela eletroquímica e a seguir, volume conhecido de uma solução padrão de TCP, era adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos a varredura do potencial iniciava-se em 1,1V e caminhava no sentido catódico até -0,7V. Obtinha-se uma corrente de redução resultante e esta foi relacionada com a concentração de analíto na célula de medida. As leituras eram feitas seguindo o procedimento a seguir (Esquema 2):



Esquema 2. Procedimento realizado para as análises de voltametria de onda quadrada

Após a adição do analito na célula eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador. Para obter os dados eram feitas varias adições e a cada uma delas era repetida a agitação e o tempo de espera relatado no esquema 2 acima. A Figura 19 mostra uma representação esquemática (A) e uma fotografia do sistema de medida (B), usado neste trabalho de mestrado.

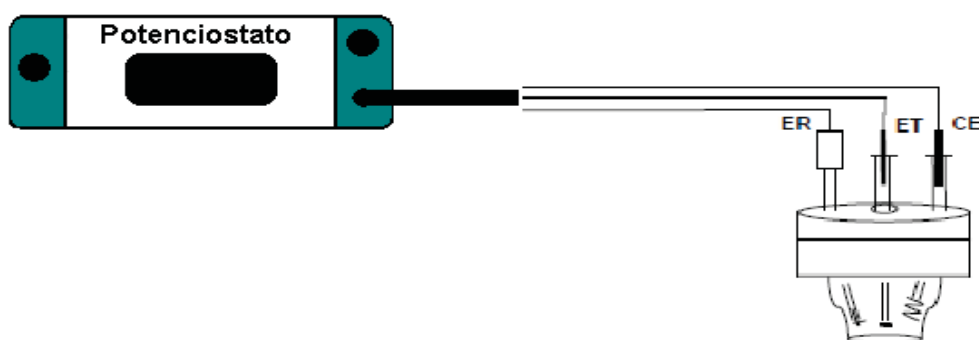


Figura 19. Representação do sistema de análise Esquema representativo ER: eletrodo de referencia Ag|AgCl, ET: eletrodo de trabalho EPCM, CE: contra eletrodo formado por um fio de platina.

3.6. MEDIDAS ESPECTOFOTOMÉTRICAS

Para as análises espectrofotométricas foi usado um espectrofotometro da HP modelo 8453. Nas análises foi usada cubeta de quartzo (transparente ao comprimento de onda usado nas analises do TCP 235 nm) e para este caso, o analito foi dissolvido em metanol, para evitar interferência dos componentes da solução tampão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM COMPLEXO [TKFPcFe]

4.1.1 Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos voltamétricos

Inicialmente foram testados diversos complexos a fim de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção do TCP. Análises usando apenas pasta de carbono não modificada apresentavam um sinal característico de oxidação do TCP em potencial próximo a 0,9 V, indicando que o analito é eletroquimicamente ativo. A fim de diminuir o potencial de oxidação foram testados alguns complexos que são possíveis catalisadores biomiméticos da enzima P450 dentre os que estão: Ftalocianinacobalto (II), ftalocianinacobre (II), *bis*(piridil)ftalocianinaferrosa e 5,10,15,20-tetra*quis*metoxifenilporfirinacobalto (II). Contudo, nenhum deles apresentou melhoria no sinal de corrente de oxidação ou diminuição de seu potencial. Já, ao testar o complexo cloro-5,10,15,20-tetra*quis*(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirinaferro(III) ([TKFPcFe]) o potencial de oxidação também não apresentou diminuição, contudo, foi notado um aumento na corrente de redução com potencial próximo de 0,1 V comparado ao eletrodo de carbono não modificado.

Buscando verificar a necessidade do uso do modificador foram feitos testes de voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica comparando o EPC com o EPCM.

Forem registrados os voltamogramas de onda quadrada mostrados nas Figuras 20A e B para EPC e EPCM respectivamente.

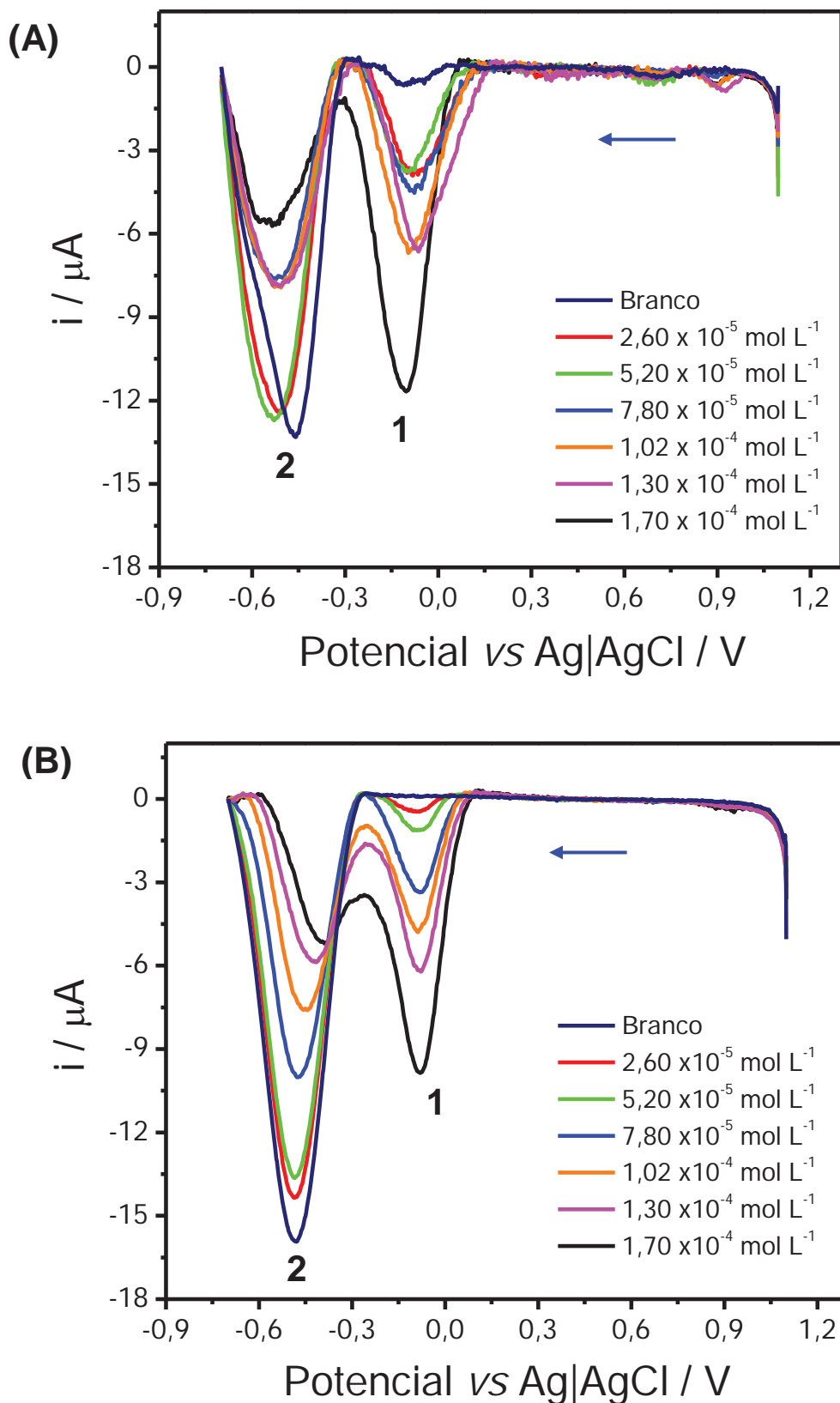


Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada registrados para o EPC (A) e EPCM (B) com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em: Solução tampão Britton Robson (B.R.) $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5); $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento = $1,5 \text{ mV}$. Varredura iniciando em $1,1\text{V}$ até $-0,7\text{V}$.

As varreduras foram feitas no sentido catódico e observaram-se dois picos nos dois casos. O primeiro em torno de -500 mV e o segundo em -100 mV para o EPC e em -80 mV para o EPCM. Um aumento da corrente de redução, correspondente ao analito é verificada no primeiro pico (1), a qual é quantitativa apenas para o sensor, já que no EPC se observa apenas um incremento aleatório da corrente com a adição de TCP. Assim, ao comparar os voltamogramas das Figuras 20A e 20B, é possível justificar a presença do TKFPcFe na pasta de carbono, pois a uma maior linearidade ao usar esse complexo de ferro.

Também foram registrados voltamogramas cíclicos para o EPC e o sensor, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 21 e 22.

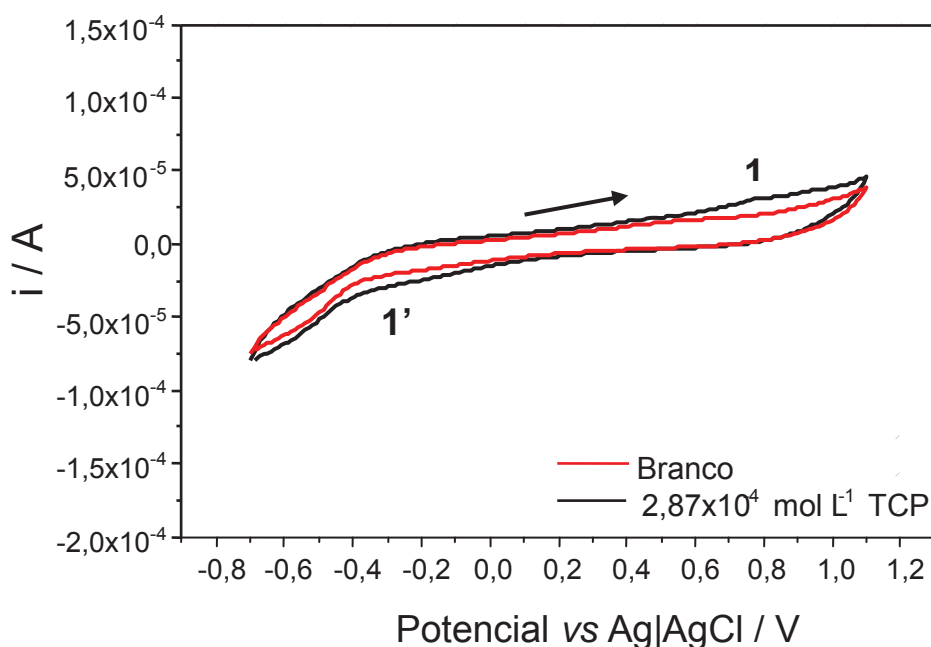


Figura 21. Voltamogramas cíclicos para o EPC na presença de TCP. Medidas realizada em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e velocidade de varredura (v) de 10 mV s^{-1} . Varredura efetuada entre $-0,7\text{V}$ à $1,1\text{V}$

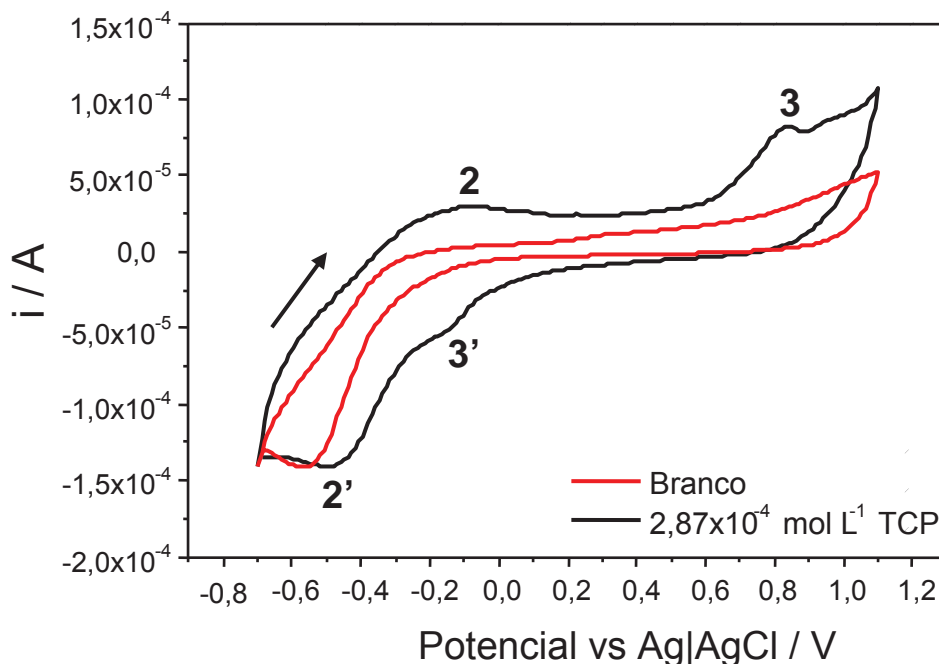


Figura 22. Voltamogramas cíclicos para o sensor na presença de TCP. Medidas realizada em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e velocidade de varredura (v) de 10 mV s^{-1} . Varredura efetuada entre $-0,7\text{V}$ à $1,1\text{V}$.

Observando os voltamogramas cíclicos tanto com o EPC quanto para o EPCM, podem ser identificados picos referentes à oxidação do analito (que é eletroquimicamente ativo) em potenciais próximo a 800 mV (picos 1 e 3, para EPC e sensor respectivamente), que para fins analíticos é muito elevado para obter medidas seletivas. Observa-se também um pequeno pico (na forma de ombro) iniciando em aproximadamente -150 mV ($1'$ e $3'$, para EPC e sensor, respectivamente), o qual é mais intenso no sensor. Os picos 2 (Fe^{3+}) e $2'$ (Fe^{2+}) correspondem ao par redox do Fe no complexo imobilizado na pasta de carbono, visto que nenhum desses picos é observado na Figura 21. O par correspondente ao íon ferroso no complexo somente é observado após a adição do analito.

Fazendo uma comparação entre os voltamogramas da Figura 22, especificamente em relação ao pico $3'$ da curva preta, com os voltamogramas de onda quadrada (VOQ) da Figura 20(B) (pico 1), observa-se que a quantificação do TCP seria mais promissora e seletiva nesses potenciais de redução, quando comparado ao valor de $+800 \text{ mV}$ da oxidação, visto que na VOQ o pico correspondente ao analito aparece em aproximadamente -80 mV .

Pelo exposto anteriormente, é evidente que a presença do complexo na pasta traz vantagens na detecção de TCP, o que justifica o uso do complexo cloro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina-ferro (III) na preparação dos sensores.

É conhecido pela literatura que existe um sinal de redução do oxigênio em $-0,200$ V característico para biossensores⁶⁰, assim, a fim de avaliar a interferência do oxigênio no sensor proposto foram feitos testes na presença e ausência de O₂. Análises voltamétricas na presença e na ausência de oxigênio dissolvido estão representadas na Figuras 23 e 24, respectivamente.

No primeiro pico observa-se uma diminuição da corrente conforme aumenta a concentração do TCP, este pico pode ser atribuído a dois fatores: algum contaminante contido no grafite e à redução do oxigênio no meio de medida, pois aparece tanto no EPC (Figura 20A) quanto no sensor contendo o complexo (Figura 20B), e também continua aparecendo mesmo na ausência de oxigênio, tal como se observa na Figura 23(A), que foi obtida já nas condições otimizadas para a resposta do sensor.

Pode ser claramente observado que mesmo na ausência de oxigênio o pico 2 (Figura 23) ainda prevalece, embora que com menor intensidade quando comparado à Figura 24, na qual há O₂ dissolvido. Por outro lado, observa-se que em meio anaeróbico o sinal correspondente ao TCP cai significativamente, sugerindo que o oxigênio faça parte da reação eletroquímica entre o complexo de ferro e o analito, tal como ocorre no caso de enzimas oxigenases e em outros sistemas biomiméticos, nos quais há formação de um complexo peroxo- ou oxy-, entre o metal e o oxigênio, e que corresponde à espécie ativa para a realização da catálise, o que explicaria a grande diminuição do pico 1 (Figura 24), após cada adição de TCP, pois mais oxigênio do meio deverá ser usado para formar a espécie ativa na superfície do eletrodo.

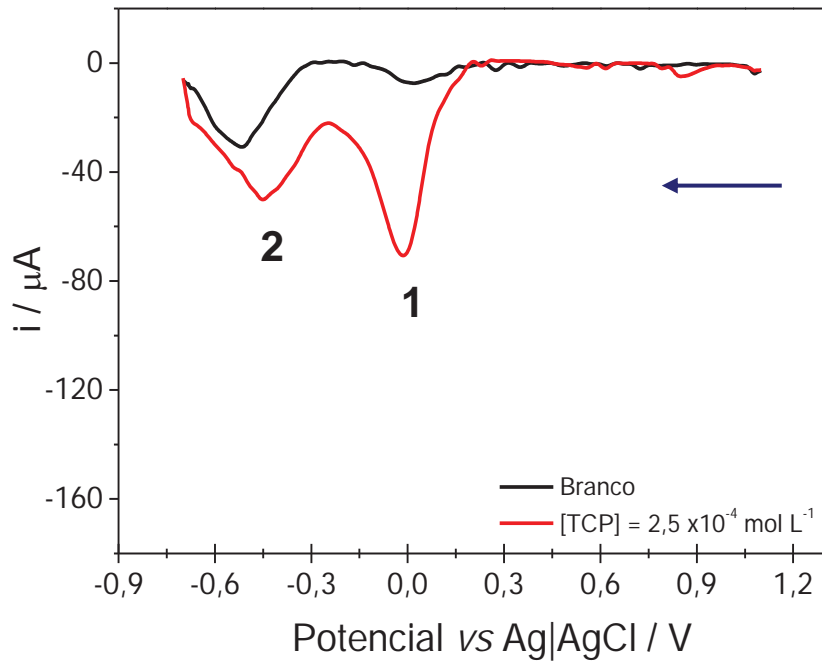


Figura 23. Perfil de resposta do sensor na ausência de oxigênio. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; frequência de 50 Hz. A eliminação do O_2 foi realizada borbulhando N_2 na cela de medida durante 20 min. Varredura iniciando em 1,1V até -0,7V.

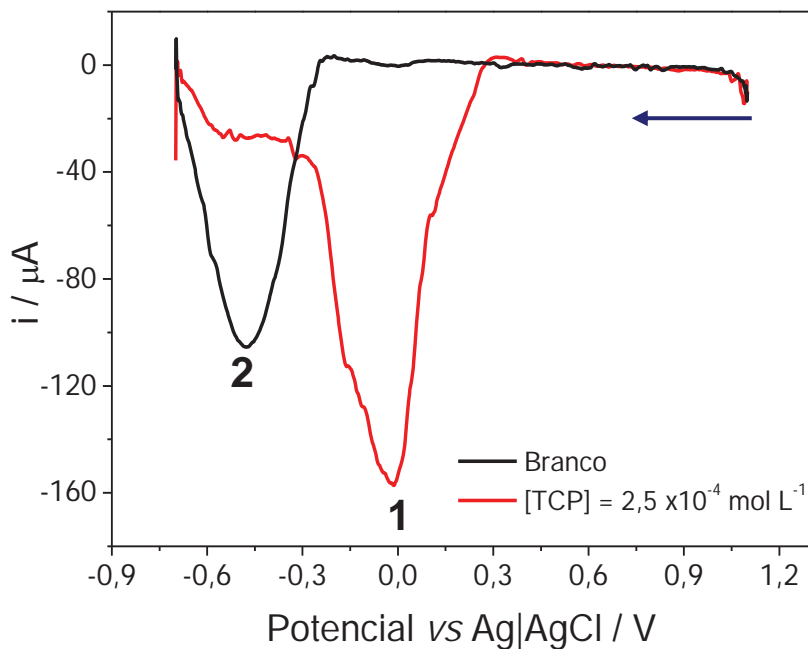


Figura 24. Perfil de resposta do sensor na presença de oxigênio. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; frequência de 50 Hz. Varredura iniciando em 1,1V até -0,7V.

Desta forma, além de ser mais prático, a presença do oxigênio na cela de medida aumentará a sensibilidade do sensor proposto. Assim, todas os experimentos foram realizados em meio aeróbio.

4.1.2. Otimização da resposta do sensor

No estudo de otimização do sensor para TCP foi empregada à técnica voltamétrica de onda quadrada (VOQ). Nestes estudos, buscou-se encontrar os parâmetros que permitissem obter maior sensibilidade, e seletividade das medidas. Para isto, parâmetros como, tampão, pH e concentração do eletrólito foram verificados; assim como os parâmetros relacionados à VOQ que permitissem obter as melhores respostas.

Foram feitos teste para averiguar em qual valor de pH a sensibilidade do sensor seria maior. Os valores de pH testados foram 5,0; 6,0; 7,5 e 8,0 e a sensibilidade referente a cada pH esta representado na Figura 25. É importante enfatizar que a sensibilidade esta relacionada com o coeficiente angular obtida na curva analítica.

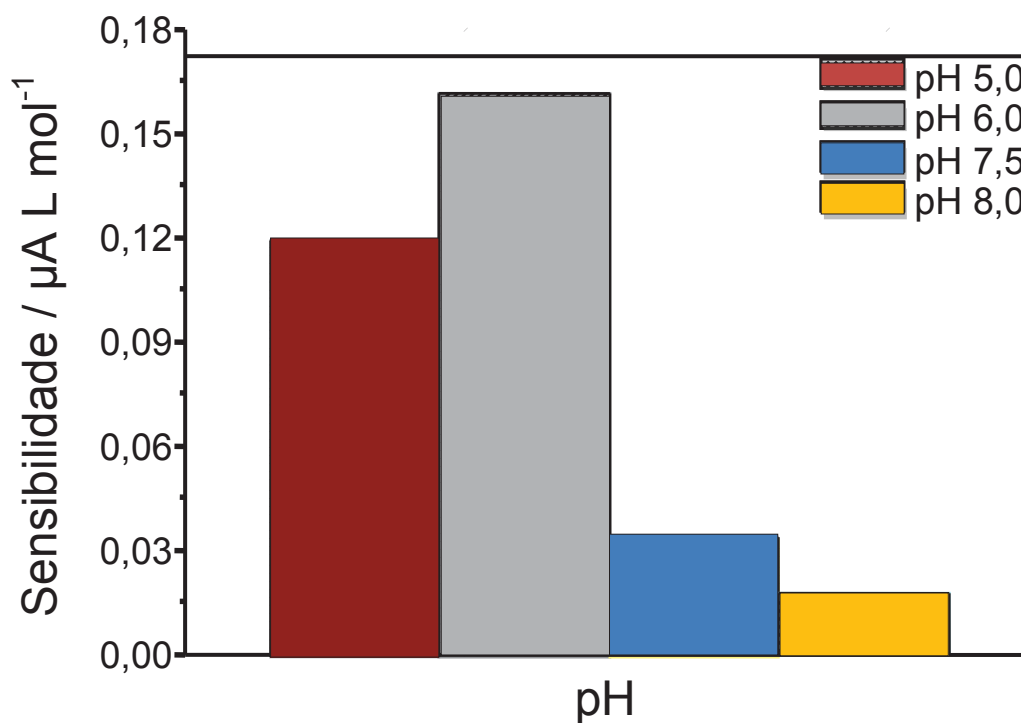


Figura 25. Perfil da sensibilidade apresentada pelo sensor proposto em função do pH. Medidas realizadas em tampão B.R. $0,08 \text{ mol L}^{-1}$.

O melhor resultado foi obtido em pH 6,0; e os voltamogramas e a correspondente curva analítica, estão representados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

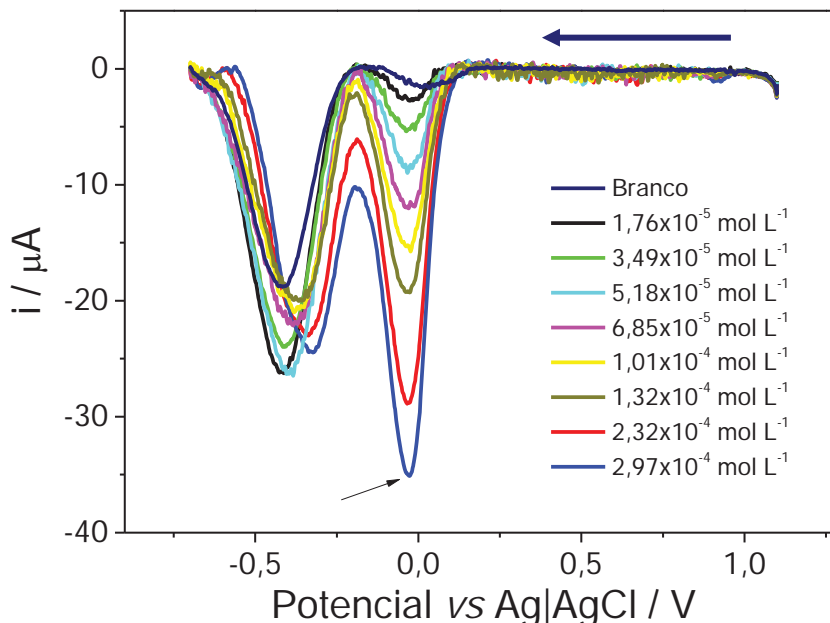


Figura 26. Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão B.R. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento= $1,5 \text{ mV}$. Varredura efetuada iniciando em $1,1\text{V}$ à $0,7\text{V}$.

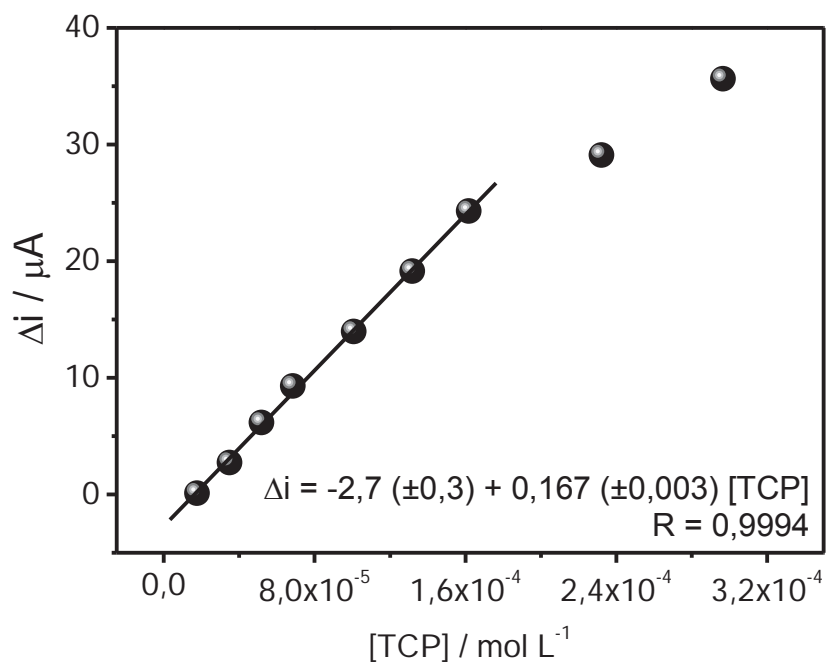


Figura 27. Curva analítica referente aos voltamogramas representados na Figura 26.

Após a verificação do melhor valor de pH para as medidas, este foi fixado e em seguida foi avaliado o tipo de tampão que permitiria aumentar mais a sensibilidade do sensor. O tampão fosfato, B.R. e Pipes foram analisados, e foi observado que com o tampão fosfato obteve-se maior sensibilidade (Figura 28). O voltamograma e a curva analítica referente ao tampão fosfato com pH 6,0 estão representadas nas Figuras 29 e 30.

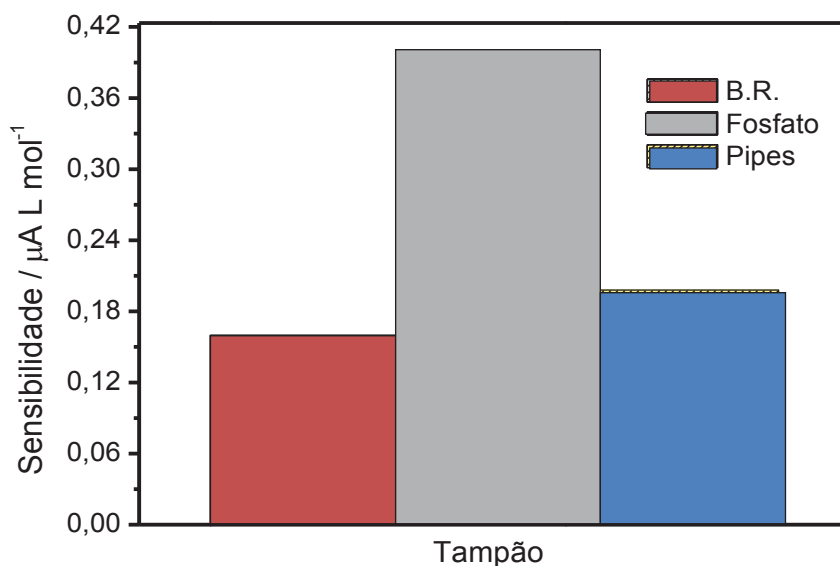


Figura 28. Resposta apresentada pelo sensor proposto em função do tipo de tampão. Medidas realizadas em tampões $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 20,0 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV , incremento = $1,5 \text{ mV}$.

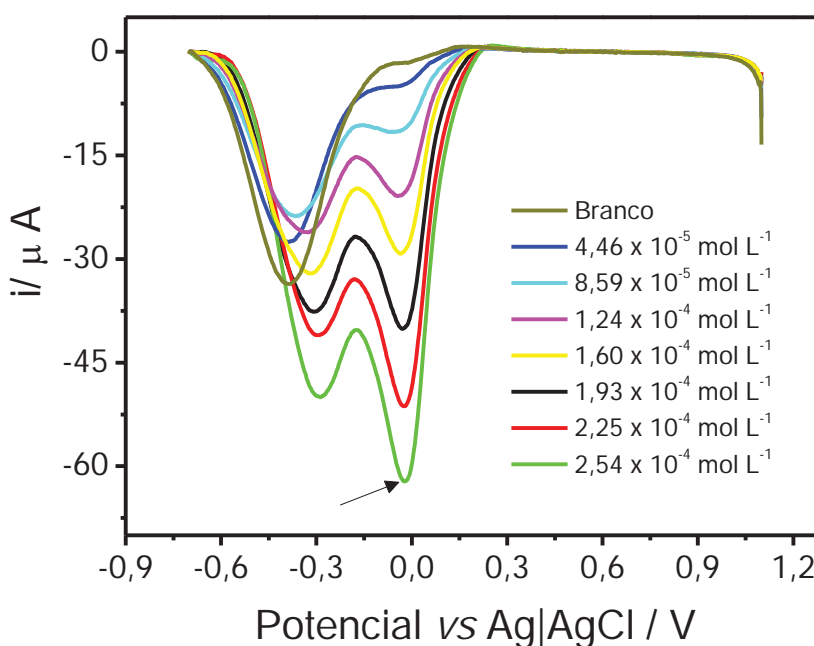


Figura 29. Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; $f = 20 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento= $1,5 \text{ mV}$. Varredura efetuada iniciando em $1,1\text{V}$ à $0,7\text{V}$.

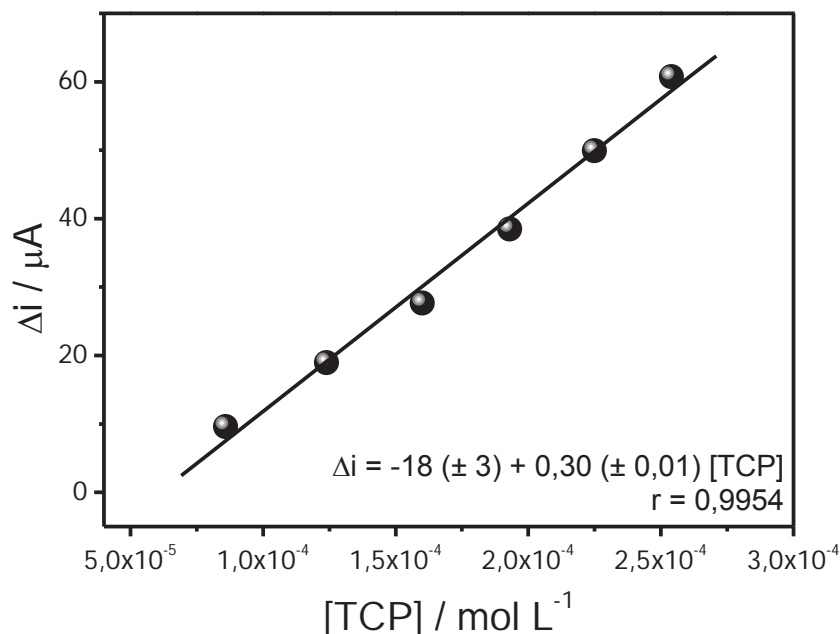


Figura 30. Curva analítica referente aos voltamogramas representados na Figura 29.

Com o tampão e o pH selecionados através da maior sensibilidade obtida usando as correspondentes curvas analíticas, buscou-se avaliar qual a concentração do tampão que contribui para o melhoramento no coeficiente angular (sensibilidade).

Para tal, foram testadas quatro concentrações do tampão fosfato: 0,05; 0,10; 0,20 e 0,30 mol L⁻¹. A concentração em que se obteve melhor resposta analítica foi com 0,20 mol L⁻¹ (Figura 31).

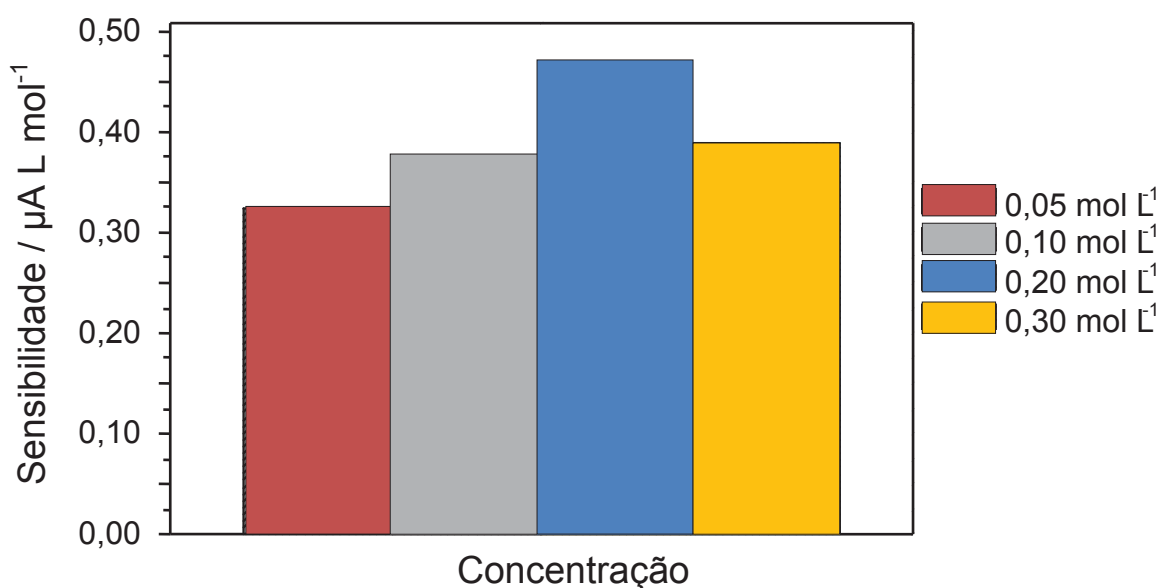


Figura 31. Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão fosfato.

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas que apresenta maior sensibilidade. Visando otimização das medidas foram feitos testes utilizando frequências de: 8, 20, 40, 50 e 60 Hz.

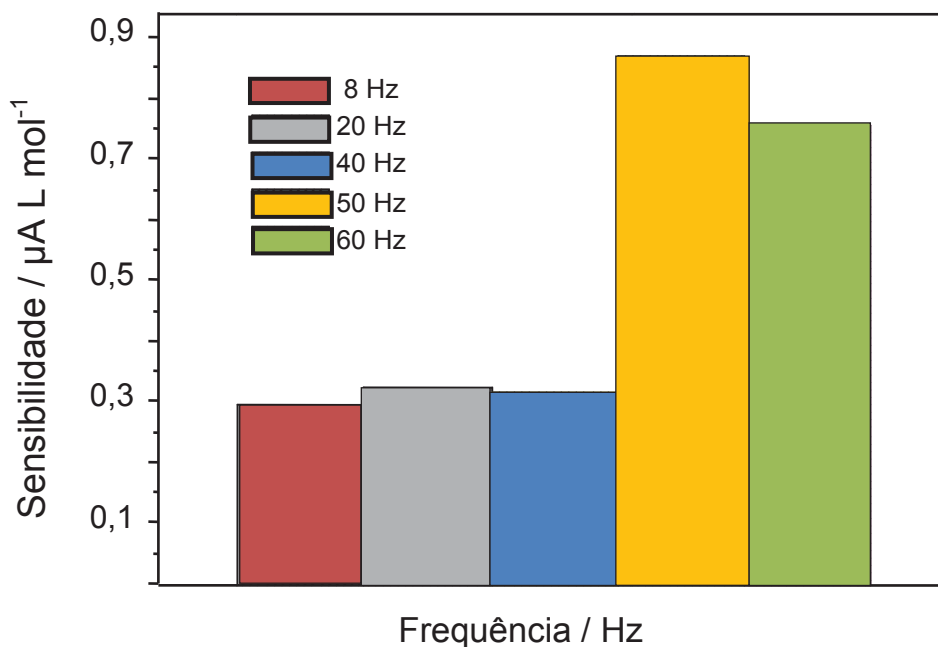


Figura 32. Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da frequência. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0; amplitude = 150 mV e incremento = 1,5 mV.

A Figura 32 compara os coeficientes angulares (sensibilidade) obtidos para diferentes valores de frequência utilizando-se as condições experimentais até aqui otimizadas. Observa-se que na frequência de 50 Hz obteve-se o melhor resultado em relação à sensibilidade, e foi a usada nos experimentos seguintes.

Os dados correspondentes a esta frequência estão representados nas Figuras 33 e 34.

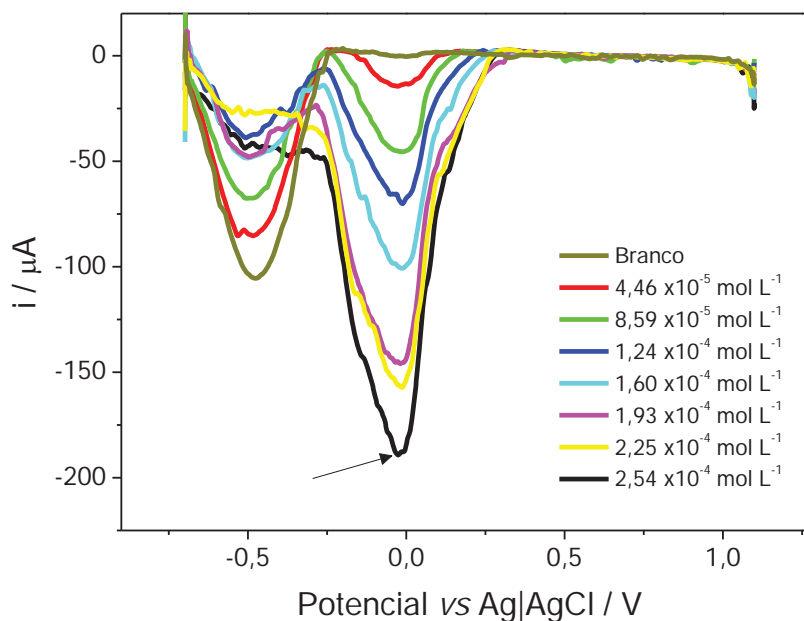


Figura 33. Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ e pH 6,0; $f = 50$ Hz, amplitude = 150 mV e incremento = 1,5 mV. Varredura efetuada iniciando em 1,1 V à -0,7 V.

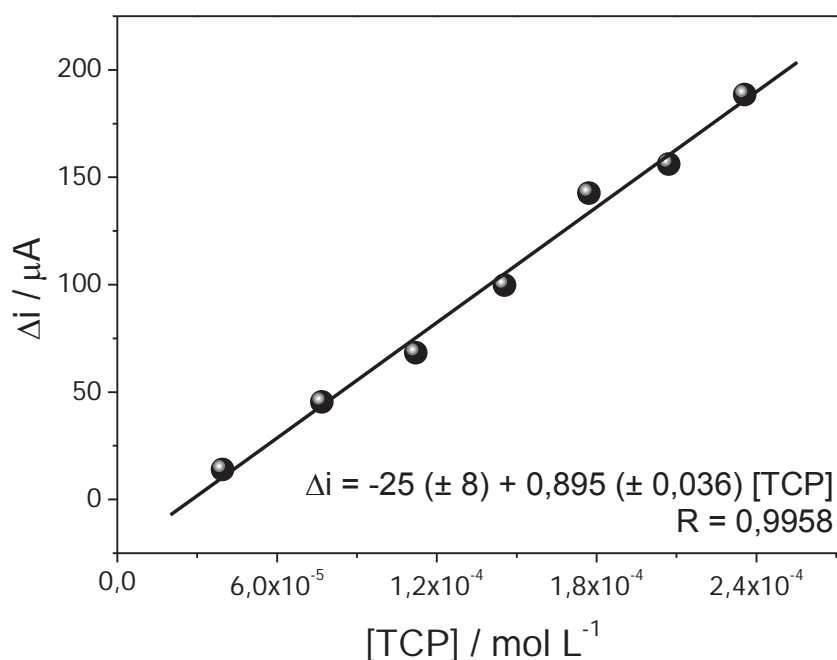


Figura 34. Curva analítica referente aos voltamogramas representado na Figura 33.

Os valores de amplitude 75 mV, 150 mV e 300 mV são comparados utilizando-se as condições experimentais até aqui otimizadas. Na Figura 35 está representado um voltamograma de onda quadrada obtido com amplitude de 300 mV.

Cabe ressaltar que os valores obtidos para as sensibilidades usando 150 e 300 mV de amplitude foram praticamente os mesmos, ao serem comparadas as curvas analíticas obtidas com os respectivos voltamogramas como mostrado nas curvas analíticas apresentadas nas Figuras 34 e 37, respectivamente.

Foram feitos também testes para amplitude de 75 mV e o resultado obtido para a sensibilidade da curva analítica foi praticamente três vezes menor do que o de 150 e 300 mV.

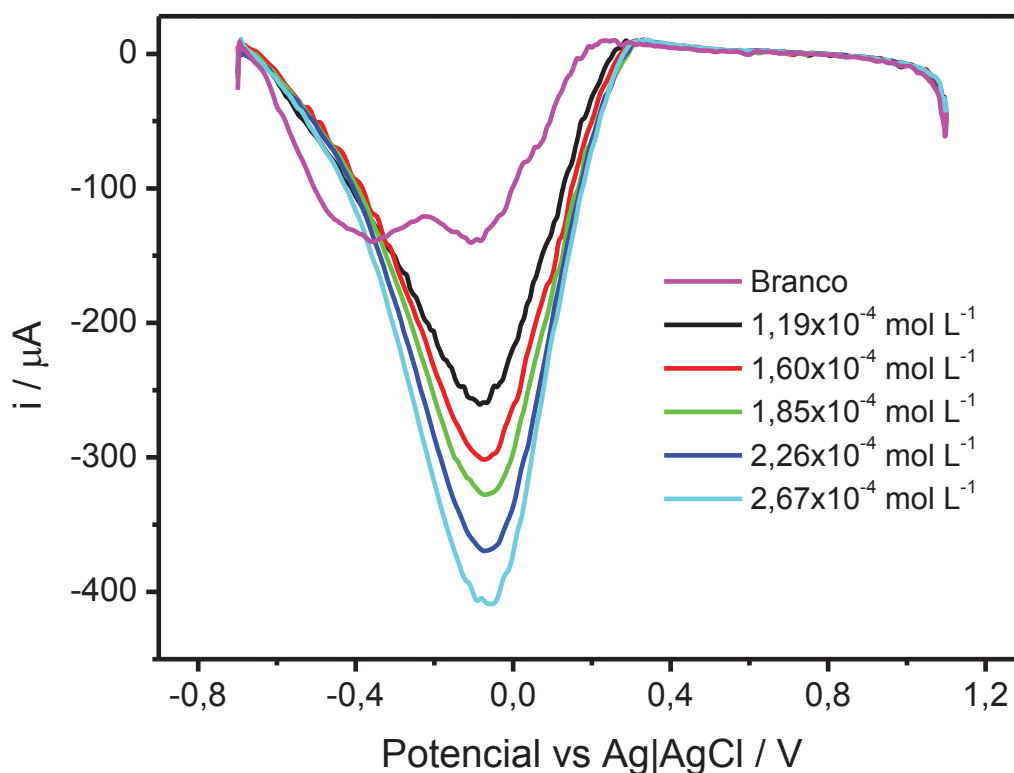


Figura 35. Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ e pH 6,0; f = 50 Hz, amplitude = 300 mV e incremento = 1,5 mV. Varredura efetuada iniciando em 1,1V à 0,7V.

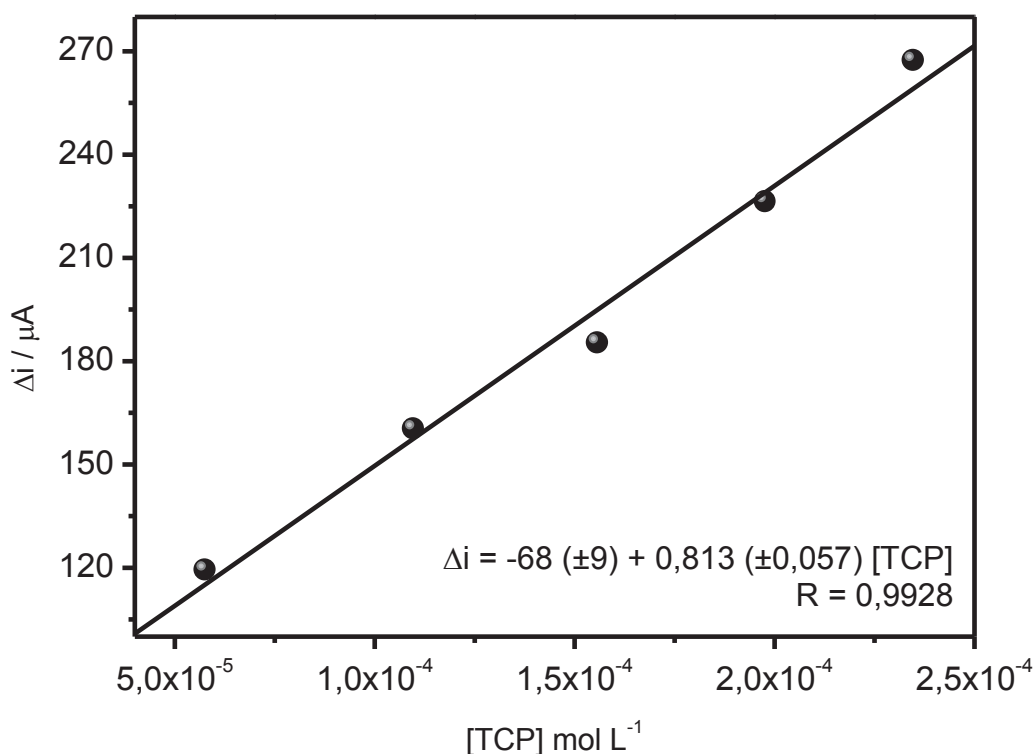


Figura 36. Curva analítica referente aos voltamogramas representado na Figura 35.

O critério usado para selecionar a melhor amplitude entre 150 e 300 mV, já que ambas apresentaram sensibilidades próximas, foi que na amplitude de 150 mV o pico da onda quadrada referente ao TCP é mais estreito e definido (Figura 33) e é possível separá-lo do pico relacionado ao oxigênio, diferente da amplitude de 300 mV, em que os dois sinais de redução, tanto do oxigênio quanto do TCP, se superpõem, alargando o pico (Figura 35), desta forma buscando uma melhor resolução de pico e principalmente seletividade, fixou-se como condição otimizada a amplitude de 150 mV.

Para as demais análises foram estabelecidas as seguintes condições otimizadas: tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹; pH 6,0; f = 50 Hz, amplitude = 150 mV e incremento = 1,5 mV.

4.1.3. Características Analíticas do sensor

Uma vez otimizados os parâmetros para obter a melhor resposta do sensor foi construída uma curva analítica para verificar a faixa de resposta, sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A Figura 37 mostra o perfil de resposta do sensor para adições sucessivas de TCP nas condições otimizadas e na Figura 38 é mostrada a respectiva curva analítica.

Os pontos da curva analítica se ajustaram a uma reta na faixa de concentrações entre $4,5 \times 10^{-5}$ e $7,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, através da equação (1)

$$\Delta i = -57(\pm 4) + 711.165(\pm 8552)[\text{TCP}] \quad (1)$$

com um coeficiente linear de 0,9983 para $n = 24$ e uma sensibilidade de $711.165 \pm 8.552 \mu\text{A L mol}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo os parâmetros estabelecidos pela IUPAC⁶¹ obtendo os valores de $1,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente para o LD e o LQ.

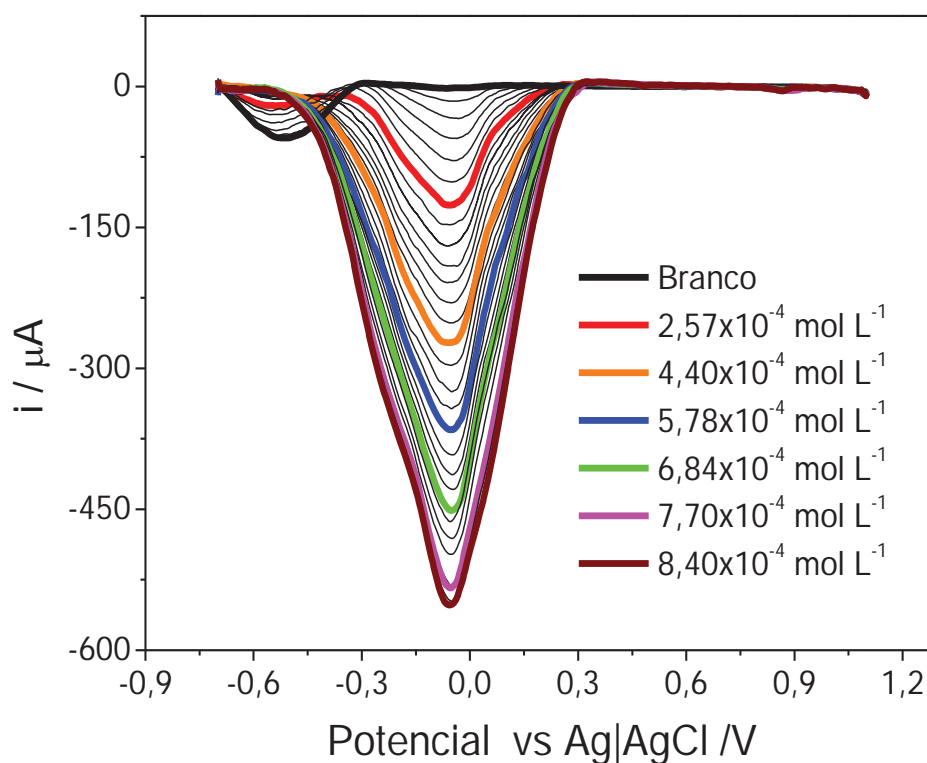


Figura 37. Perfil voltamétrico para o sensor proposto com adições sucessivas de TCP nas condições otimizadas. Varredura efetuada iniciando em 1,1V à -0,7V.

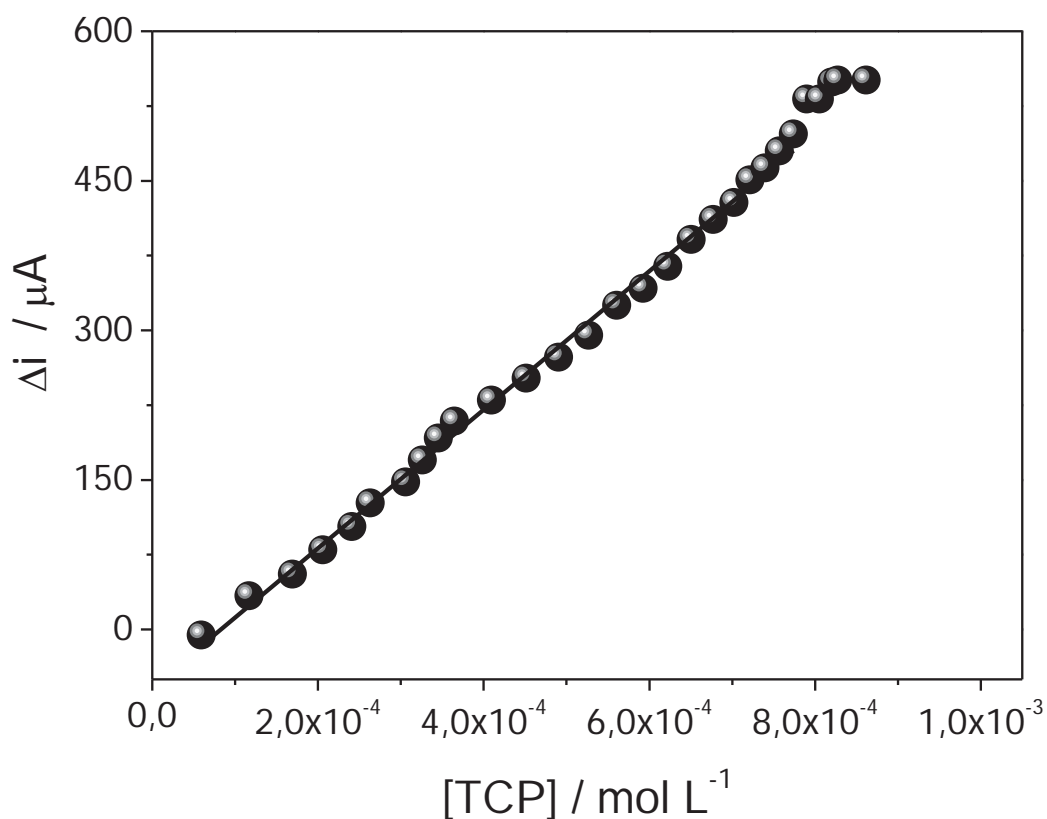


Figura 38. Curva analítica obtida com os voltamogramas da Figura 37.

Para estimar o tempo de vida do eletrodo, foi preparada uma pasta de carbono, e a mesma foi usada durante 40 dias. O monitoramento foi realizado fazendo sete adições sucessivas de TCP e plotando a correspondente uma curva analítica, de onde foi retirado o valor da sensibilidade, este processo foi repetido sete vezes em cada dia, ou seja, obtendo-se sete curvas analíticas (49 pontos/dia), das quais foi calculada a média das sensibilidades, e os resultados obtidos estão plotados na Figura 39.

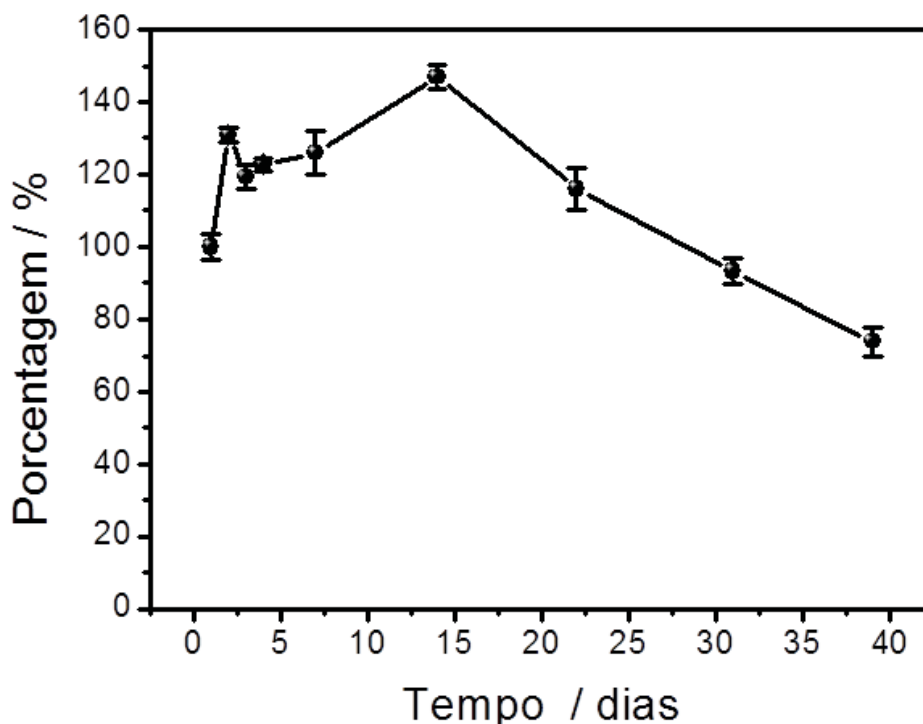


Figura 39. Gráfico obtido, mostrando a estimativa do tempo de vida do sensor proposto. A porcentagem no eixo “Y” refere-se ao valor da sensibilidade no primeiro dia do estudo.

Os dias monitorados foram: 1º, 2º, 3º, 4º, 7º, 14º, 22º, 31º e 39º e como dito anteriormente cada análise foi repetida sete vezes por dia, perfazendo um total de aproximadamente 500 leituras e durante estas análises somente no ultimo dia (39º) o sinal ficou abaixo de 70% da sensibilidade inicial, mostrando que o sensor possui uma vida útil de aproximadamente um mês.

É possível notar um aumento da sensibilidade no décimo quarto dia em que o sinal chega a 40% a mais do inicial, uma possível explicação é que, nesse dia ao lixar a superfície do eletrodo uma área de concentração maior de complexo foi exposta aumentando, portanto, a sensibilidade. A seguir, o sinal diminui, com o passar do tempo, até chegar ao 39º dia. É importante salientar que após o final de cada conjunto de experimentos (ou seja, de cada curva analítica com sete adições cada uma delas) o sensor foi lavado retirado da cela de medida, polido em uma folha de papel sulfite limpa para renovar a superfície e realizado o seguinte experimento ou se não armazenado a seco, até o seguinte dia de análises.

A repetibilidade do sensor foi avaliada em termos do valor do desvio padrão médio relativo (RSD). Nas medidas intradia, foi calculada uma variação de 7,5 % e

para as medidas interdia dias (2^o – 5^o dias da Figura 41) calculou-se um valor de 4,8 %.

4.1.4. Estudos relacionados à resposta biomimética do sensor.

4.1.4.1. Avaliação da seletividade do sensor

Com a finalidade de avaliar a seletividade do sensor proposto foram testados 5 pesticidas amplamente usados, além do TCP. Porém, como a grande parte dos agrotóxicos possui baixa solubilidade em meio aquoso, apenas foram aproveitadas as soluções “saturadas” dos mesmos em solução tampão, não permitindo conhecer exatamente sua concentração. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos.

Tabela 6. Agrotóxicos e o metabólito analisados no estudo da seletividade.

Agrotóxicos	Sinal Analítico	Concentração
2,4-D	n.d.	Solução saturada
Carbofurano	n.d.	Solução saturada
Clorpirifós	n.d.	Solução saturada
Metribuzim	n.d.	Solução saturada
Profenofós	n.d.	Solução saturada
TCP	Sim	10 ⁻⁵ mol L ⁻¹

n.d = não detectado

Pode ser observado (Tabela 6) que o sensor não apresentou resposta para nenhum dos agrotóxicos testados. Mostrando seletividade em relação a estes tipos de analitos, na Figura 40 estão representadas as estruturas dos agrotóxicos avaliados.

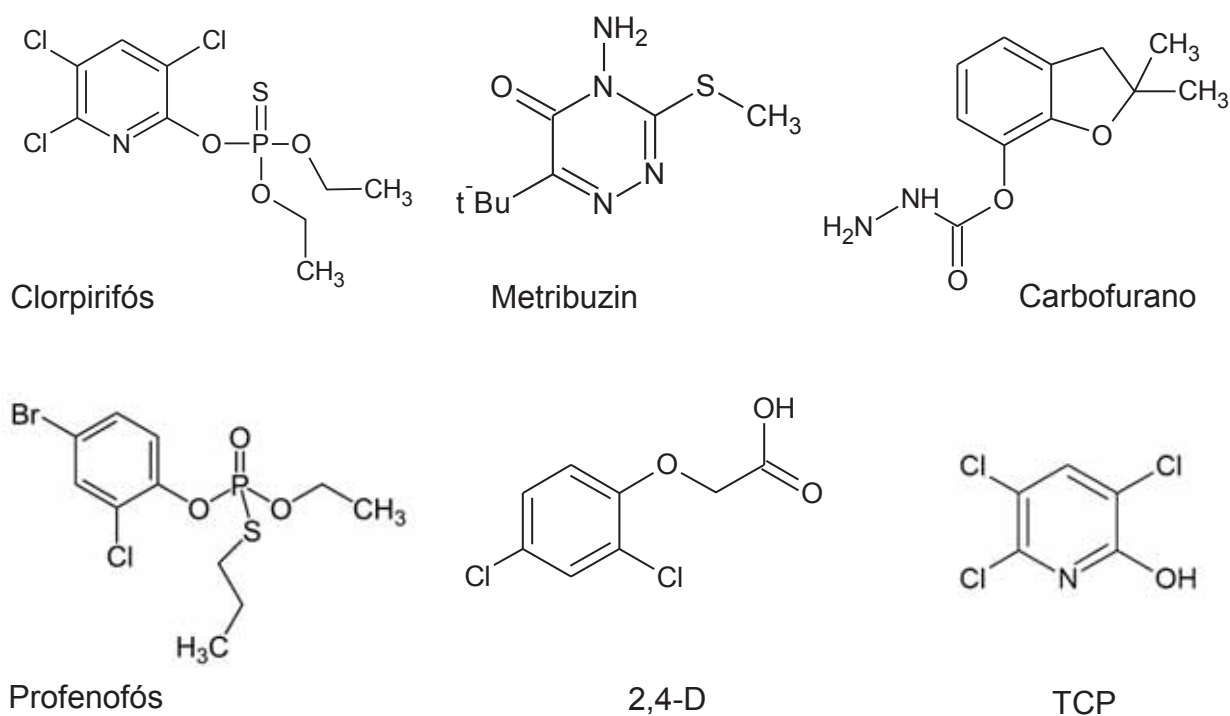


Figura 40: Estruturas químicas do TCP e dos agrotóxicos avaliados no estudo da seletividade do sensor.

4.1.4.2. Cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}), através do gráfico do duplo recíproco.

Primeiramente visando verificar se o sensor proposto apresenta um comportamento similar aos sensores enzimáticos, o perfil de resposta foi avaliado até a região da saturação. Com esse gráfico foi plotado o gráfico do duplo recíproco⁶², mostrado na Figura 41, o qual permitiu calcular a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app})^{49,51,52}.

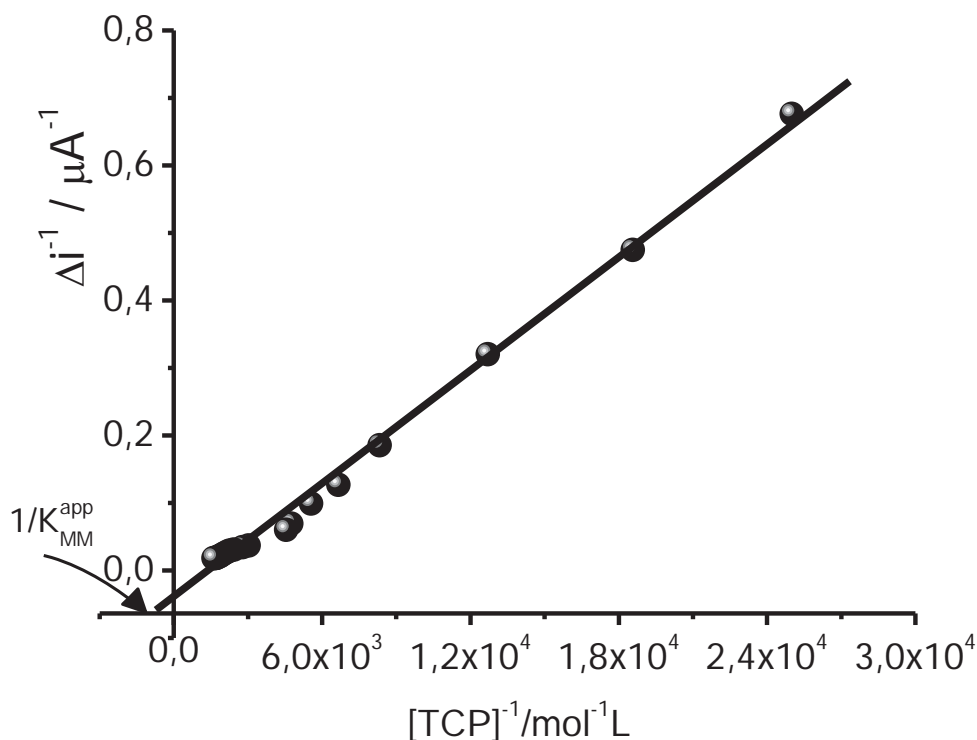


Figura 41. Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para cálculo da K_{MM}^{app} .

Com base nos resultados obtidos nas Figuras 22 e 23 que sugerem que a redução do TCP é eletrocatalítica; com base nos resultados obtidos da seletividade do sensor para TCP (4.1.4.1.); com base na Figura 38 que sugere que a resposta do sensor é hiperbólica; e com base no valor da constante aparente de Michaelis-Menten (Figura 41) de $7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com ordem de grandeza esperada para sistemas enzimáticos e biomiméticos (a constante relacionada a enzima acetilcolinesterase possui valor na faixa de $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para seu substrato), que indica uma alta afinidade entre o complexo de ferro e o TCP; pode-se concluir que o sensor construído à base do complexo TKFPcFe, trata-se de um sensor biomimético.

4.1.4.3. Caracterização eletroquímica do sensor usando voltametria cíclica

Foram registrados voltamogramas cíclicos com o sensor para TCP em diferentes velocidades de varredura a 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1} com a finalidade de verificar quais processos ocorrem na superfície do sensor.

A Figura 42 mostra os resultados obtidos ao variar a velocidade de varredura nas voltametrias cíclicas na faixa entre 2 e 100 mV s^{-1} .

A partir desses experimentos foi possível obter informações que mostram a existência de uma dependência linear entre a corrente de pico catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura em toda a faixa estudada (2 a 100 mV s^{-1}) indicando que a redução do TCP na superfície do sensor é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo (Figura 43).

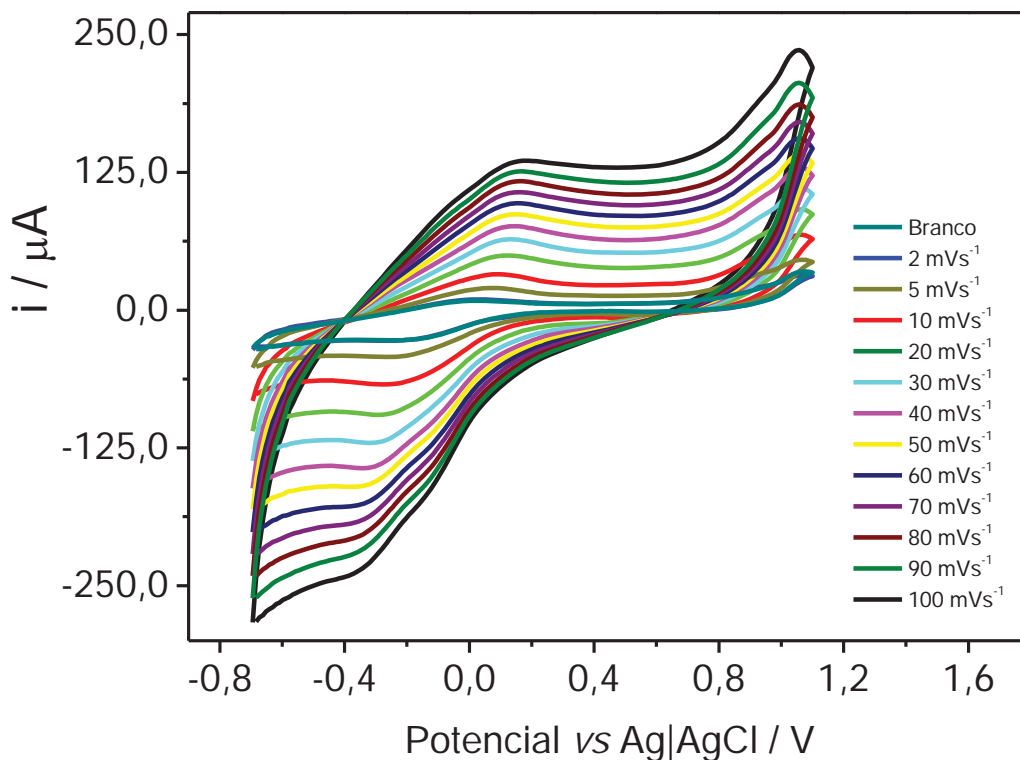


Figura 42. Voltamogramas cíclicos para varreduras efetuadas em diferentes velocidades. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) com concentração de TCP de $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Quando plotado o gráfico da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($i_{pc}/v^{1/2}$) vs v (Figura 43) o perfil obtido sugere fortemente que o processo de redução do TCP é eletrocatalítico do tipo EC (electrochemical/chemical), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada ao processo eletroquímico (Figura 44).

Os resultados obtidos sugerem que o sensor esteja se comportando como biomimético, pois apresenta alta afinidade e seletividade pelo TCP, assim como sugere um perfil catalítico para a redução do TCP quando usado o complexo de ferro na preparação do sensor.

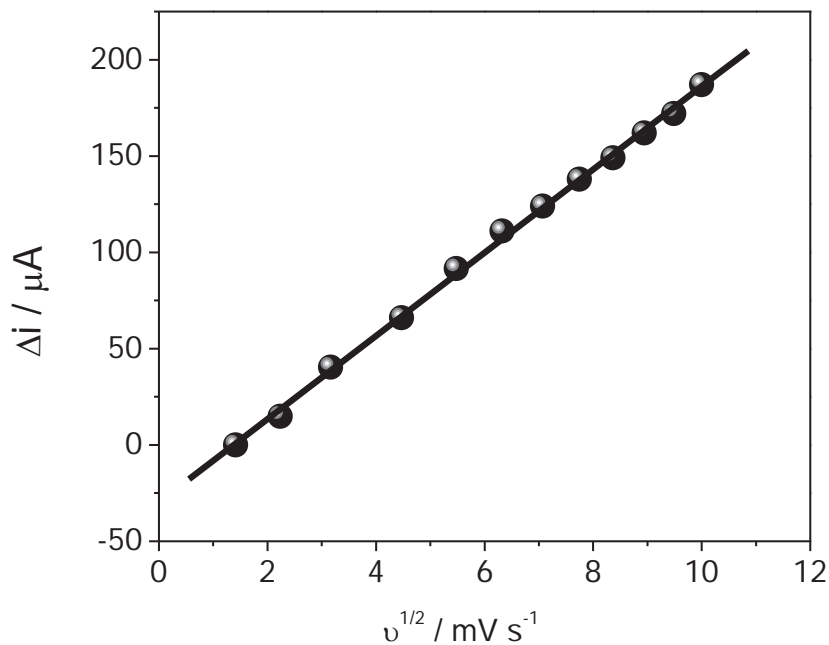


Figura 43. Variação da corrente de pico catódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de ferro e na presença do TCP. Indicando que o movimento do analito até a superfície do eletrodo é controlado por difusão. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) concentração de TCP de $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

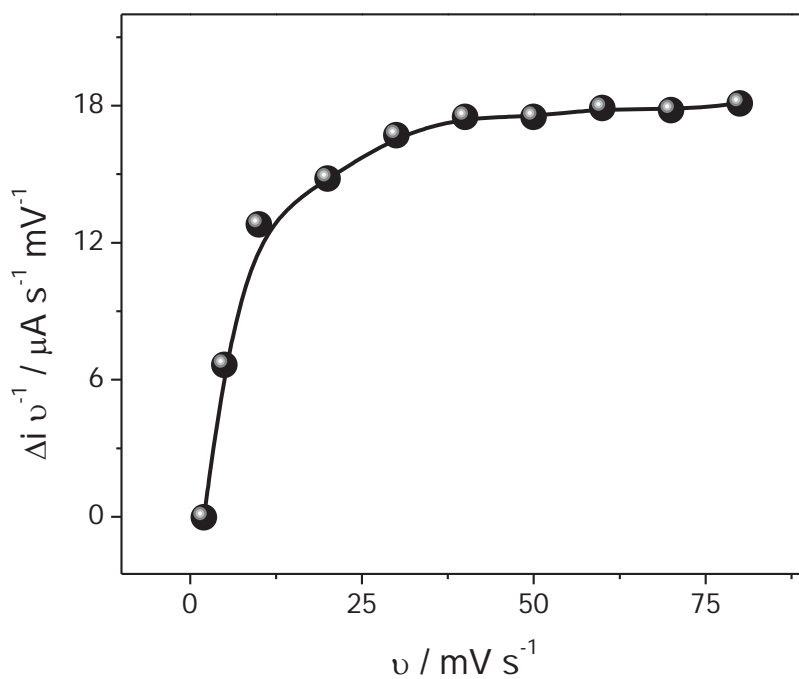


Figura 44. Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Indicando um perfil catalítico. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) concentração de TCP de $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.5. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras de interesse ambiental.

O sensor proposto foi avaliado em análises de solos e águas superficiais e subterrâneas enriquecidas com TCP, para verificar sua possibilidade de aplicação neste tipo de amostras, e os resultados obtidos estão descritos a seguir.

4.1.5.1. Análise de solos

Para o cálculo de recuperação foi usado o método da calibração externa ou curva analítica, e para tal, foi construída uma curva analítica (Figura 46) com os voltamogramas mostrados na Figura 45(A). Em seguida o eletrodo foi lavado com água destilada e novamente colocado na cela de medida contendo a amostra enriquecida com TCP obtendo-se o voltamograma representado na Figura 45(B).

Para o cálculo da recuperação usou-se a equação (2) da reta ($R = 0,9964$)

A partir da variação da corrente obtida da Figura 45(B) e usando a equação (2) acima foram obtidos os valores de recuperação mostrados na Tabela 7.

$$\Delta i = 1,85 \pm (0,0698)[\text{TCP}] - 2,82 \times 10^{-6} \pm (4,32 \times 10^{-6}) \quad (2)$$

Tabela 7. Dados obtidos na cela de medida para a recuperação de TCP em amostras de solo enriquecidas.

[TCP] / mol L ⁻¹		Recuperação / %
Adicionada	Encontrada	
6,50 x 10 ⁻⁵	5,94 x 10 ⁻⁵	91

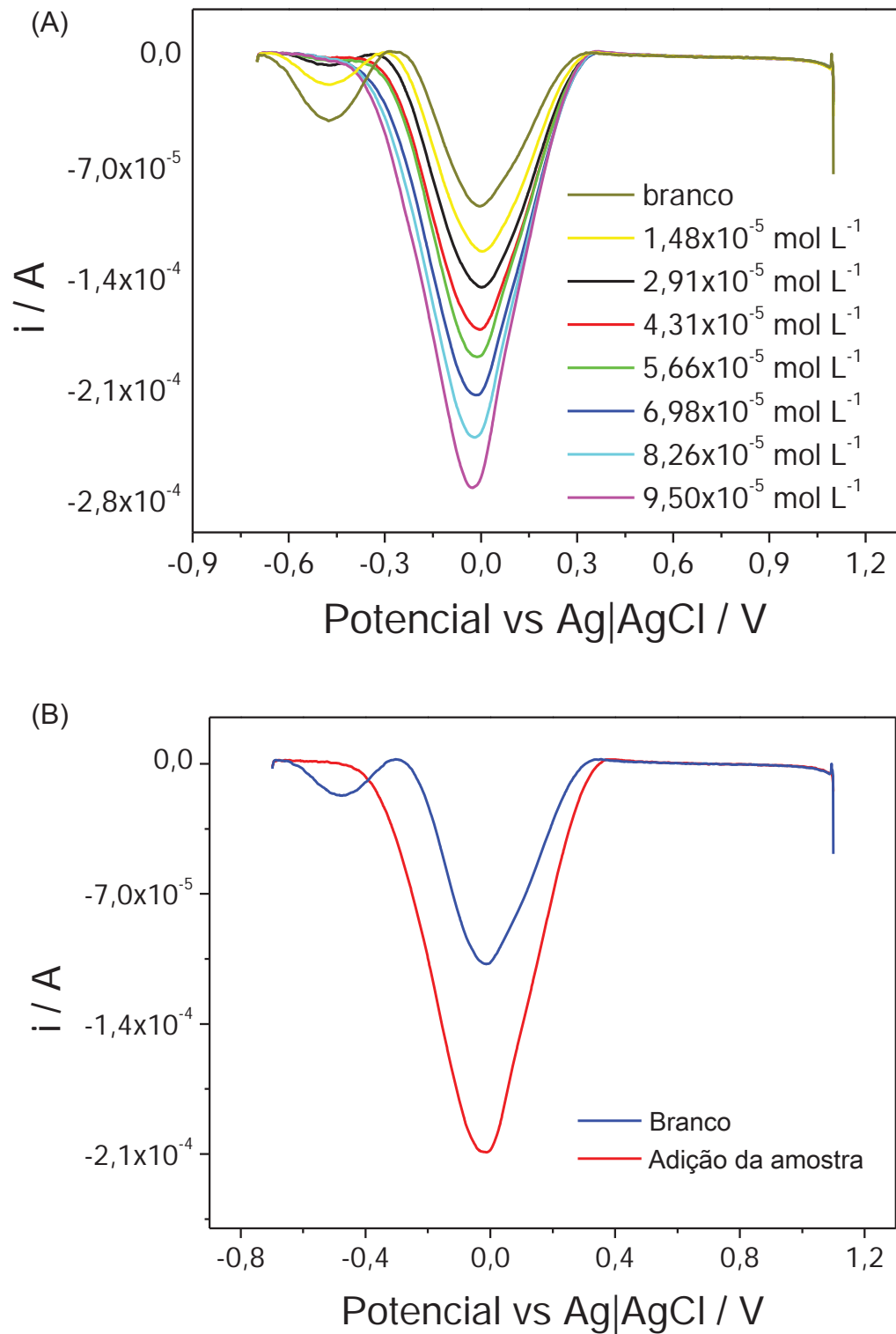


Figura 45. Voltamogramas (A) adições sucessivas de TCP (B) adição da amostra problema. Medidas realizadas $f = 50 \text{ Hz}$, amplitude = 150 mV e incremento = $1,5 \text{ mV}$. Varredura efetuada iniciando em $1,1\text{V}$ à $-0,7\text{V}$.

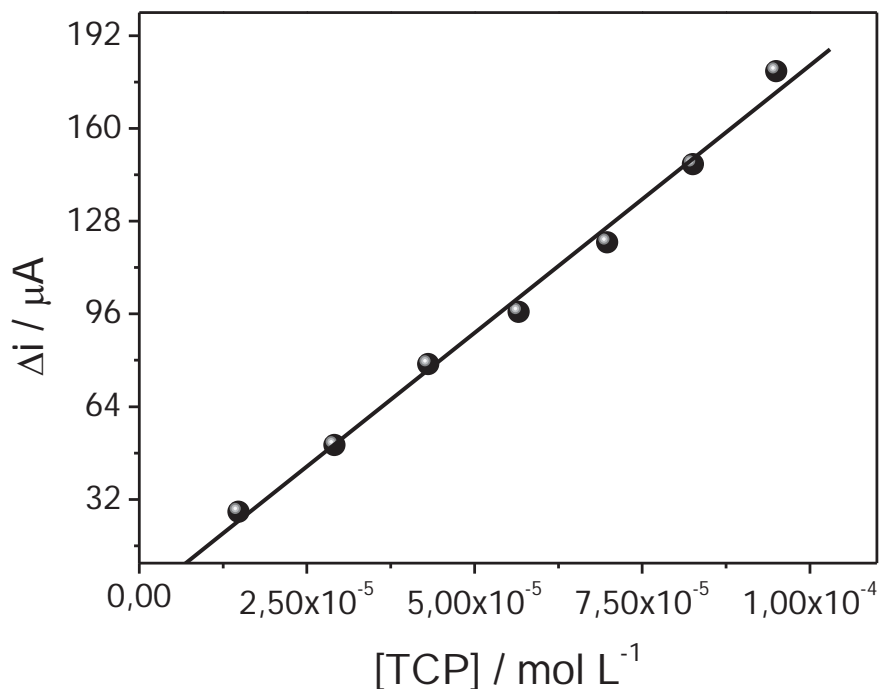


Figura 46. Curva analítica referente ao voltamograma da Figura 45(A).

Os resultados encontrados na recuperação do TCP em amostras de solo sugerem que neste tipo de amostra o sensor apresentará resultados consistentes pois apresentou um percentual de recuperação muito próximo a 100%.

4.1.5.2. Análise de águas superficiais

Na análise de águas superficiais, uma amostra de rio Tiete coletada nas proximidades da região de Araraquara, passou por um processo de filtração a vácuo, para retirada de resíduos sólidos, e o sobrenadante obtido foi misturado com o tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ na proporção de 1:1, e essa solução resultante foi usada como eletrólito na cela. A seguir foi adicionada uma alíquota de solução de concentração conhecida de TCP e avaliada a recuperação pelo método da curva analítica.

Tabela 8. Dados obtidos na recuperação de TCP em amostras de água superficial.

[TCP] / mol L ⁻¹		Recuperação / %
Adicionada	Encontrada	
1,09x10 ⁻⁴	1,17x10 ⁻⁴	107

Os resultados encontrados na recuperação do TCP em amostras de águas superficiais, também sugerem que este sensor pode ser usado neste tipo de amostras.

4.1.5.3. Análise de águas subterrâneas

As análises de águas subterrâneas foi conduzido de maneira diferente, a amostra não sofreu nenhum tratamento prévio apenas foi misturada com a solução tampão fosfato na proporção 1:1 e essa mistura foi usada como eletrólito para os testes de recuperação, e os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Dados obtidos na recuperação de TCP em amostras de água subterrânea.

[TCP] / mol L ⁻¹		Recuperação / %
Adicionada	Encontrada	
6,24 x 10 ⁻⁵	6,01 x 10 ⁻⁵	96%

A partir dos dados encontrados na aplicação do sensor em diversos tipos de amostras, pode-se dizer que o método proposto apresentou resultados satisfatórios e dessa forma, pode ser usado como um método alternativo aos métodos conhecidos para a quantificação de TCP em diferentes matrizes.

4.2. Análises de acompanhamento do desempenho dos MIPs e NIPs usando o sensor desenvolvido e comparação com método de referência

Outra aplicação do sensor biomimético desenvolvido visou o acompanhamento do desempenho dos MIP e NIP sintetizados, no intuito de verificar a eficiência destes polímeros na retenção/extração do TCP, através de experimentos de afinidade.

Para isto, após a obtenção dos MIP e NIP pulverizados e “limpos”, foram pesados 20 mg de cada polímero e colocados em 6 béqueres (cada um dos polímeros) contendo 5,00 mL de solução tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ (pH 6,0) com concentrações diferentes de TCP em cada um deles ($7,94 \times 10^{-5}$; $2,38 \times 10^{-4}$; $4,76 \times 10^{-4}$; $5,96 \times 10^{-4}$; $1,19 \times 10^{-3}$ e $2,38 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), a escolha dessas concentrações se deve ao fato de encontrarem-se numa melhor faixa de resposta do sensor. Essas misturas heterogêneas (MIP/NIP e solução tampão contendo o analito) foi submetida à agitação durante 24 horas. Durante esse intervalo de tempo espera-se que o analito interaja com as cavidades do polímero de impressão molecular, deixando na solução remanescente menor quantidade de analito que no caso do NIP.

Após a agitação, o sobrenadante foi separado com o auxílio de uma seringa e um filtro (Choromatil[®]) com poros de 0,45 µm, e a solução obtida foi analisada pelo sensor biomimético. Cabe ressaltar que experimentos semelhantes, que serão descritos nos próximos parágrafos, foram realizados para efeitos de comparação, usando a espectrofotometria UV/vis.

Os resultados obtidos inicialmente pelo sensor biomimético estão mostrados na Tabela 10. Para comparar a eficiência do MIP em relação ao NIP calculou-se a concentração obtida de TCP na solução sobrenadante e sabendo a concentração inicial obteve-se a variação que é representada pela massa de analito aderida ao polímero (Tabela 10).

O MIP foi mais eficiente que o NIP em relação a reter maior quantidade do analito. Contudo, o NIP também reteve parte do analito, isto é esperado e se deve ao fato de os polímeros tanto MIP quanto NIP possuírem na superfície externa grupos que interagem com o TCP. Contudo, observa-se uma maior eficiência para o MIP, e que se dá principalmente pelas cavidades seletivas para encaixar o analito. É

interessante o fato que, em concentrações menores a eficiência do MIP frente ao NIP é mais de quatro vezes maior, já em concentrações maiores essa eficiência não é tão acentuada, devido à saturação dos sítios de interação nos dois polímeros.

Tabela 10. Comparação da eficiência do MIP frente ao NIP, usando o sensor biomimético proposto para a quantificação do analito.

Massa TCP / gramas							
MIP				NIP			
Inicial	Sobrenadante	Aderida ao polímero	% aderida	Inicial	Sobrenadante	Aderida ao polímero	% aderida
$7,94 \times 10^{-5}$	$3,44 \times 10^{-5}$	$4,50 \times 10^{-5}$	56,8	$7,94 \times 10^{-5}$	$6,90 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-5}$	13,1
$2,38 \times 10^{-4}$	$3,78 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-4}$	84,0	$2,38 \times 10^{-4}$	$7,14 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-4}$	70,2
$4,76 \times 10^{-4}$	$4,36 \times 10^{-5}$	$4,33 \times 10^{-4}$	91,0	$4,76 \times 10^{-4}$	$8,64 \times 10^{-5}$	$3,90 \times 10^{-4}$	81,9
$5,96 \times 10^{-4}$	$4,78 \times 10^{-5}$	$5,48 \times 10^{-4}$	92,0	$5,96 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$4,90 \times 10^{-4}$	82,2
$1,19 \times 10^{-3}$	$4,86 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-3}$	95,8	$1,19 \times 10^{-3}$	$7,04 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-3}$	94,1
$2,38 \times 10^{-3}$	$7,95 \times 10^{-5}$	$2,30 \times 10^{-3}$	96,6	$2,38 \times 10^{-3}$	$9,52 \times 10^{-5}$	$2,29 \times 10^{-3}$	96,2

Cabe ressaltar que este é um resultado preliminar, embora satisfatório, e que se pretende em futuros estudos otimizar outros parâmetros da síntese como temperatura, pH, solvente, a quantidade dos reagentes, pretende-se otimizar também a lavagem do MIP, o tempo em que os polímeros interagem com o TCP (adsorção), entre outros parâmetros, uma vez que neste período de pesquisa não houve tempo hábil para realizar esses estudos.

Para a realização das análises espectrofotométricas foram preparadas soluções de TCP em metanol com diferentes concentrações e a estas foram adicionados 5 mg de cada um dos polímeros (MIP e NIP) e a mistura foi submetida a agitação durante 24 horas. O sobrenadante (solução de extração) foi separado com uma seringa e um filtro (Choromatil®) esta solução foi submetida à análise. Previamente, a estas análises das soluções de extração, foram obtidos os

respectivos espectros de absorvância de soluções padrões de TCP (Figura 47) a fim de se construir a curva analítica (Figura 48) que permitisse o cálculo das concentrações de TCP nas soluções de extração dos experimentos de afinidade. Nas análises foi empregado o comprimento de onda 235 nm com base nos dados do fornecedor do reagente Sigma-Aldrich®.

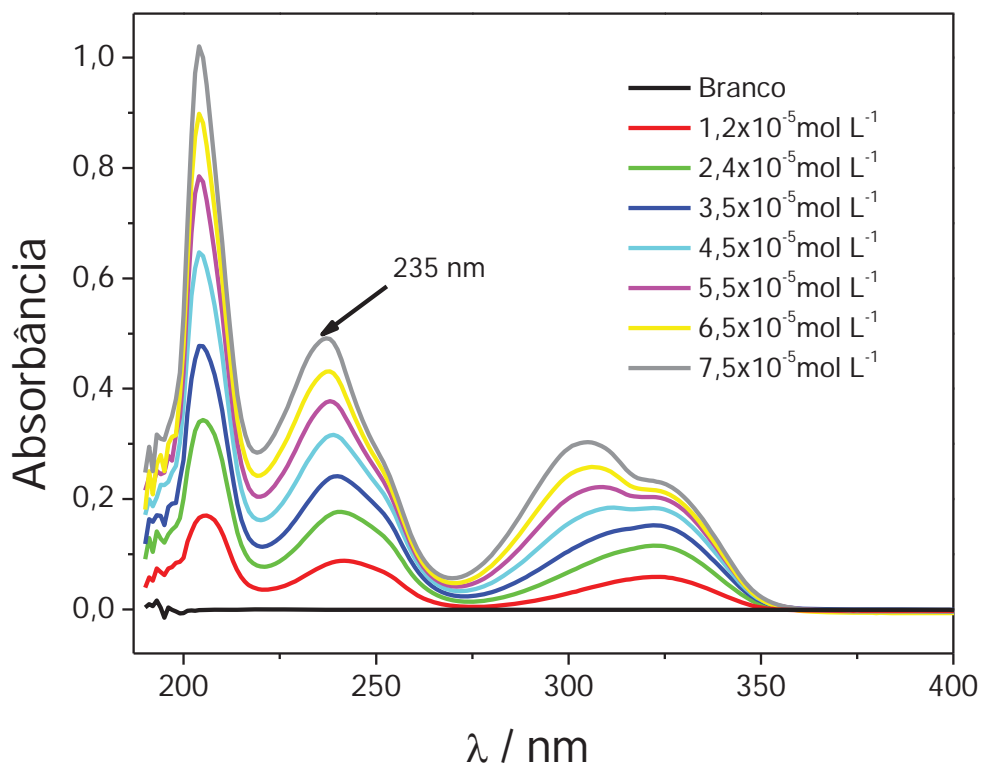


Figura 47. Absorvância em relação ao comprimento de onda com sucessivas adições de TCP.

Para o cálculo da concentração de TCP não retido pelo MIP e NIP foi usada a seguinte equação da reta da curva analítica da Figura 48 (com coeficiente linear de 0,99985):

$$\text{Absorvância} = - 2,47 \times 10^{-3} (\pm 2,45 \times 10^{-3}) + 6,53 (\pm 0,49) [\text{TCP}] \quad (3)$$

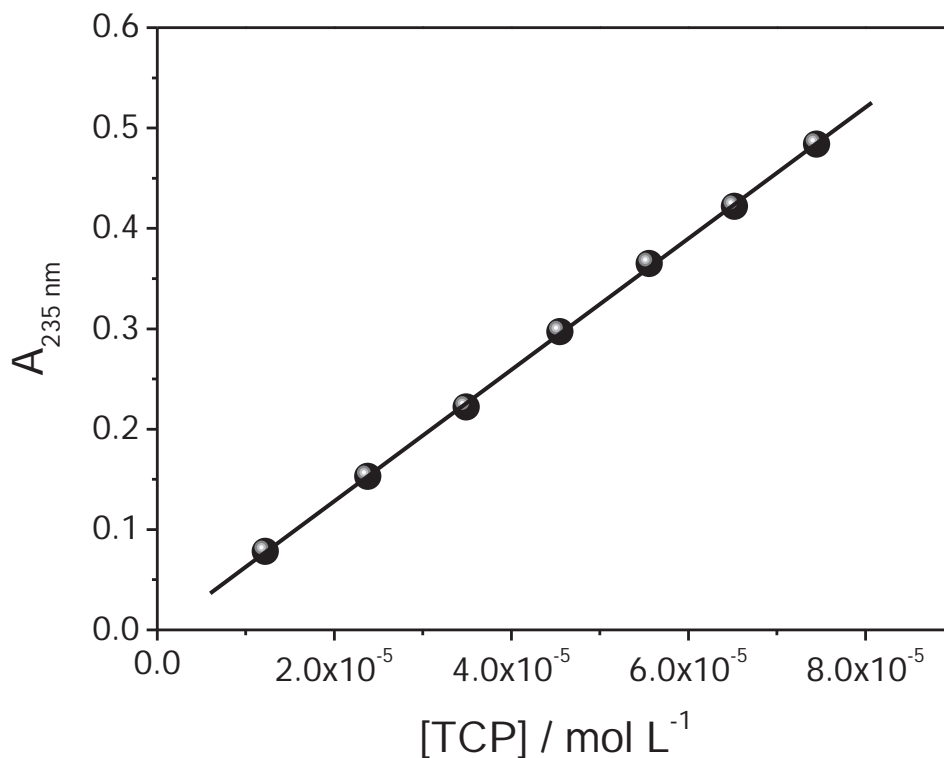


Figura 48. Curva analítica referente aos dados da Figura 47.

Fez-se, portanto a leitura das soluções sobrenadante do MIP e NIP com o espectrofotômetro, e os espectros obtidos encontram-se nas Figuras 49A e 49B respectivamente. Nos espectros as curvas **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, correspondem à concentrações de TCP: $9,90 \times 10^{-6}$; $1,96 \times 10^{-5}$; $2,91 \times 10^{-5}$; $3,85 \times 10^{-5}$; $4,70 \times 10^{-5}$; $7,41 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1}$ respectivamente.

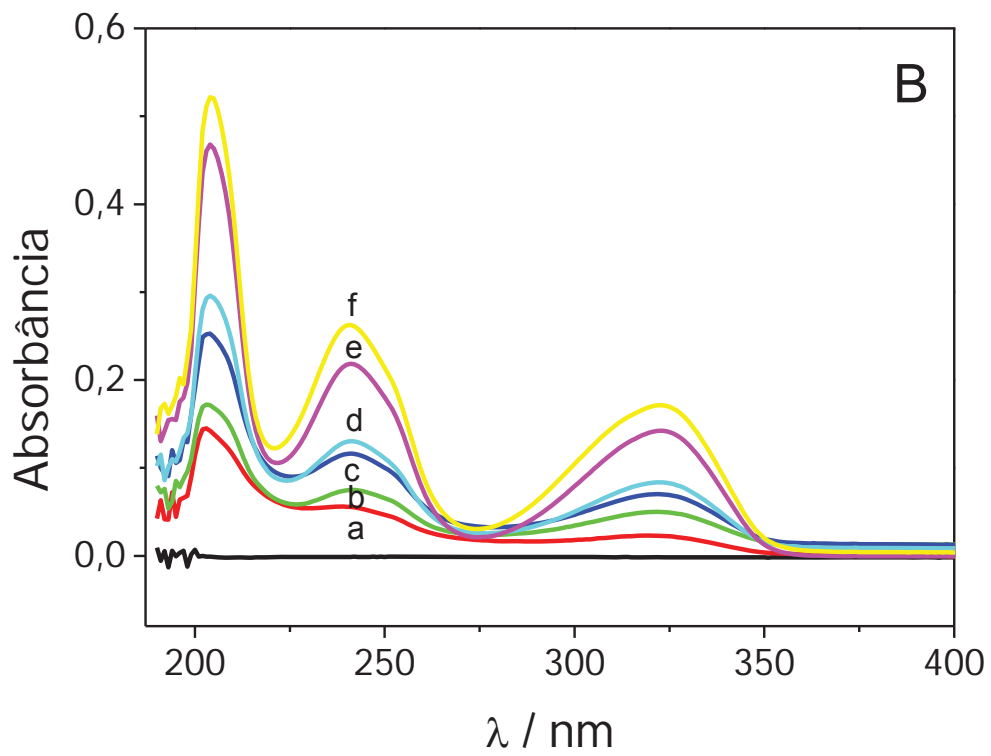
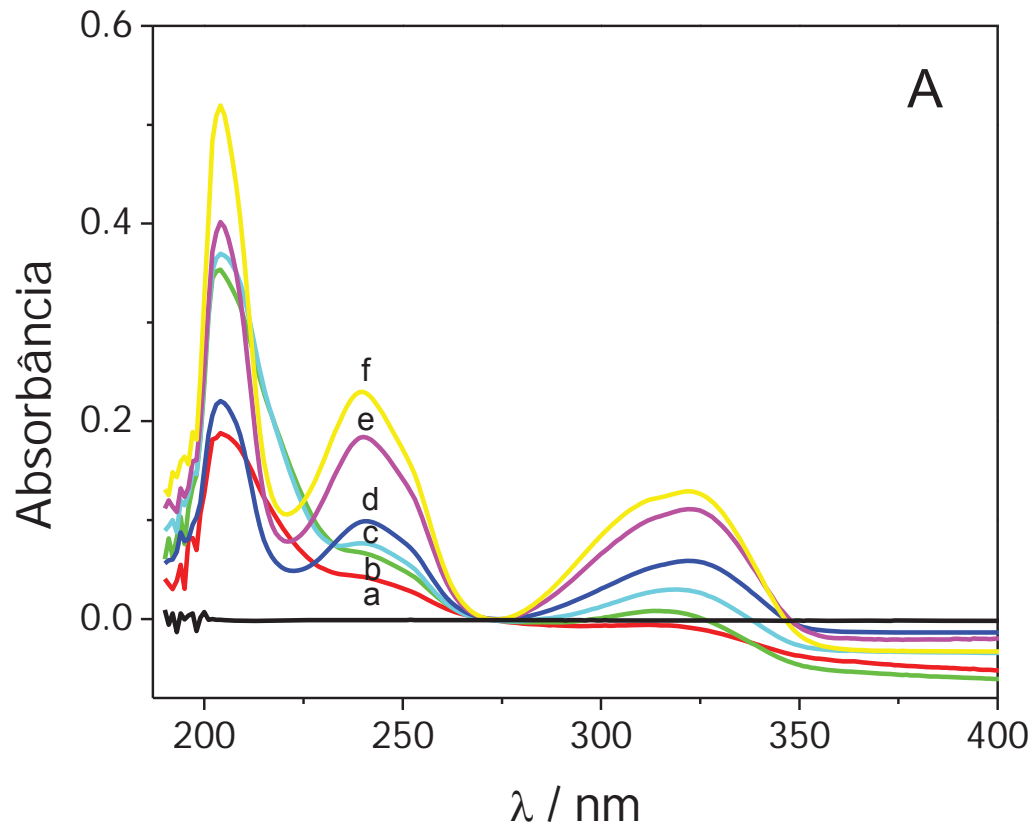


Figura 49. Espectros obtidos para as amostras dos sobrenadantes do MIP (A) e do NIP (B).

Com a equação da reta (Figura 48) e os dados representados na Figura 49 foi possível traçar duas curvas referentes à quantidade de MIP e NIP no sobrenadante (Figura 50).

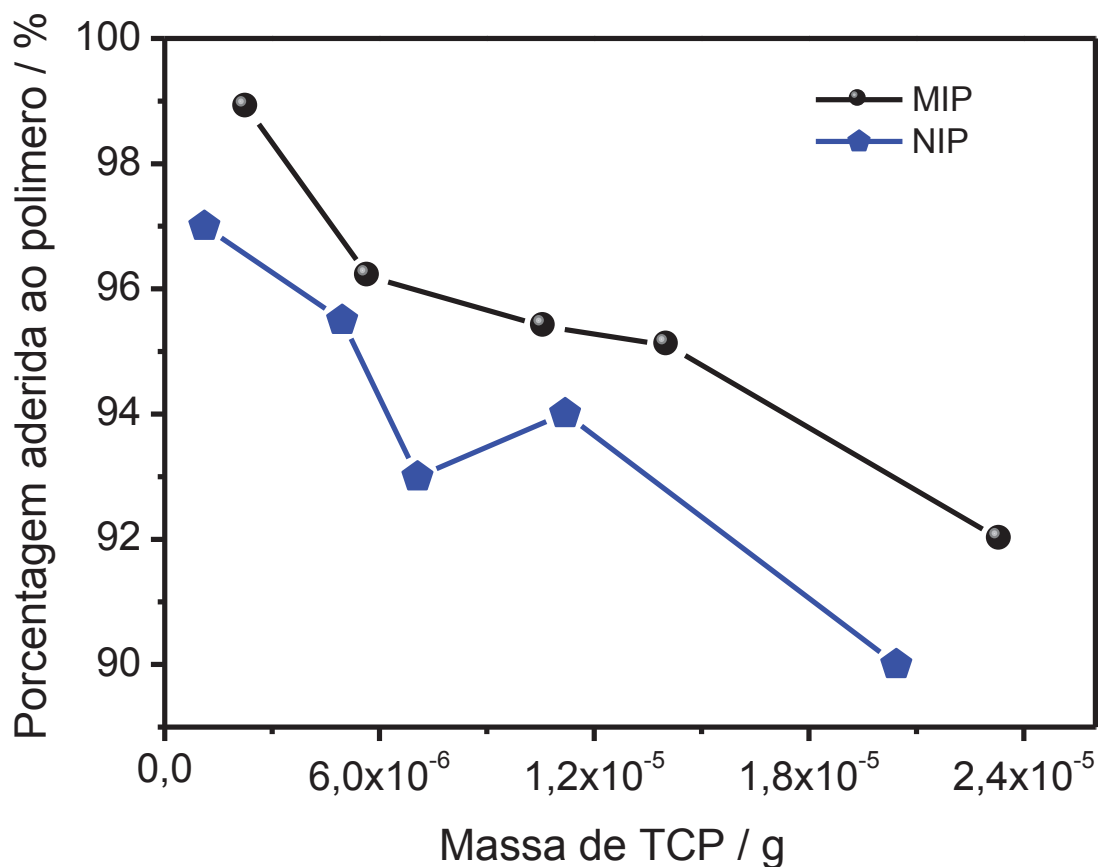


Figura 50. Porcentagem em massa de TCP aderida em relação massa de TCP adicionada.

Como se esperava o NIP reteve menos analito, isso se evidencia na curva azul da Figura 50, uma vez que a solução sobrenadante do NIP apresentou maior concentração de TCP (Figura 50). Este resultado foi consistente com aquele obtido pelo sensor biomimético proposto.

5. CONCLUSÃO

- 5.1. Análises buscando otimização do sensor foram realizadas e encontrou-se o melhor valor de pH (6,0), tampão (fosfato) e concentração do eletrólito, (0,20 mol L⁻¹). Parâmetros da onda quadrada também foram estudados e otimizados (frequência 50 Hz, amplitude 150 mV). Os resultados também indicam uma forte interação do complexo de porfirina de ferro (III) com o analito (constante aparente de Michaelis-Menten $7,33 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) sugerindo ser um catalisador biomimético da enzima P450.
- 5.2. O sensor biomimético desenvolvido apresentou respostas estáveis e seletivas para o analito TCP com limite de detecção e quantificação de $1,9 \times 10^{-6}$ e $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ respectivamente.
- 5.3. Com base nos resultados obtidos em diferentes amostras ambientais, conclui-se que a versatilidade e simplicidade apresentadas na confecção do eletrodo possibilita que esse método se torne uma ferramenta real e seletiva para análise de TCP com a vantagem do mesmo responder apenas para o metabólito e não para o agrotóxico clorpirifós.
- 5.4. O uso de programas computacionais para a seleção (otimização) do monômero responsável pela formação dos MIPs e NIPs, diminui significativamente o número de experimentos economizando assim reagentes.
- 5.5. Nas medidas que buscavam comparar a eficiência do MIP frente ao NIP foram obtidos os resultados promissores em que o MIP chega a obter uma eficiência quase cinco vezes maior que o NIP em baixas concentrações.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Sabendo que o complexo de ferro (III) atua como possível catalisador biomimético obtendo respostas estáveis e seletivas para o analito (TCP), espera-se obter respostas do sensor com limite de quantificação (LQ) de 10 até 1000 vezes menores com o uso de técnicas de pré-concentração (*stripping*).

Deverão ser otimizadas as condições de extração do TCP, a fim de obter maiores quantidades retidas de analito no MIP, para possibilitar a montagem de um sistema bi-biomimético de análise usando o MIP para pré-concentrar o analito *on line* e monitorar o TCP usando o sensor biomimético desenvolvido.

Por outro lado, os MIPs sintetizados poderão ser usados para construir sensores biomiméticos à base de materiais compósitos (como pasta de carbono modificada) usando voltametria de onda quadrada de redissolução adsortiva, no intuito de diminuir o limite de detecção para a faixa de picomolar, tal como relatado para outros sensores à base de MIPs na literatura.

REFERÊNCIAS

- 1 VALVERDE, O. A demanda por alimentos deve dobrar até o ano de 2050. **Jornal Ciência**. Disponível em: <<http://www.jornalciencia.com/meio-ambiente/diversos/1115-a-demanda-mundial-por-alimentos-deve-dobrar-ate-o-ano-de-2050>>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 2 LIMA, A. C. Y. **Agrotóxicos**:nosso veneno silencioso de cada dia. 2012. Disponível em: <<http://www.correaneto.com.br/site/?p=19282>>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 3 PENA, M. F.; CRUZ, I.; SPERLING, E. V. Determinação residual de agrotóxico organofosforado em ambiente não alvo contaminados por exaderiva de quimigação. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 28., 2002, Cancun. **Resumos...** São Paulo: Ed. USP, 2002.
- 4 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC 119. Cria o Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7876>>. Acesso em: 17 jan. 2012.
- 5 D' AMATO, C.; TORRES, J. P.M.; MALM, O. DDT (Diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental, Rio de Janeiro. Revisão. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.
- 6 TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. **A história da indústria de agrotóxicos no Brasil**: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/43.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2012.
- 7 COIMBRA, C. G. **Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos**. 2012. Disponível em: <<http://biodireitomedicina.wordpress.com/2012/06/01/desde-2008-o-brasil-e-o-maior-consumidor-mundial-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 17/set. 2012.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano integrado de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos**. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plano_agrotoxico.pdf>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 9 GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quím. Nova**, v. 29, n.1, p. 105-112, jan./fev. 2006.

- 10 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a lei 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, a inspeção, a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4074_02.htm>. Acessado em: 17 set. 2012.
- 11 CANTARUTTI T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- 12 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Portaria normativa Nº 84**, de 15 out. de 1996. Disponível em: <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 28 set. 2012.
- 13 SILVA, A. L. O. **Levantamento fenotípico da atividade da enzima paraxonase em populações expostas e não expostas a pesticidas organofosforados**. 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000.
- 14 CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. **Toxicologia para químicos**. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/toxicologia_mini2010.pdf>. Acesso em: 28 set. 2012.
- 15 AHMED, F. E. Analysis of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Analytical Chem.**, v. 20, n. 11, p. 649-661, 2001.
- 16 GUNTHER, F. A.; BLINN, R. C. Pesticides residues: basic principles for quantitative determination. **Agric. Food Chem.**, v. 1, p. 325-330, 1953.
- 17 TADEU, J. L.; SANCHES-BRUNETE, C.; PEREZ, R. A.; FERNANDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v. 882, p. 193-203, 2000.
- 18 SCHNEIDER, R. C. S.; ROLLI, B. V.; MAZUIM, M. da S.; HAUCH G.; BACCAR, N. M.; MACHADO, E. L. Photodegradation of pesticides in float system effluent from tobacco plantation. **Latin Amer. Appl. Res.**, v. 39, n. 4, p. 367-373, Oct. 2009.
- 19 LIU, B.; McCONNELL, L. L.; TORRENTS, A. Hidrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the chesapeake bay. **Chemosphere**, v. 44, p. 1315-1323, 2001.
- 20 PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CEUZ, I. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 37-44, 2003.

- 21 NÚCLEO DE TECNOLOGIA PARA A SAÚDE. **Intoxicação por agrotóxicos**. Disponível em: <<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.orga.htm>>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 22 KIM, T. H.; KUCA, A. K.; JUNB, B. D.; JUNG, Y. S. Design and synthesis of new bis-pyridinium oxime reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorous nerve agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 2914-2917, 2005.
- 23 MORI, M. N.; OIKAWA, H.; SAMPA, M. H. O.; DUARTE, C. L. **Descontaminação de embalagens de clorpirifós utilizando radiação ionizante**. 2005. Disponível em: <<http://www.ipen.br/biblioteca/2005/inac/10657.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2012.
- 24 CALDAS, L. Q. A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides**. 2000. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/tutorial2/fulltex/intoxicacoes.pdf>>. Acesso em 28 set. 2012.
- 25 ANDRADE, T. S. **A poluição das águas por agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.eduvaleavare.com.br/ethosjus/revista3/pdf/poluicao_aguas.pdf>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 26 MEAULO, F. J. **Caracterização geológica, hidrogeológica e o mapeamento da vulnerabilidade natural à poluição dos aquíferos, na escala 1:25.000, das áreas urbana e de expansão do município de Araraquara-SP**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado, em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociência e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- 27 IRITANI, M. A.; ESAKI, S. **As águas subterrâneas do estado de São Paulo**. 2009. Disponível em: <http://www.igeologico.sp.gov.br/downloads/livros/cart_AG_SB.pdf>. Acesso em: 18 set. 2012.
- 28 SÃO PAULO (Estado). Conselho Estadual de Recursos Hídricos. **Mapa de águas subterrâneas do estado de São Paulo escala 1:1.000.000**: nota explicativa. 2005. Disponível em: <<http://www.igeologico.sp.gov.br/downloads/Nota%20Explicativa%20Mapa%20Aguas%20Subterraneas.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2012.
- 29 CARVALHO, J. M. **Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos**. Disponível em: <http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/14472/14472_2.PDF> Acesso em: 18 set. 2012.
- 30 SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- 31 OCAMPO, A. JARAMILLO, M.; MARCH, C; MONTOYA, A. Inmunosensor piezoelétrico para la detección del metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol del plaguicida clorpirifos. **Ver. EIA**, v. 16, p. 127-136, 2011.

- 32 OLIVEIRA, A. G. **Remoção do agrotóxico organofosforado clorpirifós usando processos oxidativos avançados**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- 33 SMITH, G. N.; WATSON, B. S.; FISHER, F. S. Investigation on dursban insecticide metabolism of O-O-dyethyl O-(3,5,6-tricloro-2-pyridil) phosphorothionate in rats. **J. Agr. Food Chem.**, v. 15, n. 1, p. 132-138, 1967.
- 34 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
- 35 KATZ, E.; LOTZBEYER, T.; SCHLERETH, D. D.; SCHUHMANN, W.; SCHIMDT, H. L. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinolinequinone. Effect of Ca^{2+} cations. **J. Electroanal. Chem.**, v. 373, n. 1-2, p. 189-200, 1994
- 36 PERSSON, B. J. Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electroanal. Chem.**, v. 287, p.183-189,1990.
- 37 LEAL, G. F.; CALIXTO, C. M. F.; SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Determinação de L-cisteína utilizando eletrodo compósito à base de grafite/poliuretana modificada com hexacianoferrato de cobre (II)**. Disponível em:
<<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=1082&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 28 set. 2012.
- 38 SOUZA, M. F. B. **Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem**. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n2/4933.pdf>>. Acesso em: 5 out. 2012.
- 39 TIWARI, A.; ARYAL, S.; PILLA, S.; GONG, S. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p. 1401-1407, Feb. 2006.
- 40 CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-araldite®: aplicações didáticas. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2194-2198, out. 2008.
- 41 ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analy. Chem.**, v. 30, n. 9, p. 1576, Sept. 1958.
- 42 CRESPILO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, ago. 2004.

43 CARVALHO, J. M. **Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos.**

Disponível em: <http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/14472/14472_2.PDF>
Acesso em: 18 set. 2012.

44 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise Instrumental.** 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

45 PITANGA, A. F. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas utilizando eletrodo de pasta de carbono modificada com hemina.** 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

46 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, nov. 2006.

47 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Quím. Nova**, v. 25, n. 1, p. 123-128, fev. 2002.

48 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: CRAIG, A. G.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors.** Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195.

49 WONG, A. **Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico.** 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

50 WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic. **Anal. Sens.**, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.

51 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SIGIOLI, A.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrroline as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 4, p. 734-743, 2008.

52 BONI, A. C.; WONG, A.; DUTRA, R. A. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 2067-2073, 2011.

53 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

- 54 GRASSI, V. **Polimeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo**. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- 55 MAHONY, J. O.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry. **Anal. Chim. Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.
- 56 ALIZADEH, T.; ZARE, M.; GANJALI, M.R.; NOROUZI, P.; TAVANA, B. A new molecularly imprinted polymer (MIP)-based electrochemical sensor for monitoring 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in natural waters and soil samples. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, p. 1166-1172, 2010.
- 57 JIANG, T.; ZHAO, L.; CHU, B.; FENG, Q.; YAN, W.; LIN, J. M. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, p. 442- 447, 2009.
- 58 MILANELO, C. H. M. **Desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos para a determinação de agrotóxicos aplicando simulações computacionais**. 2011. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharel em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 59 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Quim. Nova**, v. 28, n.6, p. 1087-1101, 2005.
- 60 ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, jan./fev. 2001.
- 61 CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Anal. Chim. Acta**, v. 391, n. 10, p. 105-126, 1999.
- 62 LEHNINGER, L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 157.

**UNESP - INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



UNESP - Instituto de Química
Seção de Pós-Graduação
Rua Prof. Francisco Degni, s/nº
Caixa Postal 355
14801-970 Araraquara - SP

Fone: (16) 3301-6681
Fax: (16) 3301-6692
e-mail: spg@iq.unesp.br
<http://www.iq.unesp.br>