

ADEMAR WONG

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA BASEADOS EM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS
PARA ANÁLISE DE POLUENTES AMBIENTAIS**

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

Orientadora: Prof^a Dra Maria Del Pilar T. Sotomayor

**Araraquara
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

W872d Wong, Ademar
Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos de extração em fase sólida baseados em sistemas biomiméticos para análise de poluentes ambientais / Ademar Wong. – Araraquara : [s.n], 2014
205 f. : il.

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

1. Nanotecnologia. 2. Eletrodos. 3. Análise eletroquímica. 4. Produtos químicos agrícolas. 5. Compostos organometálicos. 6. Polímeros. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ADEMAR WONG

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

Araraquara, 10 de Outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



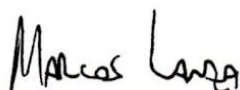
Profª Drª MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Orientadora)
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Profª Drª MARIA VALNICE BOLDRIN
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Dr. ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE VASCONCELOS LANZA
Instituto de Química, USP – São Carlos.



Prof. Dr. CÉSAR RICARDO TEIXEIRA TARLEY
Centro de Ciências Exatas, UEL – Londrina.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Ademar Wong

Naturalidade: São Carlos/SP

Nacionalidade: Brasileira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

Licenciatura em Química – Instituto de Química da UNESP - Araraquara.

Período: 02/2003 a 12/2007.

Pós-Graduação

-Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientadora Prof^a Dra Maria D.P.T. Sotomayor.

Título do Projeto: “Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico”

Período: 08/2008 a 08/2010.

-Doutorado em Química realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientadora Prof^a Dra Maria D.P.T. Sotomayor.

Título do Projeto: Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos de extração em fase sólida baseados em sistemas biomiméticos para análise de poluentes ambientais.

Período: 08/2010 a 10/2014

Participação em eventos científicos com apresentação de trabalhos

16º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), realizado entre 23 e 26 de outubro de 2011 na cidade de Campos do Jordão, SP.

- Wong, A.; Figueira, E.C.; Silva, A.C.M.; Silva, B.V.M.; Dutra, R.F.; Sotomayor, M.D.P.T. “Sensor amperométrico descartável à base de grafite modificado com CoPc para detecção de metribuzin **(Oral e Pôster)**.”
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Determinação de diuron empregando sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo derivado da ftalocianina de níquel **(Pôster)**.”

XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado nos dias 28 de agosto a 01 de setembro de 2011, Bento Gonçalves, RS.

- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Desenvolvimento de sensor biomimético para detecção do herbicida 2,4-D” **(Pôster)**.”
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Efeito da utilização de nanotubos de carbono em sensor biomimético para determinação do herbicida 2,4-D” **(Pôster)**.”

XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica, realizado no período de 25 a 30 de março de 2012, no centro de convenções fábrica de negócios, em Fortaleza-CE, Brasil.

- Wong, A.; Dutra, R.F.; Sotomayor, M.D.P.T. “Sensor biomimético descartável à base de ftalocianina de cobalto e nanotubos de carbono para detecção sensível e seletiva de dipirona” **(Oral)**.”
- Wong, A.; Dutra, R.F.; Sotomayor, M.D.P.T. “Uso de eletrodo impresso de grafite modificado com MWCNT para detecção sensível de thiram” **(Oral)**.”

International conference on bioinspired and biobased chemistry & materials, realizado em outubro de 2012.

- Wong, A.; Foguel, M.V.; Sotomayor, M.D.P.T. “Study and application of a screen-printed biomimetic sensor modified with MWCNT in the electrocatalytic oxidation of thiram” **(Pôster)**.

XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE 2013) que foi realizado em abril de 2013 em Campos do Jordão.

- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Emprego de polímero de impressão molecular em sensor eletroquímico para detecção de diuron” **(Pôster)**.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Detecção e quantificação de diclofenaco utilizando de sensor biomimético” **(Pôster)**.
- Materon, E.; Wong, A.; Cilli, E.M.; Sotomayor, M.D.P.T. “Biossensor à base de pasta de carbono modificada com GTS para quantificação de cisplatina” **(Pôster)**.

Participação do 17º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), realizado entre 06 e 09 de outubro de 2013 na cidade de Belo Horizonte, MG.

- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Utilização de eletrodo de disco rotatório em medidas eletroquímicas para detecção do herbicida 2,4-D com o sensor biomimético” **(Pôster)**.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Determinação eletroquímica de diclofenaco com sensor biomimético em análise por injeção em fluxo (FIA)” **(Pôster)**.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Monitoramento de diuron com polímero molecularmente impresso (MIP)” **(Pôster)**.

- Toro, M.J.U.; Wong, A.; Sotomayor, M.D.P. “Síntese de polímero de impressão molecular para a triazina hexazinona por técnica de polimerização em bulk” **(Pôster)**.
- Sanchez, R.U.; Wong, A.; “Síntese de polímero de impressão molecular magnético seletivo para 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno um poluente ambiental” **(Pôster)**.
- Participação no minicurso: Métodos Eletroquímicos de Análise

XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica, realizado no período de 06 a 11 de abril de 2014, La Serena, Chile.

- Wong, A; Materon, E.M.; Sotomayor, M.D.P.T. “Desenvolvimento de um sensor biomimético para monitoramento de carbofurano em sistema por injeção em fluxo (FIA)” **(Pôster)**.
- Materon, E.M.; Wong, A. “Eletrodos modificados con Glutathione-S-transferase para monitoreamiento de anticancerígenos” **(Oral)**.

ARTIGOS PUBLICADOS

- Wong, A.; Lanza, M.R.V.; Sotomayor, M.P.D.T. Development And Application Of A Highly Selective Biomimetic Sensor For Detection Of Captopril, An Important Ally In Hypertension Control, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 13 (2010) 666-674.
- Gobatto, D.F.; Wong, A.; Lanza, M.R.V.; Sotomayor, M.P.D.T. Development of a biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin, The Open Chemical and Biomedical Methods Journal 3 (2010) 98-107.

- 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* 85 (2011) 2067-2073.
- Wong, A.; Dias, Dutra, R.F.; Sotomayor, M.D.P.T. Development and application of a screen-printed electrode modified with MWCNT for the electrocatalytic detection of thiram, *Current topics electrochemistry* 14 (2012) 87-94.
- Wong, A.; Lanza, M.R.V.; Sotomayor, M.D.P.T. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29*H*,31*H*-ftalocianina níquel (II), *Journal of electroanalytical chemistry* 690 (2013) 83-88.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. Biomimetic sensor based on 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin iron(III) chloride and MWCNT for selective detection of 2,4-D, *Sensors and Actuators B* 181 (2013) 332-339.
- Wong, A.; Marestoni, L.D.; Sotomayor, M.D.P.T. Monitoring of Diclofenac with Biomimetic Sensor in Batch and FIA Systems, *Journal of Brazilian Chemistry* 25 (2014) 1283-1291.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. Determination of carbofuran and diuron in flow injection analysis using biomimetic sensor modified with graphene oxide, *Journal of Electrochemical Chemistry* 731 (2014) 163-171.
- Wong, A.; Vasques, E.M.M.; Sotomayor, M.D.P.T. Development of a biomimetic sensor modified with hemin and graphene oxide for monitoring of carbofuran in food, *Electrochimica Acta* 146 (2014) 830-837.

ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO COM O GRUPO

- Vasques, E.M.M.; Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs, *Biosensors and Bioelectronics* 7 (2014) 232-236.

DEDICATÓRIA

A toda a minha família e as pessoas que me acompanharam nessa trajetória.

“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou, o que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar". Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo. É renovar as esperanças na vida é o mais importante: acreditar em você de novo. Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado. Chorou muito? Foi limpeza da alma. Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia. Sentiu-se só por diversas vezes? É por que fechaste a porta até para os outros. Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora. Pois é! Agora é hora de iniciar, de pensar na luz, de encontrar prazer nas coisas simples de novo. Que tal um novo emprego? Uma nova profissão? Um estilo de vida, diferente? Um novo curso, ou aquele velho desejo de aprender inglês, dominar o conhecimento de sua área ou qualquer outra coisa? Olha quanto desafio. Quanta coisa nova nesse mundo de meu Deus te esperando. Tá se sentindo sozinho? Besteira! Tem tanta gente que você afastou com o seu "período de isolamento", tem tanta gente esperando apenas um sorriso teu para "chegar" perto de você. Quando nos trancamos na tristeza nem nós mesmos nos suportamos. Ficamos horríveis. O mau humor vai comendo nosso fígado, até a boca ficar amarga. Recomeçar! Hoje é um bom dia para começar novos desafios. Aonde você quer chegar? Ir alto. Sonhe alto, queira o melhor do melhor, queira coisas boas para a vida. pensamentos assim trazem para nós aquilo que desejamos. Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos. Já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar na nossa vida. E é hoje o dia da faxina mental. Joga fora tudo que te prende ao passado, ao mundinho de coisas tristes, fotos, peças de roupa, papel de bala, ingressos de cinema, bilhetes de viagens, e toda aquela tranqueira que guardamos quando nos julgamos apaixonados. Jogue tudo fora, até quem se julga amigo. Mas, principalmente, esvazie seu coração de todas as coisas que possam lhe fazer mal. Fique pronto para o dia a dia e lembre-se que somos capazes de fazer muitas coisas importantes nessa vida. O objetivo da vida é viver bem e ser muito feliz”.

AGRADECIMENTOS

- ❖ *A minha orientadora Maria D. P. T. Sotomayor por dar a oportunidade de trabalhar mais uma vez no grupo.*
- ❖ *Aos professores: Nelson Stradiotto, Hideko Yamanaka, Maria Valnice Boldrin pelas discussões de meus trabalhos.*
- ❖ *Ao Antonio Pupim Ferreira que me ajudou muito na preparação do Seminário Geral.*
- ❖ *Ao grupo de Eletroanalítica na qual convivi vários anos e fiz bons amigos.*
- ❖ *Ao pessoal da pós-graduação e aos funcionários da biblioteca pela ajuda prestada.*
- ❖ *Ao Instituto de Química, Capes e Fapesp pela bolsa concedida.*
- ❖ *A minha família, principalmente minha mãe, meus sobrinhos, meus irmãos, minha cunhada Dalva, etc, que sempre fizeram parte da minha vida e me ajudaram de todas as formas para que eu superasse minhas dificuldades.*
- ❖ *À Elsa Maria por me apoiar nos momentos difíceis e me fazer enxergar como devo entender, fazer e tratar as pessoas em um ambiente de trabalho.*

RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de sistemas de análise usando compostos biomiméticos para determinação de poluentes ambientais. O primeiro sistema biomimético proposto para a enzima P450 se baseou no uso de eletrodos modificados com compostos supramoleculares de ftalocianina ou porfirina metálicas, que mimetizaram a ferro protoporfirina IX, que é o sítio ativo catalítico das enzimas P450. Os complexos avaliados permitiram que os sensores modificados apresentassem características vantajosas, como excelente atividade catalítica e alta transferência eletrônica. A comprovação da biomimetização foi realizada através de dados obtidos usando amperometria e voltametria de onda quadrada.

Os complexos utilizados nesse estudo como potenciais mimetizadores da enzima P450 para monitoramento dos agrotóxicos 2,4-D, diuron, carbofurano e do fármaco diclofenaco foram, respectivamente, o cloro 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina ferro (III); o 29*H*,31*H*-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II); a hemina e a 29*H*,31*H*-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II). Adicionalmente, neste período foi desenvolvido um sensor eletroquímico para detecção de thiram, usando eletrodo impresso modificado com nanotubos de carbono.

Os sensores propostos apresentaram tanto em sistemas em batelada como em fluxo (FIA), uma sensibilidade entre $1,0 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$ e um limite de detecção que variou entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Quando avaliada a seletividade dos sensores com outras substâncias químicas foi verificada alta seletividade nos potenciais de análise de cada analito. Por exemplo, o sensor biomimético para determinação de diuron, apresentou sinal eletroquímico somente para este analito quando realizada amperometria em potencial de 750 mV, não apresentando resposta para os outros compostos analisados (carbofurano, thiram, clorpirifós, metribuzin, 2,4-D, hexazinona, ametrin, profenofós e carbendazim). Em relação à estabilidade e reprodutibilidade dos sensores, as curvas de calibração realizadas em triplicata de cada sensor proposto foram satisfatórias com um RSD próximo a 4%. Quando aplicado em amostras reais (amostras de solo, águas de rios, soro biológico, formulações farmacêuticas), os resultados obtidos nos estudos de recuperação aplicando os métodos de adição de padrão e padrão externo foram próximos a 100%, demonstrando a alta eficiência dos sensores construídos.

A segunda estratégia biomimética avaliada neste trabalho foram os polímeros molecularmente impressos, mais conhecidos como MIP (*Molecularly Imprinted Polymer*). Os MIPs são um tipo de material que apresentam reconhecimento biomimético de analitos de interesse, semelhante aos sistemas específicos enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo. A polimerização adotada para desenvolvimento dos MIPs foi à polimerização em *bulk*. Os melhores MIPs desenvolvidos foram caracterizados superficialmente por microscopia eletrônica de varredura e método BET (Bunauer-Emmett-Teller). No método BET foi possível obter resultados de áreas superficiais para os polímeros sintetizados, com destaque para o MIP sintetizado com ácido metacrílico que apresentou uma área superficial de $861 \text{ cm}^2 / \text{g}$, volume de poro $0,67 \text{ cm}^3$ e diâmetro de poro de $6,3 \text{ nm}$. A espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para verificar a presença do template diuron no MIP e também para avaliar a adsorção de diuron em estudos de religação.

Para verificar a eficiência dos MIP desenvolvidos foi avaliada a cinética do sistema através de estudos de adsorção em diversos intervalos de tempo, onde se pode verificar a interação do substrato com o MIP e NIP (polímero de controle sem cavidade seletiva). No estudo cinético tendo como *template*, o diuron, visualizou-se que o intervalo de tempo de 3 horas foi considerado como ótimo para experimentos de adsorção, pois a partir desse tempo, a saturação na adsorção do MIP foi bem maior que a do NIP. Em seguida, foram obtidas as isotermas de adsorção no intervalo de concentração entre 10 e 180 mg L^{-1} de analito (diuron). Para tal, foram usadas uma mistura de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato/acetona (1:2, v/v) pH 7,0. Quando avaliado os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich, observou-se que a adsorção do template pelo MIP adequou-se mais na isoterma de Langmuir. Uma vez avaliadas e otimizadas as características analíticas do MIP para diuron, os mesmos foram usados como material adsorvente em extração em fase sólida (MISPE) e ao analisar amostras de águas de rios enriquecidas com diuron, os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que foi possível obter recuperações de diuron entre 73 e 75%.

Palavras Chaves: sensores biomiméticos, agrotóxicos, fármacos, FIA, batelada, CLAE, polímeros molecularmente impressos, nanotubos, óxido de grafeno.

ABSTRACT

This work presents the development of systems using biomimetic compounds for determination of environmental pollutants. The first proposed biomimetic system is based on modification of electrodes with supramolecular compounds of phthalocyanine or porphyrin metal, that mimicked the iron protoporphyrin IX (active site of P450 enzymes). The complex evaluated in this work allowed the constructed sensors with some advantageous characteristics such as excellent catalytic activity and high electronic transfer. The verification of the biomimetization was performed through data obtained by amperometry and square-wave voltammetry. The complexes used in this study as potential catalysts P450 enzyme for monitoring of pesticides 2,4-D, diuron, carbofuran and the drug diclofenac were, respectively, the chlorine 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*22,23*H*-porphyrin iron (III); the 29*H*,31*H*)-phthalocyanine-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi nickel (II); the hemin and 29*H*,31*H*)-phthalocyanine-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi copper (II). Furthermore, during this period a sensor was developed for the detection of thiram using carbon nanotube modified electrode.

The proposed sensors showed in batch and flow (FIA) systems, sensitivity between 1.0×10^4 and $1.1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \mu\text{A}$ and a detection limit between 2.0×10^{-6} and $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. When evaluated the selectivity of the sensor with other compounds was observed high selectivity, for example, the biomimetic sensor showed only electrochemical signal for diuron when performed amperometry in potential of 0.75 V. The compounds were carbofuran, thiram, chlorpyrifos, metribuzin, 2,4-D, hexazinone, ametryn, profenofos and carbendazim. The stability and reproducibility of the sensors were realized satisfactory with calibration curves with RSD of 4%. When applied to real samples (soil samples, water from rivers, biological serum, pharmaceutical formulations), the results obtained in studies of recovery by applying the methods of standard addition and external standard were close to 100%, demonstrating the high efficiency of the sensors constructed.

The second biomimetic strategy evaluated in this work was Molecularly Imprinted Polymer (MIP). The MIPs are a type of material which exhibit biomimetic recognition to analytes of interest, similar to the particular enzyme-substrate systems or antigen-antibody. The polymerization adopted for the development of MIP was

bulk polymerization. The best MIPs developed were characterized by scanning surface electron microscopy and BET (Bunauer-Emmett-Teller) method. BET method was possible to obtain results for polymers surface areas, especially the MIP synthesized with methacrylic acid which had a surface area of $861 \text{ cm}^2 / \text{g}$, pore volume of 0.67 cm^3 and pore diameter of 6.3 nm . The infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR) was used to verify the presence of diuron in the MIP and also to evaluate the adsorption in studies of adsorption.

The efficiency of development of the MIP was verified by evaluating kinetics of the adsorption based on the adsorption study at different intervals of time, where can verify the interaction of the substrate with the MIP and NIP (non-imprinted polymer). During kinetics study of diuron as template, three hours was considered as an optimal interval time for the adsorption experiments, after this time the saturation of adsorption on MIP was higher than NIP. Adsorption isotherms were obtained in the concentration range between 10 to enter 180 mg L^{-1} for the analyte (diuron). Finally, a mixture of 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer/acetonitrile (1:2 v/v) pH 7.0 was used in this analysis. Langmuir and Freundlich adsorption models were evaluated and it was observed that Langmuir isotherm was more adequate for the adsorption of template on MIP. Once evaluated and optimized characteristics of the MIP for diuron, it was used as adsorbent material in solid phase extraction (MISPE) for analyzing samples of waters of rivers enriched with diuron. The results obtained were very satisfactory since it was possible to recover diuron between 73 and 75%.

Keywords: biomimetic sensors, pesticides, drugs, FIA, batch, HPLC, MIP, Carbon nanotube, graphene oxide.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 -	Quantidade de agrotóxicos encontradas em alimentos coletados em vários supermercados no ano de 2012	2
Figura 2 -	Exemplos de fármacos presentes no meio ambiente	5
Figura 3 -	Estrutura química do diuron	6
Figura 4 -	Estrutura química do 2,4-D	7
Figura 5 -	Estrutura química do carbofurano	8
Figura 6 -	Estrutura química do thiram	9
Figura 7 -	Estrutura química do diclofenaco	10
Figura 8 -	Tipos de imobilização reportados na literatura	13
Figura 9 -	Mecanismo de reação do modificador na superfície do eletrodo (EQM).....	14
Figura 10 -	Tipos de transdutores empregados em sensores e representação esquemática de um sensor	15
Figura 11 -	Imagem ilustrativa de nanotubo de carbono	17
Figura 12 -	Imagem da estrutura do grafeno	18
Figura 13 -	Imagem ilustrativa da ftalocianina (A) e porfirina (B) sem centro metálico	20
Figura 14 -	Mecanismo de reação da enzima P450 sobre fármacos e agrotóxicos	24
Figura 15 -	Estrutura da ferro protoporfirina IX e complexos organometálicos a base de porfirinas e ftaliocianinas usados para desenvolvimento de sensores biomiméticos	25
Figura 16 -	Estrutura química: (A) complexo 29H, 31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II) e (B) complexo cloro 21H, 23H-porfirina 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorophenil) ferro (III) e hemina (C)	26
Figura 17 -	Representação do processo de impressão molecular.....	29
Figura 18 -	Iniciadores de polimerização utilizados na síntese de MIPs: (a) azobisisobutironitrilo (AIBN), (b) azobisdimetilvaleronitrilo (ABDV), (c) dimetilacetato de benzilo, (d) benzoilperóxido (BPO), (e) ácido 4,4'-azo (4-cianoalérico).....	32

Figura 19 - Reação de hidrólise de carbofurano e sua oxidação eletroquímica	41
Figura 20 - Imagem ilustrativa do μ Autolab [®]	41
Figura 21 - Imagem ilustrativa do Palmsens [®] (B) conectados a uma cela eletroquímica contendo três eletrodos. Bomba peristáltica (1), injetor (2), cela eletroquímica (3).....	42
Figura 22 - Representação do sistema eletroquímico usando eletrodo de disco rotatório	43
Figura 23 - Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo de trabalho utilizado	45
Figura 24 - Reação entre grupo carboxílica e complexo <i>29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II)</i> (A), Imagem do eletrodo de carbono vítreo modificado com <i>29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi de cobre (II)</i> e MWCNT-COOH (B)	46
Figura 25 - Eletrodos impressos modificados com MWCNT-COOH	47
Figura 26 - Sistema sohxlet usado para limpeza (a) e sistema de aquecimento empregado nas sínteses dos polímeros (b)	55
Figura 27 - Homogeneizador utilizado nos ensaios de religação de MIP/ <i>template</i>	57
Figura 28 - Sistema de extração em fase sólida. (A) Cartuchos de MISPE; (B) MIP e (C) Sistema de pré-concentração automatizado do manifold e bomba á vácuo.	58
Figura 29 - Etapa de SPE usada neste trabalho	59
Figura 30 - Cromatógrafo empregado neste trabalho (CLAE).....	60
Figura 31 - Voltamograma cíclico para o sensor biomimético não modificado com MWCNT. (A) do eletrólito e (B) presença de $3,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 2,4-D. Eletrólito: Fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	62
Figura 32 - Estudo da resposta eletroquímica em amperometria da quantidade de complexo incorporado no eletrodo de pasta de carbono.....	63
Figura 33 - Estudo de resposta analítica para o sensor biomimético utilizando várias proporções grafite/nanotubo não-funcionalizado (m/m) (A1-A5), e nanotubo funcionalizado (A6)	65
Figura 34 - Perfil amperométrico do sensor à base de EPC modificado com complexo cloro- <i>21H,23-ftalocianina-5,10,15,20-tetraquis</i> (pentafluorofenil) ferro (III) na ausência (A) e presença de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados (B). Medidas realizadas	

	em tampão fosfato pH 6,0 e potencial aplicado de -100mV	65
Figura 35	- Perfil das curvas analíticas para detecção do herbicida 2,4-D obtidas com os dados apresentados na Figura 45. (A) Na ausência e (B) na presença de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com grupos carboxílicos	66
Figura 36	- Curva analítica obtida usando o sensor proposto modificado com 23% complexo e 50% de MWCNT, sob condições otimizadas e seu respectivo amperograma	67
Figura 37	- Gráfico do duplo recíproco obtido com o sensor biomimético.....	68
Figura 38	- Estudo de seletividade com diversos agrotóxicos em amperometria. Medidas realizadas em tampão fosfato em pH 6,0 e acetonitrila (4:1 v/v), $E_{apl} = -100\text{mV}$ vs Ag/AgCl.....	69
Figura 39	- Perfil de resposta do amperograma e sua curva analítica em eletrodo de disco rotatório (RDE) obtidas a partir de adições sucessivas de $[2,4\text{-D}] = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	71
Figura 40	- Perfil da curva analítica em sistemas batelada e hidrodinâmico na ausência e presença de O_2 e suas respectivas sensibilidades	72
Figura 41	- Imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM): (A) Grafite, (B) Amostra contendo grafite e complexo (cloro 5,10,15,20-Tetraquis(pentafluorofenil)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porfirina de ferro (III)), (B) grafite+complexo+MWCNT-COOH, (C) e (D) MWCNT-COOH.....	73
Figura 42	- Imagem em MEV do complexo cloro 5,10,15,20-Tetraquis (pentafluorofenil)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porfirina de ferro (III) (A) e seu EDX (B). Condições do MEV: Aceleração de voltage: 7.0 kV, magnificação: $10^5 \dots$	74
Figura 43	- Análise do MWCNT-COOH em FTIR.....	75
Figura 44	- Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com 29 <i>H</i> ,31 <i>H</i> -ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II). Na ausência e presença de diuron. Eletrólito: Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	76
Figura 45	- Resposta analítica (Δi vs [Diuron]) para eletrodo de pasta de carbono não modificada (A) e modificada (B). Medidas realizadas na amperometria em tampão fosfato pH 8,0, potencial aplicado de 750 mV.....	77

Figura 46 - Curva analítica obtida para diuron em condições otimizadas e amperograma típico (inserido) obtido com o sensor biomimético. Medidas realizadas em fosfato 0,1 mol de L ⁻¹ (pH 8,0).....	78
Figura 47 - Proposta de mecanismo de reação do diuron e o modificador biomimético	79
Figura 48 - Gráfico do duplo recíproco obtido a partir do sensor à base de NiOPc.....	80
Figura 49 - Estudo de seletividade com diversos agrotóxicos em amperometria. Medidas realizadas em tampão fosfato em pH 6,0 e acetonitrila (4:1 v/v), potencial aplicado de 750 mV vs. Ag/AgCl. [Agrotóxicos] = 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	81
Figura 50 - Voltamograma cíclico do sensor não modificado e modificado com hemina (A), modificado com hemina e hemina com óxido de grafeno (B). Condições de análise: [carbofurano] = 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), ν = 50 mVs ⁻¹	83
Figura 51 - Variação da corrente de pico anódica com a velocidade de varredura (A) e gráfico de Δi_p vs $\nu^{1/2}$ (B). Condições de análise: [Carbofurano] = 5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	84
Figura 52 - Estudo em VOQ de pH realizado com o sensor proposto. Medidas realizadas em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), f = 10 Hz, A = 100 mV, ΔE_s = 4 mV, E_{acc} = 0 V e t_{acc} = 50 s, [carbofurano] = 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	85
Figura 53 - Estudo da resposta eletroquímica em voltametria de onda quadrada (VOQ) do eletrodo não modificado, na ausência (A) e na presença (B) de carbofurano, sensor biomimético (C) e do sensor biomimético modificado com óxido de grafeno (D) na presença de carbofurano. Condições de análise: f = 10 Hz, a = 100 mV, ΔE = 4 mV, E_{ACC} = 0 V e T_{ACC} = 50 s em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) [carbofurano] = 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	86
Figura 54 - Perfil da VOQ nas condições otimizadas obtido a partir de adições sucessivas de carbofurano na concentração de 2,0 μ mol L ⁻¹ (A) e sua curva analítica (B).....	87

- Figura 55** - Perfil de resposta em pulso diferencial (DPV) obtido em diferentes concentrações de carbofurano. Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7), f= 10 Hz, A= 100 mV, ΔEs = 4 mV, E_{acc} = 0 V e t_{acc} = 50 s. **a→j**: [carbofurano] = 1,6 x 10⁻⁵, 2,0 x 10⁻⁵, 3,1 x 10⁻⁵, 3,9 x 10⁻⁵, 4,6 x 10⁻⁵, 5,3 x 10⁻⁵, 6,0 x 10⁻⁵, 6,8 x 10⁻⁵, 7,5 x 10⁻⁵, 8,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ 88
- Figura 56** - Perfil hiperbólico obtido em VOQ (A) e gráfico do duplo recíproco obtido com o sensor biomimético (B) 90
- Figura 57** - Estudo de seletividade de carbofurano com o sensor proposto 91
- Figura 58** - Estudo da resposta eletroquímica de compostos fenólicos com o sensor proposto em VOQ. Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), f = 10 Hz, A = 100 mV, ΔEs = 4 mV, E_{acc} = 0 V and t_{acc} = 50 s, [carbofurano-fenol] = 3,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ 92
- Figura 59** - Cromatograma do carbofurano-fenol (inserido) e curva analítica. Condições de análise: acetonitrila / água deionizada na razão 50:50 (v/v), taxa de fluxo de 1.0 mL min⁻¹, volume de amostra injetada de 10 μL e comprimento de onda de 254 nm 93
- Figura 60** - Resposta eletroquímica de carbofurano e diuron em eletrodo de pasta de carbono: eletrodo não modificado (A-B), modificado com NiOPc e hemina (C-D) e eletrodo modificado com NiOPc, hemina e óxido de grafeno (C-E). Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,5), [Carbofurano and diuron] = 10x10⁻⁴ mol L⁻¹ 94
- Figura 61** - Sensibilidades obtidas através da voltametria de onda quadrada para cada modificador imobilizado na superfície do eletrodo: (A) Carbofurano-fenol, (B) diuron 97
- Figura 62** - Mecanismo proposto da reação carbofurano-fenol (A) and diuron (B) A reação procede com etapa 1 seguida da etapa 2 99
- Figura 63** - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de carbofurano (mol L⁻¹): (a) 5,0 x 10⁻⁶; (b) 2,5 x 10⁻⁵; (c) 5,0 x 10⁻⁵; (d) 7,5 x 10⁻⁵; (e) 1,0 x 10⁻⁴; (f) 1,3 x 10⁻⁴ e diuron (mol L⁻¹): 5,0 x 10⁻⁵; (b) 1,0 x 10⁻⁴; (c) 2,5 x 10⁻⁴; (d) 5,0 x 10⁻⁴; (e) 7,5 x 10⁻⁴; (f) 8,7 x 10⁻⁴ Curvas analíticas de carbofurano-fenol (A) e diuron (B) Medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) e E_{apl} = 0,5 V (A) e 0,8 V (B) 101

- Figura 64** - Gráfico FIA obtido com o sensor em diferentes concentrações de agrotóxicos (mol L^{-1}), Carbofurano-fenol: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$, Diuron: (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $4,0 \times 10^{-4}$; (e) $5,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,0 \times 10^{-3}$, [Outros agrotóxicos] = $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em todas medidas. Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,8 \text{ V}$ 103
- Figura 65** - Estudo de repetitividade em FIA a partir de 21 injeções sucessivas de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de carbofurano-fenol e solução diuron, $E_{\text{APL}} = 0,8 \text{ V}$. As medições foram realizadas em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) 104
- Figura 66** - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de carbofurano-fenol (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$ e diuron (mol L^{-1}): $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-4}$; (f) $8,7 \times 10^{-4}$. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,45 \text{ V}$ 105
- Figura 67** - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de diuron (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$ e diuron (mol L^{-1}): $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-4}$; (f) $8,7 \times 10^{-4}$. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,8 \text{ V}$ 106
- Figura 68** - Voltamograma cíclico para o eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 108
- Figura 69** - Variação da corrente de pico anódica com a velocidade de varredura e inserido tem-se o gráfico de Δi_p vs $v^{1/2}$ 109
- Figura 70** - Variação linear do potencial de oxidação (E_p) vs $\log v$. Medidas realizadas em tampão fosfato (pH 8,0) contendo $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de thiram 110
- Figura 71** - Voltamograma cíclico utilizado para cálculo do coeficiente de transferência eletrônica (α_a) a partir da região de Tafel. Condições de análise: Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) e acetonitrila

	(4:1, v/v), $v = 300 \text{ mVs}^{-1}$	111
Figura 72 -	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do potencial aplicado	112
Figura 73 -	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do pH	112
Figura 74 -	Perfil amperométrico do sensor nas condições otimizadas, obtido para adições sucessivas de $49,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de thiram	113
Figura 75 -	Curva analítica do eletrodo impresso não modificado (1) e o modificado com MWCNT (2)	114
Figura 76 -	Estudo de seletividade de thiram em amperometria usando dois níveis de concentração em potencial de 800 mV. Medidas realizadas em tampão fosfato e acetonitrila (4:1 v/v) pH	115
Figura 77 -	Curva analítica de thiram em diferentes concentrações (A) e seu respectivo VOQ (B). Medidas realizadas empregando $f = 10 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).	116
Figura 78 -	Caracterização eletroquímica de diclofenaco em eletrodo de carbono vítreo modificado com 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina de cobre (II). Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$, $[\text{diclofenaco}] = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	117
Figura 79 -	Estudo de velocidade de varredura com o sensor proposto a partir da voltametria cíclica, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de diclofenaco	118
Figura 80 -	Imagem MEV do MWCNT-COOH e do complexo de cobre (II) sobre a superfície do eléctrodo de carbono vítreo (A) e MWCNT-COOH (B)	120
Figura 81 -	Imagem EDX do complexo de cobre e MWCNT-COOH.	120
Figura 82 -	Perfil hiperbólico e o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-burk obtido a partir do sensor à base de 29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi de cobre (II). Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $[\text{diclofenaco}] = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	121
Figura 83 -	Estudo da resposta eletroquímica em voltametria de onda quadrada (VOQ) do eletrodo não modificado, na ausência (A) e na presença (B)	

	de diclofenaco, o sensor modificado com MWCNT-COOH (C) e do sensor biomimético com MWCNT-COOH na presença de diclofenaco (D). Condições Análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 150 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) $[\text{diclofenaco}] = 3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 123
Figura 84 -	Perfil de resposta em VOQ para o diclofenaco em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) (A) e a curva analítica nas condições otimizadas (B). Condições Análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$ 124
Figura 85 -	Estudo de seletividade realizado em voltametria de onda quadrada (VOQ), (A) eletrólito, (B) secnidazol, piroxicam, ranitidina, ciprofloxacina, lidocaína e tetraciclina, (C) [diclofenaco]. Todos os analitos foram adicionados na concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Condições Análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$ 125
Figura 86 -	Resultado obtido em experimentos de recuperação realizados para a amostra de soro biológico nº 1 utilizando método de adição de padrão 126
Figura 87 -	Influência dos parâmetros do sistema FIA: (a) Efeito do pH sobre a resposta de diclofenaco utilizando uma taxa de fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, (b) Efeito de potencial sobre a resposta do diclofenaco, usando uma V_i de $100 \mu\text{L}$. Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $E_{\text{apl}} = 500 \text{ mV vs. Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$ 127
Figura 88 -	Influência dos parâmetros do sistema proposto FIA: (a) Efeito do volume de amostra injetada (V_i) na resposta ao diclofenaco utilizando uma taxa de fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, (b) Efeito da vazão na resposta ao diclofenaco, usando uma V_i de $100 \mu\text{L}$. Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $E_{\text{apl}} = 500 \text{ mV vs. Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$ 128
Figura 89 -	Sinal FIA obtido com o sensor biomimético para diferentes concentrações de diclofenaco (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $5,0 \times 10^{-4}$; (c) $1,0 \times 10^{-3}$; (d) $1,5 \times 10^{-3}$; (e) $2,0 \times 10^{-3}$; (f) $3,5 \times 10^{-3}$; (g) $5,0 \times 10^{-3}$ (A). Curva analítica típica no sentido crescente e decrescente de diclofenaco (B). 130
Figura 90 -	Perfil de repetibilidade em FIA para 12 injeções consecutivas de

	solução de diclofenaco na concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	131
Figura 91 -	Resultado da simulação computacional para o herbicida diuron.	134
Figura 92 -	Micrografias eletrônicas de varredura do polímero impresso (MIP) e do polímero não impresso (NIP) utilizado para detecção de diuron e preparados com o monômero ácido metacrílico	135
Figura 93 -	Imagem em FTIR do template (A), do MIP e NIP após lavagem em sistema soxhlet (B), do MIP e NIP após ensaio de 3 horas na presença do template (C) e estrutura de diuron (D).....	136
Figura 94 -	Isoterma BET para MIP _{MA}	137
Figura 95 -	Determinação de diuron em CLAE, (A) Curva de calibração, (B) Teste de seletividade com MIP _{MA-TRIM}	138
Figura 96 -	Esquema de interação de MIP e template na presença de solvente (Tampão fosfato/acetonitrila (1:2, v/v))	139
Figura 97 -	Estudo de remoção de diuron em MIP _{MA-TRIM}	140
Figura 98 -	Estudo de pH para os polímeros molecularmente impressos	141
Figura 99 -	Estudo cinético de diuron em MIP e NIP, usando o monômero MA em solução de fosfato/acetonitrila em diversas proporções v/v: (A) 1/1, (B) 1/2 e (C) 1/3	142
Figura 100 -	Estudo cinético de diuron em MIP e NIP usando ácido acrílico como monômero	144
Figura 101 -	Isotermas de adsorção dos MIP e NIP usando ácido metacrílico (MA) e ácido acrílico (AA)	145
Figura 102 -	Determinação da constante de ligação do polímero-diuron (K_L) através da isoterma de Langmuir linearizada: (A) MIP _{MA} , (B) NIP _{MA} (C) MIP _{AA} e (D) NIP _{AA}	146
Figura 103 -	Determinação da constante de ligação do polímero-diuron (K_L) através da isoterma de Freundlich linearizada: (A) MIP _{MA} , (B) NIP _{MA} (C) MIP _{AA} e (D) NIP _{AA}	147
Figura 104 -	Gráficos representando a seletividade do MIP usando monômeros MA (A) e AA (B) em diferentes concentrações de diuron, carbofurano e 2,4-D.	149

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Comparação dos valores de referência para a máxima quantidade de resíduos de agrotóxicos usados nesse trabalho em água potável.....	3
Tabela 2 -	Enzimas P450 que são responsáveis pela metabolização de fármacos e agrotóxicos pela P450	24
Tabela 3 -	Estrutura de alguns monômeros comumente usados na síntese de MIPs e o tipo de ligação realizada.....	30
Tabela 4 -	Procedência dos reagentes utilizados nesse trabalho	40
Tabela 5 -	Complexos organometálicos utilizados como modificadores biomiméticos	43
Tabela 6 -	Monômeros comumente usados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.....	52
Tabela 7 -	Sínteses realizadas para os monômeros ácido metacrílico e ácido acrílico utilizando diferentes agentes reticulantes	54
Tabela 8 -	Condições cromatográficas de cada analito.....	60
Tabela 9 -	Parâmetros otimizados para a resposta do sensor biomimético sem MWCNT	64
Tabela 10 -	Valores da recuperação de encontrados com o sensor biomimético na presença de MWCNT em amostras de solo após enriquecimento com 2,4-D.....	70
Tabela 11 -	Estudo de repetibilidade do sensor biomimético.....	70
Tabela 12 -	Parâmetros otimizados e características do sensor biomimético para diuron	77
Tabela 13 -	Dados obtidos na recuperação de diuron em amostras águas de rios com o sensor biomimético	82
Tabela 14 -	Resultados obtidos com o sensor biomimético em amostras de tomate fortificadas	82
Tabela 15 -	Parâmetros otimizados do sensor biomimético proposto.....	85
Tabela 16 -	Sensores eletroquímicos usados para detecção de carbofurano	89
Tabela 17 -	Resultados obtidos para análises de amostras de tomates e cenoura coletados de supermercados da cidade de São Carlos/SP	91
Tabela 18 -	Parâmetros otimizados para o sensor proposto para detecção	

de diuron e carbofurano	96
Tabela 19 - Estudo de potencial e pH em FIA	98
Tabela 20 - Estudo em fluxo e volume injetado de amostra em FIA.....	98
Tabela 21 - Estudo de potencial obtido com o sensor proposto em FIA	102
Tabela 22 - Parâmetros otimizados e características analíticas do sensor proposto no sistema FIA	102
Tabela 23 - Resultados obtidos para a análise de solo coletado na cidade de São Carlos-SP	107
Tabela 24 - Resultados obtidos para a análise de amostra de cenoura	107
Tabela 25 - Dados obtidos na recuperação de thiram em amostras de solo	116
Tabela 26 - Parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada (SVW)	122
Tabela 27 - Sensores eletroquímicos usados para detecção de diclofenaco	124
Tabela 28 - Resultados obtidos em análises de amostras de soro biológico em sistema batelada	126
Tabela 29 - Parâmetros otimizados e características analíticas do sensor biomimético no sistema FIA	129
Tabela 30 - Resultados obtidos com o sensor proposto e com método comparativo (CLAE) na análise de diclofenaco em formulações farmacêuticas.....	131
Tabela 31 - Monômeros analisados na simulação computacional	133
Tabela 32 - Estudo de área superficial e porosidade dos MIPs estudados	137
Tabela 33 - Otimização dos parâmetros para estudo de MIPs	141
Tabela 34 - Valores das constantes de ligação (K_L) obtida a partir da equação de Langmuir	146
Tabela 35 - Valores das constantes de ligação obtidas através do modelo de adsorção de Freundlich.....	148
Tabela 36 - Concentração (C) de cada agrotóxico obtido no teste de Seletividade.....	151
Tabela 37 - Avaliação da seletividade do MIP _{MA} para diuron e possíveis interferentes	151
Tabela 38 - Estudo de MIP em amostras ambientais (rios).....	152
Tabela 39 - Resultado das análises da extração em fase sólida (SPE) para diuron, obtidos através do método oficial de análise (CLAE).....	153

Tabela 40 - Resultado das análises da extração em fase sólida (MISPE) para diuron, obtidos através do método oficial de análise (CLAE).....	154
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FIA – Análise por injeção em fluxo
MIP – Polímero molecularmente impresso
NIP – Polímero sem impressão molecular
BET – Método Bunauer-Emmett-Teller
FTIR – Espectroscopia infravermelho com transformada de fourier
MEV – Microscopia eletrônica varredura
SPE – Extração em fase sólida
MISPE – Extração em fase sólida com MIP
ET – Eletrodo de trabalho
ER – Eletrodo de referência
EA – Eletrodo auxiliar
MWCNT – Nanotubo de carbono de parede múltipla
GO – Óxido de grafeno
2,4-D – Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
CYP - Citocromo
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
VOQ – Voltametria onda quadrada
DPV – Voltametria de pulso diferencial
VC – Voltametria cíclica
EGDMA – Etileno glicol dimetacrilato
TRIM - Trimetacrilato de trimetilolpropano

LISTA DE SÍMBOLOS

i - corrente elétrica

V - Volts

v - velocidade de varredura

μ - micro

A – ámpères

t - tempo

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Analitos utilizados nesse trabalho	6
1.1.1	Diuron	6
1.1.2	Ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)	7
1.1.3	Carbofurano	7
1.1.4	Thiram	9
1.1.5	Diclofenaco	9
1.2	Sensores eletroquímicos	10
1.2.1	Transdutor e camada de reconhecimento	14
1.2.2	Emprego de nanotecnologia e compostos organometálicos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos	16
1.2.2.1	Nanotubo de carbono	17
1.2.2.2	Grafeno	18
1.2.2.3	Ftalocianina e porfirina	19
1.2.3.	Eletrodos à base de materiais carbonáceos	20
1.2.3.1	Eletrodo de pasta de carbono	20
1.2.3.2	Eletrodo de carbono vítreo	21
1.2.3.3	Eletrodo impresso	22
1.2.4	Sensores Biomiméticos	22
1.3	Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)	27
1.4	Desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos	28
1.4.1	Contexto histórico e fundamentos	28
1.4.2	Estudos cinéticos de MIPs	34
1.4.2.1	Isotermas de adsorção obtidas para estudos de afinidade entre o analito e MIP	34
1.4.3	Aplicação do MIP em sistemas SPE (MISPE)	36
2	OBJETIVO	38
3	PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1	Reagentes e soluções	40
3.2	Medidas eletroquímicas	41
3.2.1	Medidas amperométricas em batelada	41
3.2.2	Medidas em fluxo (FIA)	42
3.2.3	Medidas amperométricas em eletrodo de disco rotatório	43
3.3	Construção de sensores eletroquímicos	43

3.3.1	Preparação do eletrodo à base de pasta de carbono modificada	43
3.3.1.1	Funcionalização dos nanotubos	45
3.3.2	Preparação dos sensores à base de carbono vítreo modificado	46
3.3.3	Preparação de eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH	47
3.3.4	Estudo de seletividade	47
3.3.5	Análise de amostras ambientais	48
3.3.5.1	Análise de amostras de solo	48
3.3.5.2	Análise em amostras de águas de rios	49
3.3.5.3	Análise de amostras de alimentos	49
3.3.6	Aplicação de sensor biomimético em amostras farmacêuticas	50
3.3.7	Aplicação de sensor biomimético em amostras de soro biológico	50
3.4	Polímeros molecularmente impressos	51
3.4.1	Simulação computacional dos MIPs	51
3.4.2	Caracterização dos polímeros molecularmente impressos	52
3.4.2.1	Microscópio eletrônico de varredura	52
3.4.2.2	Metódo BET (Bunauer-Emmett-Teller)	53
3.4.2.3	Espectroscopia do infravermelho (transformada de Fourier)	53
3.5	Síntese dos MIP para determinação de diuron	53
3.6	Estudo cinético de adsorção dos polímeros molecularmente impressos	56
3.7	Isoterma de adsorção	56
3.8	Testes de seletividade de MIPs	57
3.9	Análise em extração em fase sólida usando MIP (MISPE)	57
3.10	Análises cromatográficas (CLAE)	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1.	Sensor biomimético para detecção de 2,4-D	62
4.1.1	Caracterização eletroquímica do 2,4-D por voltametria cíclica em eletrodo de pasta de carbono modificado com <i>Cloro 21H,23H-ftalocianina 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorophenil) de ferro (III)</i>	62
4.1.2	Avaliação das características biomiméticas do sensor	67
4.1.3	Seletividade	68
4.1.4	Análise de amostras ambientais	69
4.1.5	Estudo de repetibilidade do sensor biomimético	70
4.1.6	Estudo eletroquímico de sensor biomimético em eletrodo de disco	

	rotatório para detecção do ácido diclorofenóxiacético (2,4-D).....	71
4.2	Sensor biomimético para detecção de diuron	76
4.2.1	Caracterização eletroquímica do diuron em eletrodo de pasta de carbono modificado com 29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II)	76
4.2.2	Proposta de mecanismo de resposta do sensor proposto.....	78
4.2.3	Verificação do caráter biomimético do sensor	79
4.2.4	Análise em amostras ambientais.....	81
4.2.5	Aplicação de sensor biomimético para detecção de diuron em amostra de alimento (Tomate)	82
4.3	Desenvolvimento de um sensor biomimético para detecção de carbofurano	83
4.3.1	Influência do pH na voltametria de onda quadrada (VOQ).....	85
4.3.2	Efeito do uso dos modificadores no sensor eletroquímico	86
4.3.3	Análise em voltametria de onda quadrada e pulso diferencial	86
4.3.4	Características do sensor biomimético	89
4.3.5	Estudo de seletividade	90
4.3.6	Aplicação do sensor em amostras reais	91
4.3.7	Estudo da resposta eletroquímica do sensor proposto para diferentes compostos fenólicos	92
4.4	Determinação eletroquímica de carbofurano e diuron em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)	94
4.4.1	Perfil de resposta da mistura de analitos por voltametria cíclica	94
4.4.2	Otimização da resposta do sensor	96
4.4.3	Efeito do uso de modificadores na resposta do sensor proposto	96
4.4.4	Estudo de pH e potencial em FIA.....	97
4.4.5	Estudo do fluxo e volume de amostra injetado em FIA	98
4.4.6	Mecanismo de reação proposto para carbofurano e diuron	99
4.4.6.1	Reação de diuron com complexo NiOPc	99
4.4.6.2	Reação de carbofurano e complexo hemina	99
4.4.7	Características analíticas do sistema FIA.....	100
4.4.8	Estudo de seletividade	103
4.4.9	Estudo de repetibilidade	104
4.4.10	Aplicação de sensor eletroquímico em cenouras e amostras de solo	104

4.5	Análise eletroquímica de thiram em eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH.....	108
4.5.1	Estudo da influência do pH e potencial nas medidas eletroquímicas.....	111
4.5.2	Perfil de resposta amperométrico para o eletrodo impresso na presença de thiram	113
4.5.3	Estudo de Seletividade.....	114
4.5.4	Análise de solo	115
4.5.5	Estudo da resposta eletroquímica de thiram em voltametria de onda quadrada	116
4.6	Desenvolvimento de sensor biomimético para detecção de diclofenaco	117
4.6.1	Caracterização eletroquímica de diclofenaco em eletrodo de carbono vítreo	117
4.6.2	Estudo de velocidade de varredura	118
4.6.3	Verificação do caráter biomimético.....	120
4.6.4	Estudo da resposta eletroquímica de diclofenaco em voltametria de onda quadrada	122
4.6.5	Estudo de seletividade	125
4.6.6	Aplicação do sensor biomimético em amostras de soro biológico.....	125
4.6.7	Análise do sensor biomimético em sistema FIA	127
4.6.8	Características analíticas do sistema FIA.....	128
4.6.9	Aplicação do sensor de biomimético em formulações farmacêuticas	131
4.6.10	Sensores eletroquímicos modificado com protoporfirina IX.....	132
4.7	Desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos (MIP)..	133
4.7.1	Simulação computacional.....	133
4.7.2	Caracterização dos polímeros molecularmente impressos	134
4.7.2.1	Medidas de superfície realizadas por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	134
4.7.2.2	Espectroscopia do infravermelho (Transformada de Fourier)	135
4.7.2.3	Metódo BET (Bunauer-Emmett-Teller)	136
4.7.3	Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	138
4.7.4	Mecanismo de interação sugerido entre o monômero e template	139
4.7.5	Estudo da remoção do template no MIP	140
4.7.6	Otimização dos parâmetros de adsorção	140

4.7.6.1	Estudos cinéticos de diuron em polímero de impressão molecular	142
4.7.7	Estudos de afinidade para avaliar a eficiência do MIP para diuron	144
4.7.8.1	Estudo de seletividade do MIP para detecção de diuron.....	148
4.7.8.2	Aplicação do MIP em amostras de rios	151
4.7.9	Análise em extração em fase sólida usando MIP (MISPE)	152
4.7.9.1	Determinação de diuron em águas de rios utilizando sistema MISPE ...	153
5	CONCLUSÃO	156
	REFERÊNCIAS	159

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência e o desenvolvimento da humanidade dependem de condições ambientais favoráveis e estáveis. Nas últimas décadas tem ocorrido com grande frequência a contaminação do solo e águas de rios por poluentes orgânicos, com destaque para os agrotóxicos e os fármacos que são muito utilizados no dia a dia. Nesse trabalho será realizado uma breve abordagem da importância da utilização de agrotóxicos e fármacos e os prejuízos que essas substâncias podem ocasionar ao meio ambiente e ao homem.

Os agrotóxicos são substâncias potencialmente tóxicas e podem ser classificados como inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), fumigantes (controle de bactérias do solo), acaricidas (controle de ácaros) entre outros.¹ São aplicados em ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e pastagens para a pecuária com a finalidade de aumentar a produtividade.² Os agrotóxicos podem sofrer no ambiente, processos físicos, químicos ou biológicos, os quais podem modificar as suas propriedades e influenciar no seu comportamento, inclusive com a formação de subprodutos com propriedades absolutamente distintas do produto inicial e cujos danos à saúde ou ao meio ambiente também são diferenciados.³ Deve-se considerar que todos os agrotóxicos são potencialmente perigosos e podem causar danos à saúde das pessoas, animais e ao meio ambiente. Neste caso devem ser levados em conta vários fatores como as características químicas e toxicológicas do produto, a exposição do indivíduo e as condições gerais do trabalho. Pode ocorrer de forma direta, durante a aplicação ou por manuseio do produto ou de forma indireta, através da água contaminada e alimentos ingeridos.⁴ A intoxicação por agrotóxicos pode promover no homem diversos problemas de saúde, como nervosismo, tremores no corpo, indisposição, fraqueza e mal estar, dor de cabeça, tonturas, vertigem, alterações visuais, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, dificuldade na respiração, alterações da pele, dores pelo corpo inteiro, irritação de nariz, garganta e olhos, convulsões, desmaio, paralisias, neoplasias e morte. Estes sintomas podem surgir de imediato após exposição ou ingestão exagerada de agrotóxicos ou podem ocorrer de modo tardio, após alguns meses ou anos.⁵

No Brasil, os agrotóxicos são considerados extremamente importantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no País, sendo que seu surgimento não se deu de forma natural, ao contrário, foi através de um conjunto de etapas como na Segunda Guerra Mundial, quando os restos de armas químicas utilizados na guerra foram adaptados para a agricultura com o objetivo principal de resolver o problema das empresas que ficariam com seus estoques e complexos industriais “Revolução Verde”. Outro fato histórico que marcou a enorme disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil foi a Lei 7.802, que facilitou o registro de centenas de substâncias tóxicas, muitas das quais já proibidas nos países desenvolvidos.⁶

Atualmente o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo com um crescimento no consumo entre 2002 a 2012 de 190%.⁷ Ao longo das duas últimas décadas o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil foi marcado por uma série de esforços isolados de órgãos estaduais de saúde, agricultura e instituições de pesquisas. Esse fato sempre impediu que o País tivesse uma noção clara dos níveis de agrotóxicos encontrados em seus produtos agrícolas.⁷

Em 2011/2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do programa da análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) realizou uma pesquisa com o objetivo de monitorar a quantidade de agrotóxicos em alimentos. Nessa pesquisa foi apurado que 36% das amostras de 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados fora dos limites permitidos (Figura 1).⁸

Figura 1 - Quantidade de agrotóxicos encontrada em alimentos coletados em vários supermercados do Brasil.



Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres ocasionados pelos agrotóxicos são responsáveis por 63% das 57 milhões de mortes declaradas no mundo em 2008, cerca de 50% do volume global. A OMS estima um aumento de 15% nos óbitos entre 2010 e 2020. No Brasil, os cânceres provocados pela contaminação por agrotóxicos representam a principal causa de óbito, sendo responsáveis por 74% das mortes ocorridas em 2008 (894 mil óbitos). Nesses óbitos ocorridos encontram-se uma percentagem bem significativa de trabalhadores que foram expostos a agrotóxicos devido à falta ou uso incorreto dos equipamentos de proteção individual (EPI).⁹

Na Tabela 1 são apresentados os limites regulamentados de resíduos dos agrotóxicos estudados nessa tese de doutorado. Os valores informados referem-se à quantidade máxima de agrotóxicos em águas para consumo humano que tiveram como base os valores de referência emitidos pela OMS, Austrália, Estados Unidos, Nova Zelândia, Japão, Canadá, União Européia, e Taiwan.¹⁰

Tabela 1 - Comparação dos valores de referência para a máxima quantidade de resíduos de agrotóxicos permitidos em água potável.¹⁰

Agrotóxicos	Concentração máxima permitida ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
	<i>Australia</i>	<i>Europa</i>	<i>Nova Zelandia</i>	<i>Japão</i>	<i>Canadá</i>	<i>Taiwan</i>	<i>Brasil</i>
Carbofurano	10	40	8	--	90	500	--
2,4-D	30	70	40	300	100	1000	30
Diuron	30	0,5	--	--	150	--	--
Thiram	3	--	6	--	--	--	--

Os fármacos são substâncias químicas com estruturas químicas e propriedades definidas. São mundialmente utilizados todos os dias com o objetivo de prevenir, combater enfermidades, proporcionando assim maior longevidade e melhor qualidade de vida. Durante o tratamento ou prevenção de algum problema de saúde, as pessoas adquirem medicamentos que, muitas vezes, não são consumidos por completo e acabam sendo descartados em lixos ou em esgoto doméstico. Durante

esse processo, os fármacos podem atingir o solo, lagos e águas de rios.¹¹ A ocorrência de fármacos no meio ambiente tem se tornado um assunto de interesse nos últimos anos. Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo a contaminação de fármacos por excreção humana a principal forma de contaminação ambiental. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são totalmente removidos nas ETEs, uma vez que os processos comumente utilizados para tratamento de águas residuais não são completamente eficientes para a completa remoção destes resíduos.^{12,13}

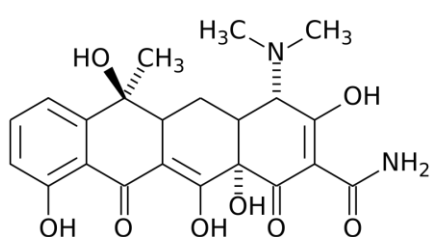
Os fármacos foram desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. O fármaco após administrado é absorvido e metabolizado, sendo uma parte significativa excretada no esgoto doméstico. Essa quantidade em termos de percentagem varia de 40% a 90% do fármaco em sua forma inicial. E uma vez excretado no meio ambiente pode sofrer bioacumulação em organismos aquáticos, como no caso dos peixes, que por sua vez podem ser consumidos posteriormente por animais ou mesmo pelo homem.^{13,14} Os fármacos constituem um grupo extenso e diversificado de compostos químicos muito utilizados em todo o mundo. Considerando apenas a União Européia temos disponíveis mais de três mil compostos ativos no mercado, e assim a preocupação com o impacto ambiental provocado por essas substâncias é de extrema relevância, pois embora os fármacos desempenhem um papel importante no organismo, podem ocasionar efeitos indesejados em organismos não alvos.¹⁴

O estudo de potenciais riscos ambientais é, atualmente, prática corrente que deve ser realizada nos laboratórios das indústrias farmacêuticas visando à segurança ambiental e impacto à saúde do homem. Os fármacos, assim como seus produtos de degradação, em termos de periculosidade possuem alguns agravantes como: persistência no meio; efeito fisiológico, devido a sua reatividade; aumento de seu efeito com o aumento da concentração e poder de combinação com outras substâncias que podem promover maior dano meio ambiente. Os efeitos adversos causados por compostos farmacêuticos incluem toxicidade aquática,

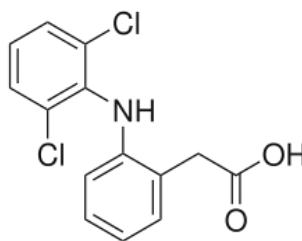
desenvolvimento da resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade, distúrbios endócrinos e reprodutivos em peixes.^{14,15} Diante disso podemos dizer que a ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, mesmo em casos em que a concentração de fármacos encontrados no ambiente for baixa, pois podem apresentar sinergismo. O efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula – tecido - órgãos – sistema - organismo - população - ecossistema.

Atualmente, tem sido reportado na literatura o desenvolvimento de metodologias analíticas suficientemente sensíveis na determinação dos fármacos residuais em ambientes aquáticos, com limites de detecção na ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.^{15,16} Esses métodos de análise são importantes para o monitoramento de substâncias de origem farmacológica, uma vez que a resolução do Conama nº 357/2005 não apresenta diretrizes específicas sobre o lançamento de compostos orgânicos de origem farmacêutica em efluentes. Nela dispõem-se apenas sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.^{15,16}

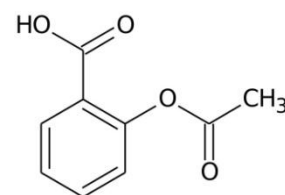
Figura 2 - Exemplos de fármacos presentes no meio ambiente



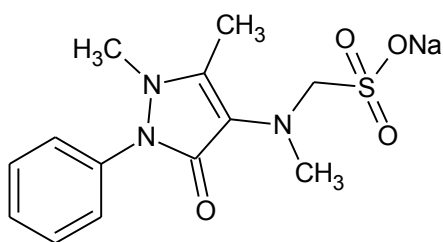
Tetraciclina



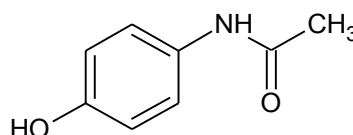
Ácido Acetilsalicílico



Diclofenaco



Dipirona sódica



Paracetamol

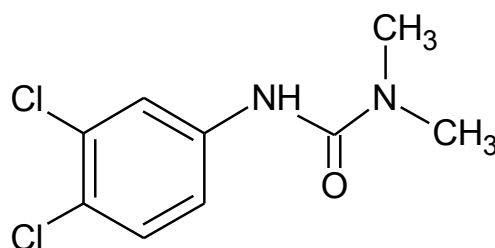
1.1 ANALITOS DE INTERESSE DESTE TRABALHO

Para o desenvolvimento do trabalho foram escolhidos os agrotóxicos 2,4-D, diuron, thiram, carbofurano e o fármaco diclofenaco que podem ser considerados potenciais poluentes ambientais.

1.1.1 Diuron

O diuron [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia] é um agrotóxico pertencente ao grupo das feniluréias. As principais características desta molécula estão relacionadas à sua baixa solubilidade em água, 40 mg L⁻¹ a 25 °C e sua persistência no solo que pode variar de alguns meses a 1 ano, dependendo da quantidade de diuron aplicado.¹⁷ O diuron 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (Figura 3) é amplamente usado no controle de ervas daninhas em campos de cultivo de soja, algodão, cana-de-açúcar, frutas cítricas, trigo e café em sistema de pré e pós-emergência. Apesar de seu uso proporcionar maior rendimento nas colheitas e consequentemente maiores lucros, o diuron promove grande impacto ambiental em algas, fungos, plantas, animais e até mesmo ao homem.¹⁸ Estudos realizados por órgãos competentes, como a agência de proteção ambiental norte-americana (EPA), provaram que esse herbicida promove a formação de tumores em ratos e, dessa forma, pode ser classificado como provável agente cancerígeno/mutagênico à espécie humana. O diuron em contato direto com o homem provoca a irritação nos olhos, pele, mucosa e perturba o funcionamento do sistema imunológico. Provoca também anormalidades no sangue, fígado e baço e atua como disruptor endócrino.¹⁹

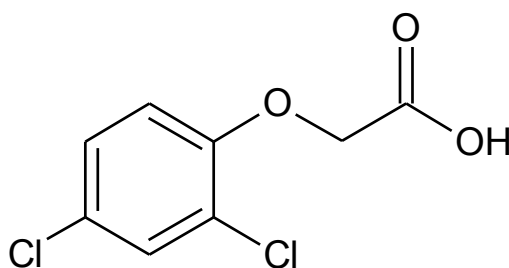
Figura 3 - Estrutura química do diuron.



1.1.2 Ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)

O ácido diclorofenóxiacético conhecido como 2,4-D (Figura 4), pertence à classe química dos fenoxiacéticos, sendo o primeiro herbicida usado no controle de plantas daninhas latifoliadas. É um dos herbicidas mais usados no mundo, sendo recomendado seu uso em pastagens, gramados e culturas gramíneas (arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, etc). O 2,4-D apresenta uma degradação lenta, com baixa absorção no solo e por isso, sua presença no meio ambiente é comum.²⁰ O herbicida 2,4-D foi desenvolvido a partir do ano de 1940, durante a segunda guerra mundial, sendo um dos componentes do agente laranja (junto com o 2,4,5-T, na guerra do Vietnã). É um produto que foi usado como arma química, causando a morte e malformações em milhares de pessoas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classificou o 2,4-D como Extremamente Tóxico para a saúde (Classe I) e perigoso para o meio Ambiente (Classe III). Apresenta solubilidade de 0,6 mg L⁻¹, toxicidade moderada para mamíferos, sendo absorvido pela pele, por via digestiva e por inalação, promovendo agudamente, alterações da glicemia de forma transitória, simulando um quadro clínico de diabetes, alterações neuromusculares por neurite periférica, problemas renais, cardiovascular e muscular e em longo prazo podem causar distúrbios reprodutivos e alguns tipos de câncer como linfoma.^{21,22}

Figura 4 - Estrutura química do 2,4-D



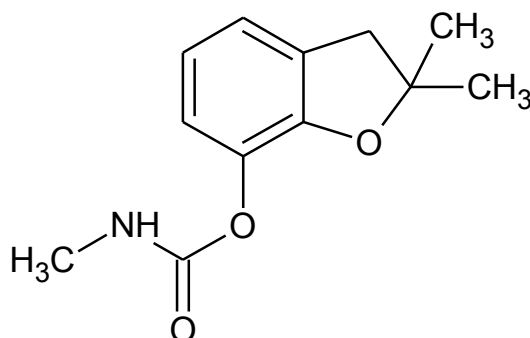
1.1.3 Carbofurano

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-*N*-metil carbamato) (Figura 5) apresenta um dos mais elevados efeitos tóxicos para os seres humanos que qualquer outro agrotóxico utilizado.²³ É um agrotóxico sistêmico, no qual a

planta o absorve através das raízes, e o distribui para todas as partes do vegetal. Sua presença em alimentos tem recebido atenção mundial devido à sua solubilidade de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de água a 25°C , e devido ao fato de que pode causar toxicidade aguda no homem.²³ Em animais os principais sintomas verificados foram perda de equilíbrio, lacrimejamento, dispnéia e tremores. A dose letal de carbofurano realizada em ratos foi de 7 a 10 mg / kg .^{23,24}

O carbofurano apresenta curta persistência no ambiente e pequeno deslocamento em regiões adjacentes. É utilizado para controle de insetos em uma grande variedade de culturas como algodão, amendoim, arroz, milho, trigo, feijão, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, repolho e tomate. Seu uso tem aumentado nos últimos anos, porque é um dos poucos inseticidas eficazes contra os pulgões de soja.²⁴

Figura 5 - Estrutura química do carbofurano.

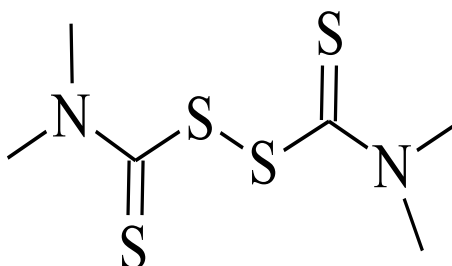


É um composto relativamente solúvel em água e é hidrolisado com facilidade em meio básico formando dióxido de carbono, 7-hidroxicarbofurano e 7-metilamina. O principal metabólito do carbofurano tanto em plantas quanto por ação microbiológica é o produto de oxidação, 3-hidroxicarbofurano. No ambiente, a permanência do carbofurano é controlada por processos de degradação que, dependendo do meio (solo, planta ou água), pode ser química ou biológica.²⁵ A sua solubilidade em água e o baixo coeficiente de adsorção no solo, $K_{ow} = 1,52$, a 20°C , facilitam seu transporte para rios e lençóis freáticos.

1.1.4 Thiram

O thiram ou dissulfeto de tetrametilthiuram (Figura 6) é um dimetilditiocarbamato usado como fungicida comum para prevenir danos de culturas no campo e proteger às colheitas da deterioração na estocagem ou transporte. O thiram também é usado como protetor de sementes e para proteger frutas, vegetais e plantas ornamentais de uma variedade de doenças causadas por fungos sendo aplicado em meios de cultura como soja, arroz, algodão, milho, feijão, ervilha e trigo.²⁶ Esse fungicida é prejudicial ao ambiente e após sua aplicação, processos físico-químicos como dessorção/adsorção e outros fenômenos químicos e biológicos podem ocorrer.²⁷ Existem relatos sobre os efeitos adversos no sistema hepático, no sistema reprodutivo e no processo de desenvolvimento do homem. O thiram possui a característica de formar complexos metálicos e considerando essa interação pode alterar a toxicidade do composto, podendo diminuir ou até aumentar.²⁸

Figura 6 - Estrutura química do thiram

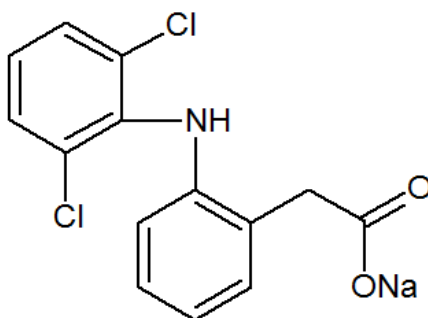


1.1.5 Diclofenaco

O diclofenaco conhecido quimicamente como 2-[(2,6-diclorofenil)amino] sal monossódico ou benzenoacético monopotássico (Figura 7) é um antiinflamatório não-esteróide (AINE) com ação principalmente analgésica e antiinflamatória, não sendo usado especificamente como antipirético, embora também tenha esta ação.²⁹ Devido ao uso extensivo, resíduos de diclofenaco têm sido detectados em águas superficiais como rios e lagos. O diclofenaco e seus produtos de degradação podem causar alguma persistência ambiental e efeitos fisiológicos, devido à sua reatividade e pelo poder da combinação com outras substâncias que podem promover uma maior toxicidade para os seres humanos e ao meio ambiente.³⁰ Há evidências que a exposição prolongada em concentrações ambientalmente relevantes de diclofenaco

leva ao comprometimento da saúde geral dos peixes, induzindo lesões renais e alteração das brânquias. A intoxicação de diclofenaco no homem provoca vomito, hemorragia, diarreia, convulsão, insuficiência do fígado, lesões renais e estomacais.
31,32

Figura 7 - Estrutura química do diclofenaco de sódio



1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Os sensores eletroquímicos são dispositivos que fazem uso de reações eletroquímicas, nas quais o sinal analítico proveniente de reações de oxidação ou redução é convertido em uma resposta mensurável através de um transdutor adequado. O transdutor é um dispositivo que transforma uma forma de energia em outra de modo que possa ser quantificável e processável.^{33,34}

Os sensores eletroquímicos têm lugar de destaque entre os modernos instrumentos de análise. Os mesmos podem ser utilizados para a determinação da concentração de analitos de interesse. Em virtude de possibilitarem um monitoramento contínuo, permitem a aquisição de informações em tempo real sobre o(s) analito(s).³⁴

Dentre os diversos tipos de sensores eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutométricos), o uso de sensores amperométricos tem se mostrado bastante atraente, devido à sua simplicidade experimental, ampla aplicação e baixo custo. Estes dispositivos, em geral, funcionam por aplicação de uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência, o que proporciona a oxidação ou redução da

espécie eletroativa sobre o eletrodo de trabalho e possibilita a medida da corrente resultante, a qual é proporcional à concentração do analito. A quantificação do analito de interesse pode ser realizada usando técnicas voltamétricas ou amperométricas.³⁵

Existem atualmente diversos tipos de eletrodos que podem se apresentar sob diferentes maneiras, usando uma variedade de materiais que permitem o monitoramento de diversas substâncias como fármacos, agrotóxicos, corantes, compostos fenólicos, etc. A modificação da superfície do eletrodo com materiais específicos tem como finalidade alterar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, possibilitando melhorar o desempenho dos sensores eletroquímicos. Eletrodos assim preparados são chamados de eletrodos quimicamente modificados (EQM).³⁶

Os EQM foram inicialmente utilizados na eletroquímica por Murray e colaboradores para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. A modificação tem como objetivo alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim o desenvolvimento de um dispositivo com respostas similares aos métodos convencionais. A escolha do tipo de eletrodo e do material é um aspecto muito importante na preparação de um EQM. Os eletrodos que têm sido muito utilizados recentemente são: eletrodos de pasta de carbono, ouro, platina, carbono vítreo, diamante dopado com boro.^{37,38}

Os tipos de imobilização mais comumente usados para imobilizar o modificador na superfície do eletrodo são a imobilização por adsorção, ligação covalente e oclusão.^{39,40}

Imobilização por adsorção: consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na imersão por um determinado tempo do eletrodo nesta solução. Geralmente é empregado nesse tipo de imobilização eletrodos de grafite pirolítico e pasta de carbono. A técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. No entanto, a mesma apresenta a desvantagem de não ser muito duradoura devido à dessorção do modificador que se encontra na superfície do eletrodo. Esse fato acaba comprometendo a resposta do sensor e seu tempo de vida.^{39,40}

Imobilização por ligação covalente: O modificador é fixado covalentemente ao substrato do eletrodo com a manipulação da reatividade dos grupos funcionais do modificador e do substrato. Substratos como o carbono e óxidos metálicos são muito convenientes para estabelecer ligações com ésteres, éteres, amidas, entre outras espécies. O método de modificação *via* ligação covalente é bastante estável em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo para a realização.^{39,40}

Imobilização por oclusão em filmes poliméricos: consistem no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Desta forma, filmes poliméricos têm sido empregados em eletrodos quimicamente modificados e usados no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade. Devido à grande variedade das características dos polímeros, podem-se explorar suas propriedades conforme o interesse.^{39,40}

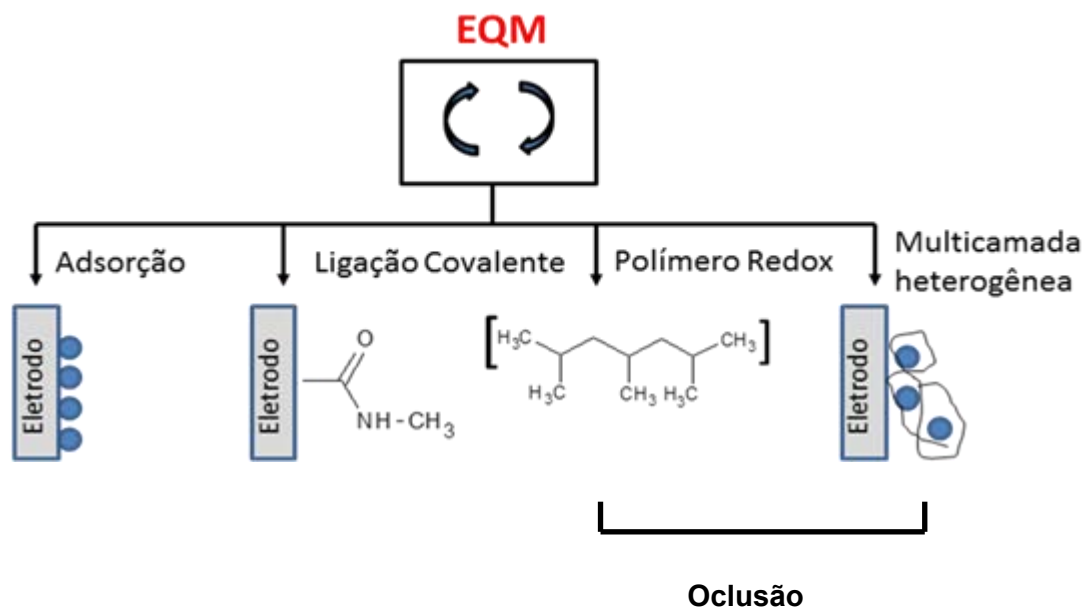
Imobilização por oclusão em materiais compósitos: destacam-se os materiais compósitos, onde duas ou mais substâncias combinadas passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. Compósitos podem ser formados pela combinação de diferentes materiais, do tipo inorgânico-inorgânico, orgânico-orgânico ou orgânico-inorgânico (sendo, neste último caso, também chamados de materiais híbridos). Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono, tais como em eletrodos de pasta de carbono e grafite-epóxi. Uma característica importante é que o aglutinante empregado na síntese da pasta de carbono deve ser inerte, sendo geralmente empregado óleo mineral (Nujol).^{39,40}

A Figura 8 apresenta um esquema dos tipos de imobilização mais abordados e utilizados na elaboração de sensores eletroquímicos.

Esta grande variedade de materiais proporciona um grande campo de atuação dos EQMs. Desta forma, a utilização dos EQM é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e

novos métodos de modificação de superfície de eletrodos, como na utilização de nanopartículas, que visa ampliar e potencializar as respostas de sensores eletroquímicos.

Figura 8 - Tipos de imobilização reportados na literatura.³⁹⁻⁴²



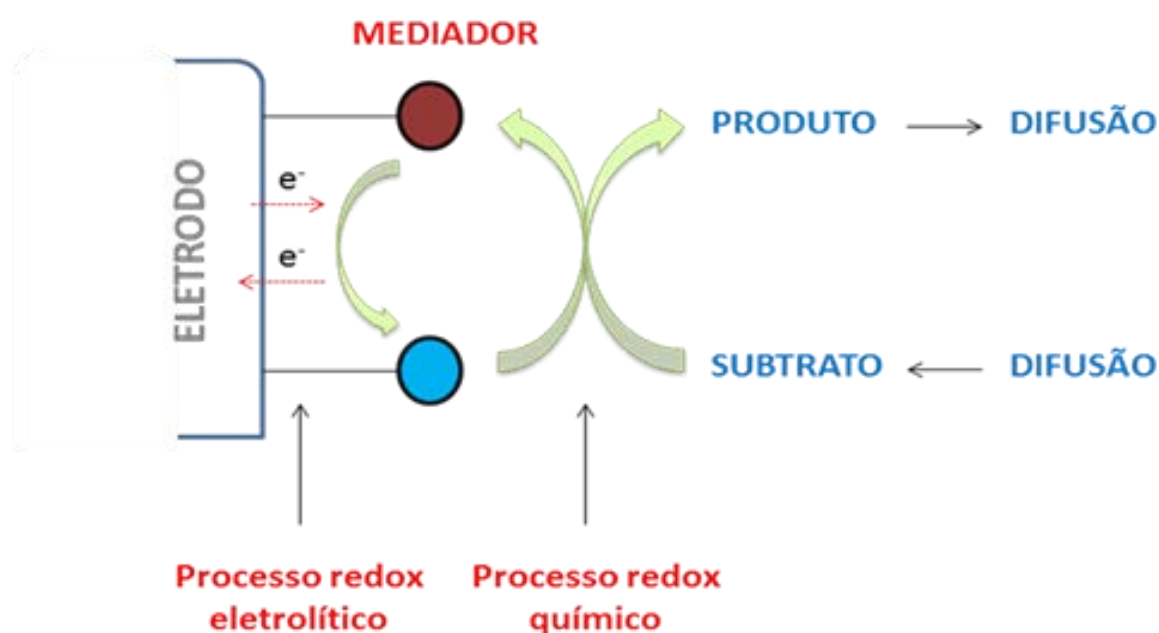
As técnicas analíticas mais utilizadas nas aplicações dos eletrodos modificados são técnicas voltamétricas, amperométricas e potenciométricas. Essas técnicas estão relacionadas com as diferentes aplicações e funções básicas do eletrodo modificado, que incluem os seguintes fenômenos: pré-concentração, reação eletroquímica e eletrocatalise.^{42,43}

- *Pré-concentração:* Para soluções diluídas, a acumulação (pré-concentração) de um analito de interesse pode ser feita em eletrodo modificado com a função de receptor. A acumulação é preferencialmente causada pela interação química seletiva entre o analito e o agente modificador ou mediante a aplicação de um determinado potencial. Os mecanismos de acumulação podem envolver alguns processos como troca iônica, ligação covalente e quimissorção.^{42,43}

- *Reação eletroquímica:* O analito reage seletivamente com o modificador imobilizado na superfície do eletrodo produzindo um sinal mensurável.^{42,43}

- *Eletrocatalise*: o modificador usado terá a função de reduzir a energia de ativação da transferência de elétrons, aumentando a velocidade de transferência e, conseqüentemente, ampliando o sinal analítico, e/ou mesmo diminuindo o sobrepotencial de análise tornando o sensor mais seletivo.^{42,43}

Figura 9 - Mecanismo de reação do modificador na superfície do eletrodo (EQM).⁴⁴



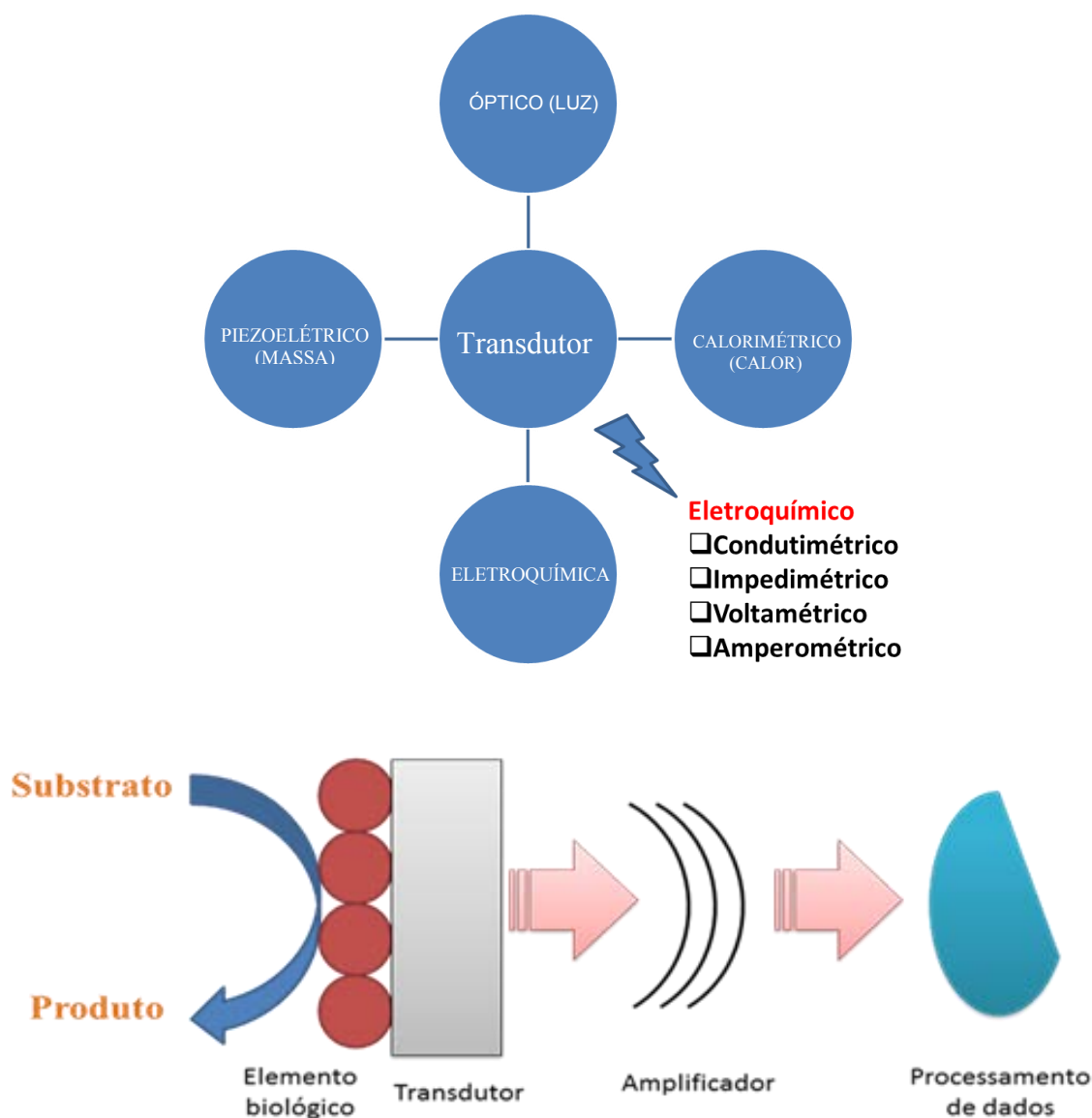
Dentre as espécies químicas que podem diminuir o sobrepotencial, temos as quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinometano, compostos organometálicos (ferroceno, metaloporfirinas e metaloftalocianinas) e nanopartículas.^{45,46} A Figura 9 apresenta uma ilustração da reação eletroquímica promovida com uso de mediadores.

1.2.1 Transdutor e camada de reconhecimento

O transdutor corresponde ao dispositivo que converte a mudança física ou química, na camada de reconhecimento, num sinal físico mensurável. Os transdutores podem ser subdivididos em quatro grupos principais, de acordo com o princípio de funcionamento: Eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e térmicos (Figura 10).

Dentre os transdutores mencionados, os transdutores eletroquímicos tem se destacado devido à sua alta sensibilidade, especificidade, análise rápida e exata. Essas características vantajosas tem permitido o desenvolvimento de novas ferramentas de análise, como por exemplo, os biossensores que utilizam componentes biológicos como células, tecidos, anticorpos, antígeno, proteína, DNA ou enzimas, os quais são imobilizados na superfície de eletrodos.

Figura 10 - Tipos de transdutores empregados em sensores e representação esquemática de um sensor.



A camada de reconhecimento é o componente muito importante para qualquer tipo de sensor, fornecendo a seletividade do sensor a um analito em particular, dentro de um grupo de analitos, evitando assim a interferência de outras substâncias. Inúmeros materiais sensíveis têm sido usados como camadas de reconhecimento em sensores eletroquímicos, desde elementos biológicos, como por exemplo as enzimas e os anticorpos (no caso dos biossensores) e elementos sintéticos (materiais orgânicos, inorgânicos, cristalinos, amorfos, ionóforos, entre outros).³⁵

1.2.2 Emprego de nanotecnologia e compostos organometálicos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos

A ciência e a tecnologia em nanoescala têm atraído muita atenção nos últimos anos, em função da expectativa quanto ao impacto que os materiais nanoestruturados podem causar em diversas áreas. Com o exponencial crescimento nos últimos anos da ciência em nanoescala, alguns termos surgiram para designar essa área de conhecimento: o termo “nanociência” vem sendo utilizado para descrever a preparação e o estudo do comportamento de materiais em escala nanométrica, enquanto que o termo “nanotecnologia” se refere ao desenvolvimento e aproveitamento desses materiais com propriedades diferenciadas ou potencializadas.⁴⁷

A nanotecnologia de uma forma geral corresponde à metodologia de processamento envolvendo a manipulação de átomos, ao passo que a nanociência se refere ao estudo do fenômeno e da manipulação de sistemas físicos que produzam informações significativas, em uma escala nanométrica de tamanho.⁴⁷

Por definição, os materiais nanoestruturados apresentam pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, e nesta escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico. Essas propriedades podem ser óticas, elétricas, magnéticas, catalíticas, etc. Como exemplos mais expressivos podemos citar as nanopartículas metálicas⁴⁸ nanotubos de carbono⁴⁹ e grafeno.⁵⁰

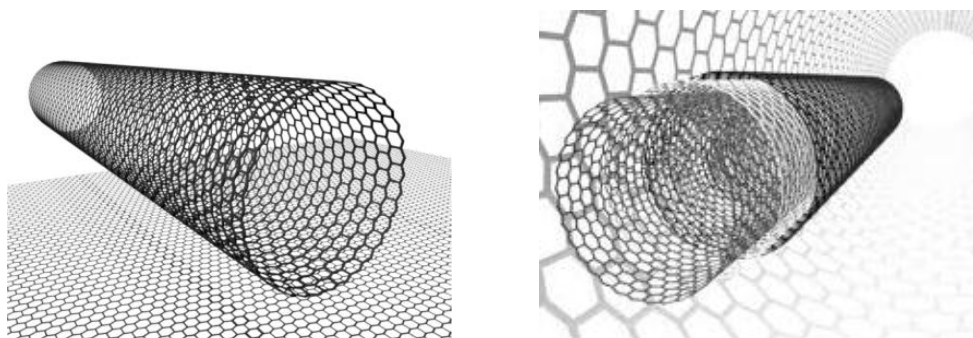
1.2.2.1 Nanotubo de carbono

Nanotubos de carbono foram introduzidos por Iijima em 1991, apresentando-se como estruturas únicas e com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis. Esses materiais são compostos por folhas de grafeno enrolados na forma de um cilindro fechado, com estrutura hexagonal ligados entre si com hibridização do tipo sp^2 e dimensões nanométricas, formando uma cavidade interna oca. Os nanotubos de carbono possuem usualmente uma faixa de diâmetros de poucos ângstrons a dezenas de nanômetros e podem ter comprimentos acima de centímetros.⁵¹

Os nanotubos de carbono podem ser divididos em dois grandes grupos, os de parede simples, compostos pelo enrolamento de uma única folha de grafeno (SWCNT, *single walled carbon nanotubes*) e os de paredes múltiplas (MWCNT, *multi walled carbon nanotubes*), que compreendem um conjunto de cilindros concêntricos com espaçamento entre suas camadas da mesma ordem do espaçamento encontrado no grafite (aproximadamente 0,34 nm).^{51,52}

Os nanotubos de carbono são estruturas químicas altamente rígidas e resistentes a tensões mecânicas. Desempenham simultaneamente as funções de condutores, tanto de calor como de eletricidade. Atualmente têm sido utilizados em numerosas aplicações práticas como dispositivos emissores de elétrons, armazenagem de energia, sensores eletroquímicos, entre outros.^{51,52} A utilização de nanotubos de carbono (Figura 11) em sensores eletroquímicos permite obter maior área superficial, amplificando o sinal analítico e até promovendo catálise.

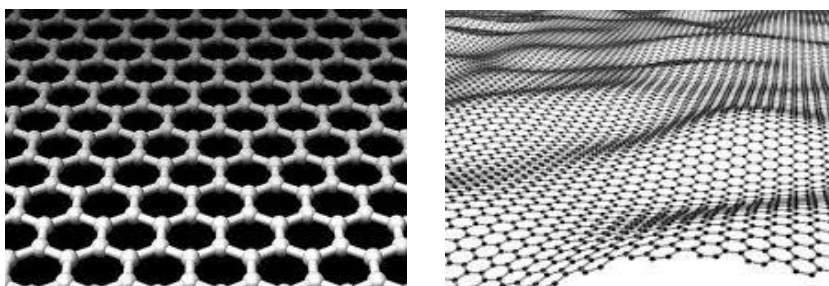
Figura 11 - Imagem ilustrativa de nanotubo de carbono.⁵²



1.2.2.2 Grafeno

O termo grafeno (Figura 12) foi proposto como uma combinação de grafite e o sufixo-eno por Hanns-Peter Boehm. É uma folha plana de átomos de carbono com ligação sp^2 densamente compactados e com espessura de um átomo, reunidos em uma estrutura cristalina hexagonal. Pode ser arranjado em estrutura planar formando moléculas esféricas de carbono (fulerenos), enrolado em estruturas 1D formando nanotubos de carbono ou empilhado em estruturas 3D formando folhas de grafite. Uma única camada de grafeno é um material puramente bidimensional. Sua rede consiste de hexágonos regulares com um átomo de carbono em cada extremidade.⁵³

Figura 12 - Imagem da estrutura do grafeno.⁵³



O grafeno tem atraído forte interesse científico e tecnológico nos últimos anos. Tem mostrado uma grande promessa em aplicações, tais como na eletrônica, armazenamento de energia e conversão (supercapacitores, baterias, células combustível, células solares) e biociência/biotecnologias. O grafeno possui algumas propriedades que o tornam altamente vantajoso, como elevada área superficial (teoricamente $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para camada única de grafeno), excelente condutividade térmica e condutividade elétrica, resistência mecânica e baixo custo. Efetivamente, o grafeno como condutor de eletricidade, é similar ao cobre, como condutor de calor supera todos os materiais conhecidos. É mais forte e mais duro que o diamante e pode ser esticado 25% de seu comprimento.⁵⁴

Na literatura são reportados inúmeros trabalhos utilizando óxido de grafeno (GO) em sensores eletroquímicos. Nesses trabalhos foi constatado que GO imobilizado na superfície do eletrodo, permitiu um aumento bem significativo da corrente faradaica, contribuindo assim com o aumento da sensibilidade do sensor. Também foi notado que os eletrodos baseados em grafeno demonstraram

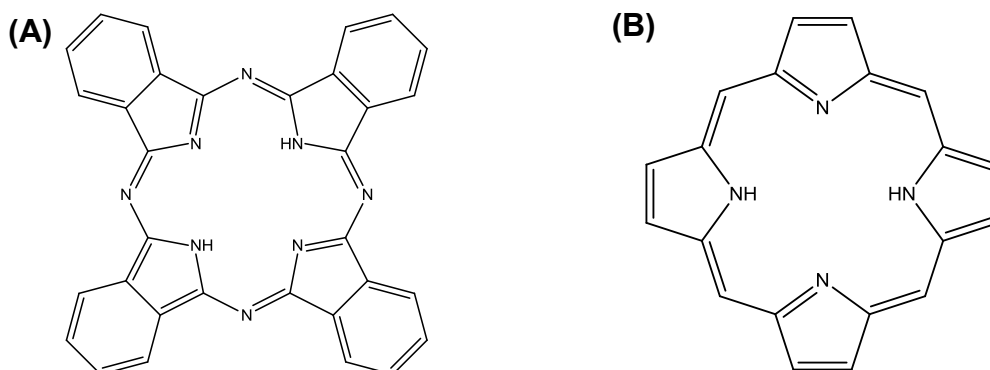
desempenho superior em termos de atividade eletrocatalítica, área superficial, condutividade em escala macroscópica e baixo custo quando comparado aos nanotubos de carbono.^{55,56}

1.2.2.3 Ftalocianina e Porfirina

As porfirinas são compostos orgânicos encontrados tanto na natureza como sintetizadas em laboratórios. Essas macromoléculas formam uma importante classe de compostos macrociclos tetrapirrólicos que contém quatro anéis pirróis (C_4H_4NH), ligados por pontes de metino ($=CH$) através dos átomos de carbono indicado nas posições 5, 10, 15 e 20, e que possuem no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico.⁵⁷

As ftalocianinas, diferentemente das porfirinas, não são encontradas na natureza. Assim como a porfirina, o macrociclo de ftalocianina possui um conjunto de ligações duplas conjugadas gerando um sistema molecular de alta densidade eletrônica, porém há diferenças na estrutura destas macromoléculas. As diferenças estão nas quatro subunidades benzo fundidas aos anéis pirróis e na substituição dos quatro átomos de carbono por nitrogênio nas pontes de metino. Por este motivo, a ftalocianina é conhecida sistematicamente como tetraazatetrabenzoporfirina. Os complexos metálicos do tipo azo-macrocíclico como as ftalocianinas de Fe (III), Co (II), Mn (II) entre outros, são conhecidos por sua excelente atividade catalítica em muitas reações, onde estas são totalmente dependentes do centro metálico do composto.^{58,59} Estes complexos são estáveis e apresentam estruturas similares as porfirinas que estão presentes em sistemas biológicos como hemoglobina, clorofila e citocromo.^{58,59} Na Figura 13 temos estruturas químicas de ftalocianinas e porfirinas sem o centro metálico.

Figura 13 - Imagem ilustrativa da ftalocianina (A) e porfirina (B) sem centro metálico.



A utilização de ftalocianinas e porfirinas metálicas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos apresenta-se como um grande campo de pesquisa a ser explorado, pois estes complexos facilitam a transferência eletrônica entre analito e a superfície do eletrodo, propiciando análises eletroquímicas sensíveis e seletivas em baixo potencial redox. Esses materiais podem ser imobilizados na superfície de eletrodos através de uma agente imobilizador como Nafion® ou outro polieletrólito, ou incorporado em outros materiais como nanotubos de carbono através de interações eletrostáticas.^{59,60}

1.2.3 Eletrodos à base de materiais carbonáceos

1.2.3.1 Eletrodo de pasta de carbono (EPC)

Os eletrodos de pasta de carbono são exemplos de modificação utilizando compósitos. As pastas de carbono consistem em uma mistura homogênea de grafite em pó e um líquido orgânico hidrofóbico (óleo mineral, óleo de parafina, óleo de silicone, etc.) colocados em uma cavidade de um tubo de vidro ou plástico. A sua superfície é facilmente renovada uma vez que ocorre o polimento e consequentemente renovação da superfície do eletrodo. Podem ser incorporados na pasta de carbono enzimas, mediadores, cofatores, estabilizadores, nanopartículas, entre outros. Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos que utilizam os vários tipos de modificadores, desde enzimas, DNA, hexacinaferrato, ftalocianinas, nanotubos, entre outros.^{61,62}

O aglutinante tem a função de dar consistência à mistura e também preencher os interstícios entre as partículas de grafite, deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível com a água, apresentar baixa volatilidade e não conter impurezas⁶³.

As principais vantagens do EPC são o baixo custo e facilidade de preparação, baixo ruído, corrente residual baixa, ampla janela de operação em solução aquosa e a possibilidade de renovação da superfície.⁶³

1.2.3.2 Eletrodo de carbono vítreo

O carbono vítreo possui alta estabilidade térmica, alta resistência a ataques químicos, bem como poros de pequenas dimensões, e ainda se caracteriza como um material praticamente impermeável a gases e líquidos. Estas características fazem do carbono vítreo um ótimo eletrodo inerte. Os tipos de pré-tratamento usados para preparação são o polimento mecânico, a ultra-sonificação, tratamento térmico á vácuo, irradiação com laser e o tratamento eletroquímico.⁶⁴

A modificação de um eletrodo de carbono vítreo pode ocorrer através do uso de reagentes como polieletrólitos (Nafion[®], polilisina, quitosana), nanotubos suspensos em dimetilformamida, entre outros.⁶⁵ O modificador deve ser solúvel no solvente usado afim de que forme um filme fino, compacto e aderente na superfície do eletrodo.

1.2.3.3 Eletrodo impresso

Os eletrodos impressos descartáveis ou eletrodos *screen-printed* (SPE) têm sido amplamente empregados como uma alternativa ao uso de eletrodos convencionais, como, por exemplo, eletrodos de mercúrio, carbono vítreo, pasta de carbono, ouro, platina, prata e outros em eletroanálise, cuja utilização apresenta como vantagem oferecer sistemas mais simples, mais compactos e descartáveis, o que diminui as etapas de limpeza entre as análises e envenenamento da superfície do eletrodo.⁶⁶ Esses dispositivos consistem basicamente em um filme depositado sobre um suporte inerte, pelo método conhecido por “silk-screen”, coberto por uma segunda camada de material isolante elétrico, que é responsável pela definição de uma área de contato elétrico interligado a área superficial ativa do eletrodo em outra extremidade, porém recoberta superficialmente. O eletrodo de trabalho pode ser modificado com modificadores como compostos organometálicos, enzimas, DNA,

nanopartículas, etc. O desenvolvimento de eletrodos impressos (EI) oferece um completo sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia, ou seja, os eletrodos apresentam-se na forma de um único sistema, contendo um arranjo de eletrodos, onde eletrodos de trabalho, auxiliar e referência são impressos no mesmo suporte. Os EI são dispositivos de baixo custo que permitem a comercialização na forma de eletrodos descartáveis. Como consequência, tem mostrado alta versatilidade de aplicações, tanto na forma de eletrodo convencional, quanto na forma de eletrodo modificado.^{66,67}

O uso de eletrodos impressos modificados ou até mesmo não modificados tem apresentado diversas vantagens requeridas para acompanhar o desenvolvimento tecnológico atual, como é o caso da procura por instrumentos eletroanalíticos portáteis, robustos, que ofereçam alta sensibilidade e seletividade, redução de contaminação e interferências, baixo peso e pequeno tamanho e longo tempo de vida.⁶⁷

1.2.4 Sensores biomiméticos

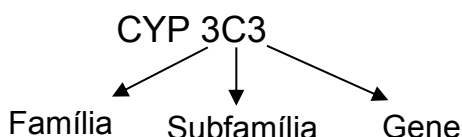
Os sensores biomiméticos estão relacionados com os mecanismos de reconhecimento de substratos enzimáticos através de enzimas artificiais. É de conhecimento que uma enzima artificial executa os mesmos processos realizados pelo catalisador biológico, porém não necessariamente seguindo o mesmo caminho.⁶⁸ Quando comparado aos biossensores, os sensores biomiméticos são mais robustos e possuem um tempo de vida maior por se basear em um material de reconhecimento, que não sofre desnaturação como ocorre com o material biológico. Os sensores biomiméticos possuem características vantajosas que permitem a aplicação em vários tipos de matrizes, sob condições adversas como pH extremos, altas temperatura e também em presença de solventes orgânicos.^{69,70}

Os sensores biomiméticos foram propostos neste trabalho visando obter sensores amperométricos mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais, que possuem como base materiais biológicos.⁷⁰ Em particular, o uso de um sensor biomimético para agrotóxicos e fármacos por exemplo, terá a vantagem adicional em termos de seletividade, uma vez que, as enzimas usadas para a detecção de agrotóxicos, como acetilcolinesterase⁷¹ tirosinase⁷² e peroxidase⁷³ não são seletivas para um determinado analito. Adicionalmente, a

resposta eletroquímica para os sensores biomiméticos oferecerá um sinal direto proporcional à concentração do agrotóxico de interesse. 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 conhecidos, e neste sentido as enzimas P450, encaixam-se perfeitamente nestes requerimentos.

O termo enzima P450 se refere ao fato de que quando monóxido de carbono (CO) está na forma reduzida, este se liga a estas enzimas e produz um espectro de absorção característico que apresentam um pico de aproximadamente 450 nm.⁷⁴

As enzimas P450 constituem um dos principais sistemas enzimáticos do organismo que atua sobre xenobióticos. Localizam-se no retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e outras membranas. Está intimamente ligado a outro componente vital do sistema: NADPH citocromo P450 redutase. As enzimas P450 são constituídas por 40 isoenzimas cuja expressão genética está em 27 famílias de genes, totalizando 7.700 sequências distintas de CYP até setembro de 2007. A nomenclatura destas isoenzimas inclui a família, subfamília e o gene⁷⁵, segundo a ilustração a seguir:



Estima-se que 90% das drogas oxidadas são processadas pelas enzimas CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4. Em termos de atividade funcional no organismo humano o CYP 3A4 e CYP 2D6 são as isoenzimas de maior relevância quantitativa. O CYP 3A4 é a principal P450 que metaboliza drogas no homem.^{76,77}

As enzimas P450 promovem a metabolização de diversas substâncias no organismo e dentre elas têm-se reações como a degradação de xenobióticos como agrotóxicos organoclorados e disruptores endócrinos, e a metabolização de fármacos e agrotóxicos. As enzimas P450 são representantes das monooxigenases, sendo capazes de catalisar seletivamente uma grande variedade de reações de oxidação. A especificidade das P450 varia de enzima para enzima, sendo que a metabolização de xenobióticos pode ocorrer para um único substrato ou para vários.

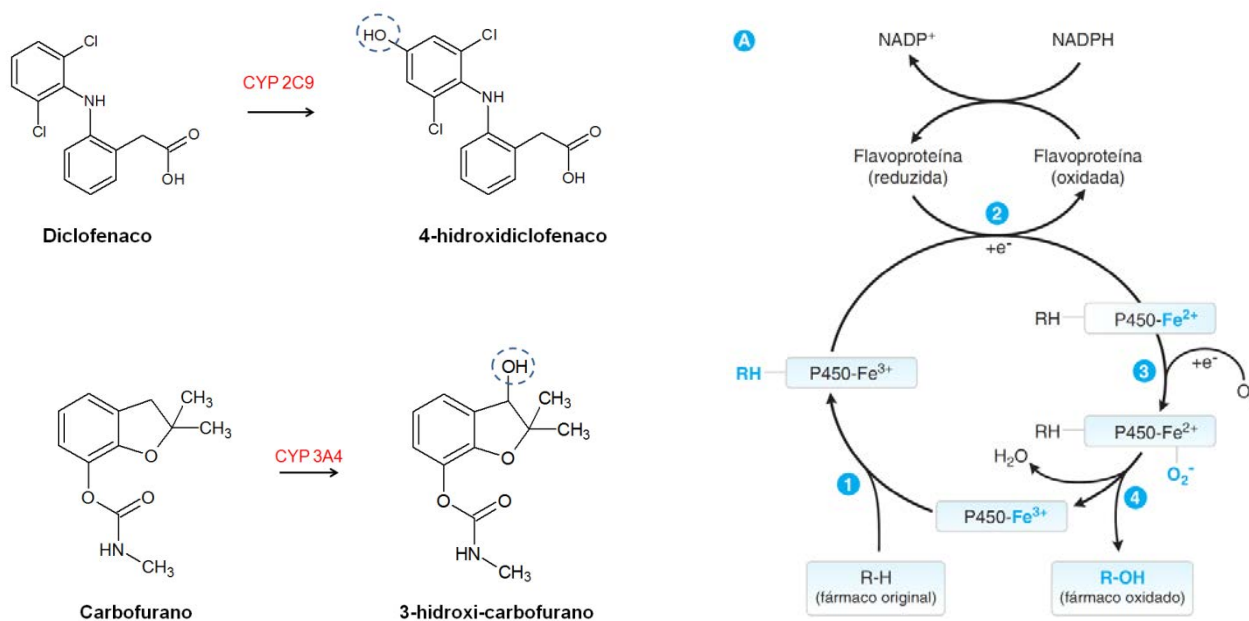
Na Tabela 2, são apresentados alguns agrotóxicos e fármacos que são metabolizados pelas P450.^{77,78}

Tabela 2: Enzimas P450 que são responsáveis pela metabolização de fármacos e agrotóxicos pela P450.

Isoenzima	Substrato metabolizado		
CYP1A2	cafeína	propanolol	clozapina
CYP2C9	diclofenaco	piroxicam	ibuprofeno
CYP3A4	thiram	clorpirfós	paration
	carbofurano	diuron	2,4-D

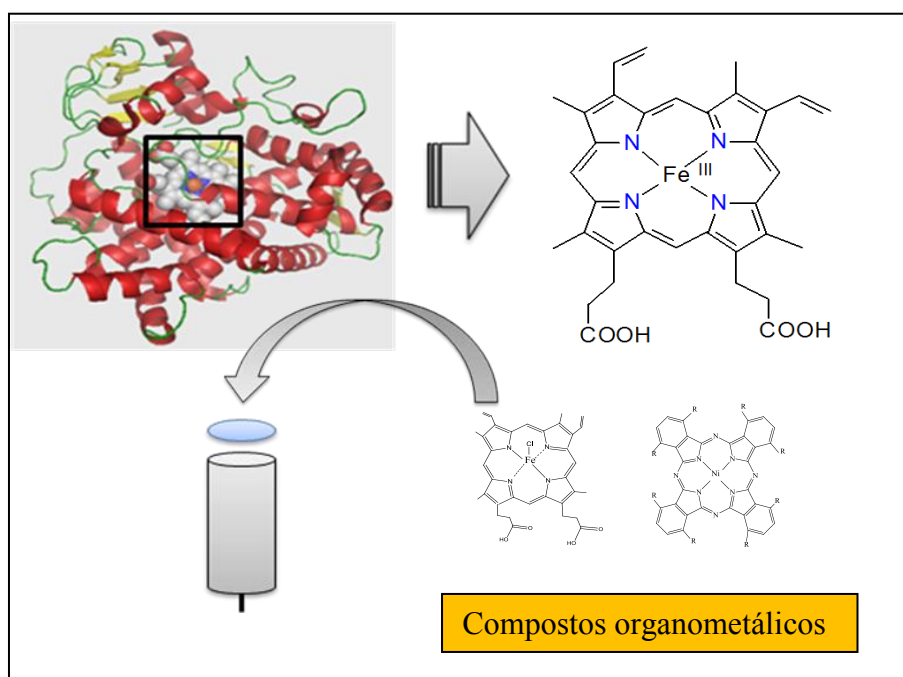
Na Figura 14 é apresentado o conjunto de reações da enzima P450 sobre agrotóxicos e fármacos, através de um ciclo catalítico entre a P450 e o substrato, antes de obter o substrato final.

Figura 14 - Mecanismo de reação da enzima P450 sobre fármacos e agrotóxicos.⁷⁸



Atualmente as enzimas P450 têm sido identificadas em todas as linhagens vivas, incluindo mamíferos, aves, peixes, insetos, vermes, plantas, fungos, bactérias, etc, produzindo metabólitos que normalmente são essenciais ou fisiologicamente benéficos.^{78,79} As enzimas P450 pertencem ao grupo heme proteína, e possuem um sitio ativo comum, ferro protoporfirina IX, que é responsável pela atividade catalítica da enzima. A mimetização da estrutura ferro protoporfirina IX é neste caso uma alternativa altamente promissora de sintetizar artificialmente a enzima P450 (Figura 15).^{79,80} Para isto, foram empregados compostos derivados de ftalocianinas e porfirinas que possuem estruturas químicas semelhantes ao sitio ativo da P450.

Figura 15 - Estrutura da ferro protoporfirina IX e complexos organometálicos a base de porfirinas e ftaliocianinas usados para desenvolvimento de sensores biomiméticos.



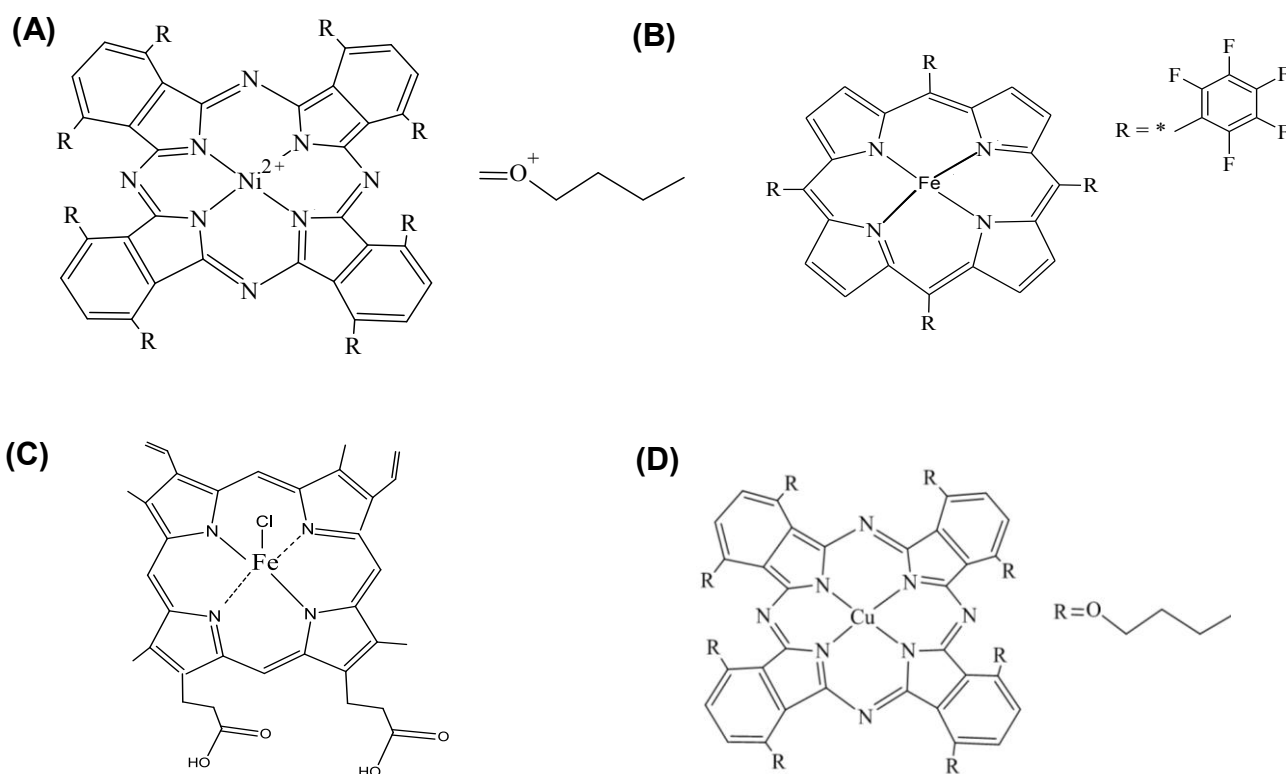
Espera-se que quando imobilizado na superfície do eletrodo, estes complexos melhorem a transferência de elétrons entre o eletrodo/sítio ativo (catalisador biomimético)/substrato (analito), permitindo assim uma maior sensibilidade e seletividade em baixos potenciais redox.^{81,82}

Na literatura tem sido visualizado inúmeros trabalhos que reportam a utilização de compostos de ftalocianinas e porfirinas em sensores eletroquímicos. Como

exemplo temos *bis*(piridil)ftalocianina ferro (II),⁸³ ftalocianina de cobalto⁸⁴ e ftalocianina de manganês (III)⁸⁵ e que têm sido utilizados de forma satisfatória como modificadores em sensores eletroquímicos biomiméticos para a monitoramento de poluentes ambientais emergentes, como drogas, hormônios e agrotóxicos.

Dentre os complexos organometálicos que foram utilizados como catalisadores biomiméticos da P450, devido à semelhança com a estrutura química da ferro protoporfirina IX tem-se o complexo *29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II)* e o *cloro 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorfenil) ferro (III)*, *31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II)* e *hemina* (Figura 16).

Figura 16 - Estrutura química: (A) complexo 29H, 31H-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II); (B) complexo cloro 21H, 23H-porfirina 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorophenil) ferro (III); (C) hemina e (D) 31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II).



1.3 SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

O desenvolvimento de métodos analíticos que combinam menor tempo de análise, maior sensibilidade e seletividade, simplicidade no manuseio, baixo custo e potencialidade adequada para automação constitui-se num campo de pesquisa amplo e em constante expansão na área de Química Analítica.⁸⁶ Nesse contexto, a análise por injeção em fluxo, FIA - *Flow Injection Analysis* tem sido explorada com sucesso na análise de grande diversidade de substâncias, proporcionando várias vantagens, tais como, uso de instrumentação versátil, baixo custo dos componentes do sistema, elevada frequência de amostragem, consumo reduzido de reagentes e amostras e, conseqüentemente, redução na geração de resíduos. Além disto, o sistema FIA pode ser automatizado, minimizando os riscos de intoxicação do analista, devido a uma menor exposição aos reagentes e amostras.⁸⁷

Os primeiros trabalhos empregando FIA foram propostos por Ruzicka e Hansen, em 1975, como um novo conceito de análises químicas. Esses trabalhos foram baseados em um processo de automatização de procedimentos analíticos, onde é introduzido um volume discreto e reproduzível da amostra em um fluxo transportador (carregador) não segmentado, que continuamente flui em direção ao detector. Durante o transporte, a amostra se dispersa e pode ou não, sofrer reações químicas e/ou passar por etapas de separação e/ou concentração, gerando uma "zona de amostragem" de um produto adequado para a quantificação. Ao atingir o detector, a zona de amostragem origina um sinal transiente resultante do gradiente de concentração gerado durante o transporte na solução carregadora (ou transportadora) em fluxo contínuo.⁸⁸

A detecção eletroquímica pode oferecer vantagens frente a outros sistemas de detecção, como baixo custo de instrumentação, simplicidade de aplicação e minimização de etapas de preparação de amostras. Adicionalmente, diversas espécies a serem analisadas podem ser pré-concentradas sobre eletrodos, tanto por processos de adsorção como por eletrodeposição. Os detectores eletroquímicos mais utilizados em sistemas em fluxo são os amperométricos, que foram adotados em grande parte dos trabalhos descritos na literatura. Nesta técnica, o eletrodo de trabalho (ou sensor eletroquímico) é mantido em um potencial constante adequado, no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse.⁸⁹

1.4 DESENVOLVIMENTO DE POLIMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

1.4.1 Contexto histórico e fundamentos

O fundamento de se utilizar uma molécula alvo como template para se ligar seletivamente a um sítio de reconhecimento específico foi sugerida por Mudd em 1932 e Pauling em 1940. Em 1942, Linus Pauling descreveu o preparo de anticorpos artificiais usando moléculas de antígeno como *template*. Em 1949 através de Frank Dickey foi realizado o primeiro trabalho usando produto sintético impresso (sílica gel) na adsorção seletiva de alaranjado de metila.⁹⁰

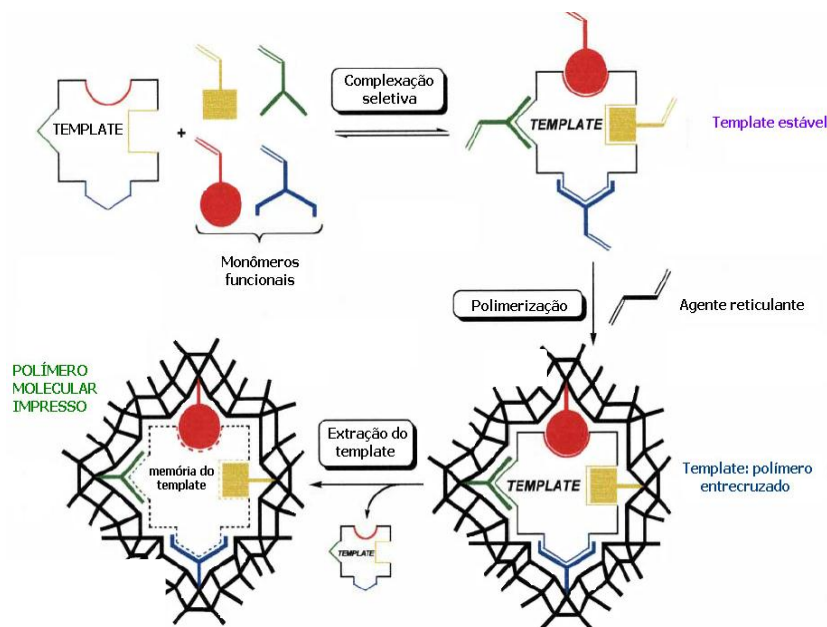
O desenvolvimento dos polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") tem sido usado para obter sistemas com reconhecimento biomimético semelhante aos sistemas específicos enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo.⁹¹ Dentre as vantagens oferecidas pelos MIP podem ser citadas: baixo custo; possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) existe; resistência a ambientes adversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam como na presença de ácidos, bases, solventes orgânicos e altas temperaturas.^{92,93}

Os MIPs são sintetizados convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em "bulk", onde a reação é realizada em sistema homogêneo. O MIP é preparado através de uma polimerização que ocorre na presença da molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do analito, contendo grupos funcionais complementares. As reações são conduzidas em frascos selados contendo monômero, analito, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio sob fluxo de N₂ ou Ar e induzida com aquecimento e/ou radiação UV por um período de 24h, onde após essa etapa, a molécula impressa também chamada de template é removida por dissolução, revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito de interesse (Figura 17).⁹⁴

Durante o processo de impressão molecular conhecido também como pré-polimerização, o analito interage com os monômeros funcionais através de ligações covalentes e não-covalentes, formando um complexo estável.⁹⁵ A impressão molecular pode então ser classificada de acordo com o tipo de interações entre

monômeros funcionais e o analito alvo na mistura pré-polimerização, como (i) impressão covalente, (ii) impressão não-covalente e (iii) impressão semi-covalente.

Figura 17 - Representação do processo de impressão molecular.^{94,95}

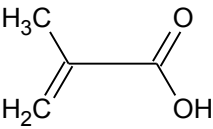
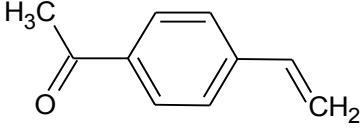
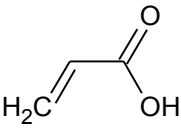
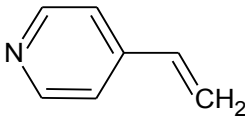
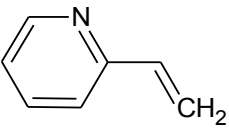
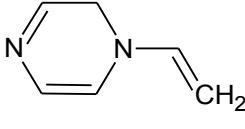


A ideia de ligação covalente envolvendo *template* e monômero funcional foi introduzido por Wulff e Sarchan.^{96,97} Nesse trabalho o *template* é removido do polímero por clivagem das ligações covalentes. A alta estabilidade das ligações formadas entre *template* e monômeros leva a formação de uma grande quantidade de sítios de ligação homogêneos, minimizando a existência de sítios de ligação não específicos.

Deve-se salientar que quando o *template* é ligado covalentemente ao monômero funcional, na sua posterior aplicação, espera-se que as interações sejam do tipo não-covalente. Esse conceito de interação não-covalente, foi introduzido por Arshady e Mosbach.^{96,97} As interações não-covalentes ocorrem entre grupos funcionais específicos nos monômeros polimerizáveis e o *template* na mistura de pré-polimerização. Essas interações podem ser do tipo ligações de hidrogênio, iônicas, interações hidrofóbicas, entre outras.⁹⁸ O procedimento não-covalente é considerado o método de impressão molecular mais usado e tem sido aplicado a uma grande variedade de moléculas. Isso ocorre pelo fato que esse tipo de interação apresenta alta versatilidade e aplicabilidade. A tabela 3 apresenta alguns monômeros e o tipo de ligação geralmente realizado.

Dentre os vários monômeros e agentes de reticulação reportados na literatura, poucos foram usados na maioria dos estudos. Normalmente os monômeros funcionais mais usados incluem o ácido metacrílico, 2- e 4-vinilpiridinas, ácido trifluorometilacrílico, acrilamida e o hidroxietilmetacrilato. Os agentes de reticulação incluem o dimetacrilato de glicol (EGDMA), divinilbenzeno e o trimetilacrilato de trimetilolpropilo (TRIM).

Tabela 3 - Estrutura de alguns monômeros comumente usados na síntese de MIPs e o tipo de ligação realizada:

	Monômero	Estrutura	Possíveis interações com o analito
Ácidos	Ácido metacrílico		Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico		
	Ácido acrílico		
Básicos	4-Vinilpiridina		Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina		
	1-Vinilimidazol		Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais

Por outro lado, deve-se também visualizar que a eficiência na formação dos sítios de ligação no MIP, é altamente influenciada pela natureza química do *template*. Para isto, o *template* deve ser estável e inerte durante a polimerização e possuir grupos funcionais que possam interagir com os grupos funcionais do(s) monômero(s). O monômero funcional desempenha um papel importante na síntese do MIP, uma vez que está intimamente relacionado com a formação dos sítios de ligação com a molécula molde.

É reportado na literatura que a melhor interação entre monômero e *template* ocorre quando há complementariedade, sendo o monômero com grupos funcionais ácidos reage com *template* com grupos funcionais básicos e *vice-versa*. Em todos os processos de impressão molecular a molécula molde desempenha um papel de importância central uma vez que direciona a organização de grupos funcionais dos monômeros.⁹⁶⁻⁹⁸ As interações de complementariedade entre a molécula molde, monômero funcional e agente de reticulação são necessárias para criar uma organização molecular.

De fato, para que tudo isto ocorra deve-se escolher um solvente porogênico que promova a solubilização dos reagentes, permitindo que as interações entre *template* e monômero ocorram com eficiência, contribuindo assim com a formação de um MIP com grande porosidade. Assim, a avaliação dos grupos funcionais dos monômeros e do *template* é importante para escolha do melhor monômero para a síntese. Deve-se entender também que a eficiência máxima da formação da impressão ocorre quando a reação de polimerização é realizada usando um solvente apropriado de modo que a solubilidade da espécie impressa não seja comprometida.

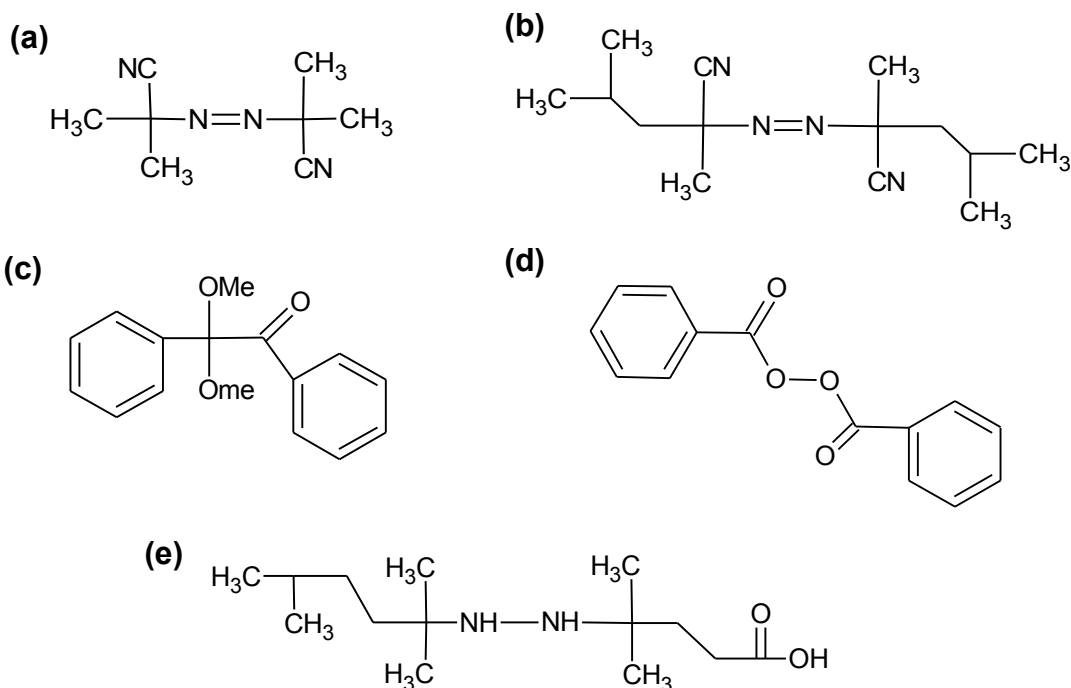
A porosidade do MIP dependerá do grau de solubilidade dos reagentes, pois quanto mais baixa a solubilidade, poros maiores, não seletivos e com baixa área superficial se formarão. Já quando há alta solubilidade se formarão poros pequenos, do tamanho da molécula alvo, e com grande área superficial.⁹⁹

A rigidez do *template* nos MIPs é realizada com a utilização de um reagente de ligação cruzada ou agente de reticulação, sendo o mais comumente usado o etileno glicol dimetacrilado (EGDMA), que deve estar em excesso durante a polimerização, geralmente seguindo uma proporção com o *template* de 1:20 até 1:200 (m/m). O agente de reticulação usado na obtenção de um MIP desempenha muitas funções como o controle da morfologia da matriz polimérica, estabilização dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular e estabilização

mecânica da matriz polimérica.¹⁰⁰ Durante a síntese tem sido usada uma quantidade elevada de agente de reticulação, de modo que se obtenham não só materiais macroporosos como também materiais mecanicamente estáveis permitindo manter a estrutura tridimensional complementar. Consequentemente, os grupos funcionais se encontrarão em numa configuração ótima para a religação da molécula molde, permitindo ao receptor o reconhecimento do substrato original e consequentemente a elevada especificidade do polímero. Em regra, os polímeros apresentam graus de reticulação superiores a 80%.^{100,101}

A reação de polimerização inicia-se mediante uso de um iniciador radicalar sob aquecimento que pode ocorrer com uso de um banho-maria ou radiação UV, em ausência de oxigênio. Os iniciadores radicalares mais conhecidos são: 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila (AIBN), azo-*bis*-dimetilvaleronitrila (ABDV), dimetilacetal de benzila, peróxido de benzóla (BPO) e ácido 4,4'-azo-*bis*-(4-ciano pentaenóico) (Figura 18).

Figura 18 - Iniciadores de polimerização utilizados na síntese de MIPs: (a) azobisisobutironitrilo (AIBN), (b) azobisdimetilvaleronitrilo (ABDV), (c) dimetilacetalo de benzilo, (d) benzóilperóxido (BPO), (e) ácido 4,4'-azo (4-cianovalérico).

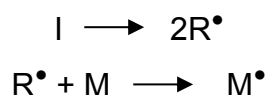


A polimerização do MIP envolve três passos importantes: iniciação, propagação e terminação.^{102,103}

Iniciação:

Logo que é iniciada a formação da cadeia polimérica esta se propaga num curto intervalo de tempo (possivelmente de um ou dois segundos), originando uma molécula com elevado peso molecular antes de ocorrer o processo de terminação, mesmo quando a quantidade consumida de monómero é baixa. Normalmente, o iniciador promove a formação dos radicais livres mantendo-se ativo durante todo o processo de polimerização. Muitos iniciadores, com diferentes propriedades químicas, podem ser usados como fonte de radicais em processos de polimerização. Normalmente, a sua concentração é baixa em comparação com a do monômero, por exemplo, 1% em relação ao número total de moles de duplas ligações polimerizáveis¹⁰¹.

A iniciação é realizada através da clivagem homolítica originando dois radicais livres ativos, seguido pelas ligações duplas no monômero que reagem com os elétrons desemparelhados do radical. Nesta reação, o centro ativo do radical ataca a ligação dupla do monômero ou do agente de reticulação, deixando um elétron desemparelhado, no monômero, como novo centro ativo.^{102,103} A ativação desta reação é normalmente realizada por decomposição térmica ou fotólise. Abaixo temos um esquema simplificado das reações realizadas nessa etapa, onde I representa o iniciador, R o radical ativado do iniciador, M o monômero e M o monômero ativado.

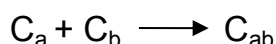


Propagação:

Após a iniciação, o crescimento da cadeia polimérica ocorre em uma velocidade de propagação muito rápida. As cadeias do polímero aumentam significativamente atingindo ao final dessa etapa um elevado peso molecular.^{102,103}

Terminação:

A terminação ocorre quando o polímero finaliza o crescimento através de elétrons livres de duas cadeias em crescimento que se juntam e formam uma única cadeia.^{102,103} No esquema abaixo C_a e C_b representam cadeias em crescimento ativas, e C_{ab} a cadeia final após o processo de terminação.

**1.4.2 Estudos cinéticos de MIPs**

Uma das maneiras de se avaliar os sítios de ligação do MIP é através do estudos cinéticos que se baseiam em um estudo de adsorção do template no MIP em certos intervalos de tempo. Neste método, uma quantidade fixa de MIP é colocada em contato com soluções em diferentes tempos de análise. Após o contato durante cada tempo determinado, a solução é separada do polímero por filtração. A seguir, a solução é usada para medir a concentração de molécula molde livre (remanescente), sendo determinada através de métodos analíticos de referência (como cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE-UV) e por diferença é obtida a quantidade ligada (adsorvida) no MIP. Neste tipo de estudo é possível encontrar o melhor tempo de adsorção do template no polímero.

1.4.2.1 Isotermas de adsorção obtidas para estudos de afinidade entre template e MIP

Isotermas de adsorção são utilizadas para determinar a quantidade máxima de template adsorvido na superfície de materiais adsorventes (MIP e NIP neste caso) a uma temperatura constante, com a finalidade de se determinar parâmetros associados à adsorção.

Existem diversos modelos matemáticos de ajuste dos dados experimentais da adsorção de um analito ao suporte adsorvente (isotermas), dentre eles o modelo de Langmuir e de Freundlich.

Uma das características da isoterma de Langmuir é presumir a formação de uma monocamada sobre o material adsorvente e assumir uma aproximação da quantidade limite de adsorção (Equação 1).^{104,105}

$$q_e = \frac{K_L \cdot C_e}{1 + a_L \cdot C_e} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: q_e é a quantidade de template adsorvido no equilíbrio (mg g^{-1}), C_e corresponde à concentração do template no equilíbrio (mg L^{-1}), K_L e a_L são constantes da isoterma de Langmuir.

A Equação de Langmuir pode ainda ser representada pela forma linearizada, (Equação 2), a qual é usada para obtenção dos parâmetros deste modelo de adsorção.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L}{K_L} C_e \quad \text{(Equação 2)}$$

A isoterma de Freundlich, por sua vez, assume a existência de uma adsorção em multicamadas e prevê uma distribuição exponencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes. É representada pela Equação 3:^{104,105}

$$q_e = K_F C_e^{b_F} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde q_e é a quantidade de template adsorvido no equilíbrio (mg g^{-1}), C_e é a concentração no equilíbrio (mg L^{-1}), K_F e b_F são parâmetros correspondes à isoterma de Freundlich. A forma linear da equação de Freundlich é dada pela Equação 4:^{104,105}

$$\ln q_e = \ln K_f + b_F \ln C_e \quad \text{(Equação 4)}$$

1.4.3 Aplicação do MIP em sistemas SPE (MISPE)

O método de extração em fase sólida (SPE) é um método amplamente empregado na extração, *clean up* e concentração de analitos, quando os mesmos estão presentes em baixos níveis de concentração. Através dessa metodologia é possível realizar a remoção do analito de interesse, separando-o de compostos interferentes em matrizes complexas. Sendo assim, a SPE é considerada um método muito importante para o preparo de amostras.

O emprego de MIP como material adsorvente na técnica de extração em fase sólida vem se destacando, pois oferece alto grau de seletividade e estabilidade química e térmica quando comparados a outros materiais, como a sílica modificada (C18), resinas de troca iônica e imunosorventes, além de reprodutibilidade no preparo do polímero. A técnica recebe a designação de extração em fase sólida com impressão molecular (MISPE). O MISPE funciona tal qual um procedimento de SPE convencional, exceto pela substituição das fases estacionárias comuns pelo polímero impresso. Assim, ela compreende as etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição dos cartuchos.¹⁰⁶

Inicialmente deve-se considerar que o solvente no qual as amostras serão percoladas não deve interferir nas interações formadas entre o polímero e o analito afim de que a retenção dos analitos seja a maior possível. As características do analito que foi usado como *template* são importantes para a escolha do melhor solvente de lavagem. Geralmente utilizam-se solventes de baixa polaridade como diclorometano, tolueno e clorofórmio ou solventes de alta polaridade como metanol. Desta forma, neste tipo de análise devem ser otimizadas as condições de pH, polaridade e volume de solvente, necessários para que seja feita a separação do *template* dos compostos interferentes. A eficiência desse método bem como a aplicabilidade desse material em diferentes matrizes dependerá de vários fatores, como quantidade de MIP usado, eficiência do MIP na adsorção, interação do *template* com o sítio ativo e a maneira de como é realizado a análise.

CAPÍTULO II

2 OBJETIVO

Este trabalho de doutorado visa:

- 2.1 Desenvolvimento e aplicação de sensores amperométricos a base de materiais carbonáceos (pasta de carbono, carbono vítreo, nanotubos de carbono e óxido de grafeno) e complexos de ftalocianina e porfirina metálicas, que são potenciais mimetizadores da enzima P450, na detecção sensível e seletiva de fármacos e agrotóxicos.
- 2.2 Desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos (MIP) seletivos a diuron para aplicação em sistemas de extração em fase sólida (MISPE) visando análise de amostras ambientais.

CAPÍTULO III

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados são de grau analítico ou CLAE, segundo a necessidade, e todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega$ a 25°C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

A Tabela 4 mostra a procedência dos reagentes usados neste doutoramento.

Tabela 4: Procedência dos reagentes utilizados nesse trabalho

Reagente	Procedência	Reagente	Procedência
Diuron	Sigma-Aldrich	Acetonitrila	Scquimica
Carbofurano	Sigma-Aldrich	Thiram	Sigma-Aldrich
Diclofenaco	Sigma-Aldrich	Ácido metacrílico (MA)	Sigma-Aldrich
2,4-D	Sigma-Aldrich	Ácido acrílico (AA)	Sigma-Aldrich
Nanotubos de carbono	Sigma-Aldrich e Dropsens	Óxido de grafeno	Sigma-Aldrich
NaH_2PO_4	Scquimica	AIBN (azobisbutironitrila)	Sigma-Aldrich
Metanol	Scquimica	Clorofórmio	Scquimica
Trimetilacrilato de trimetilolpropilo (TRIM)	Sigma-Aldrich	Etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA)	Sigma-Aldrich
Complexos porfirina	Sigma-Aldrich	Complexos ftalocianina	Sigma-Aldrich

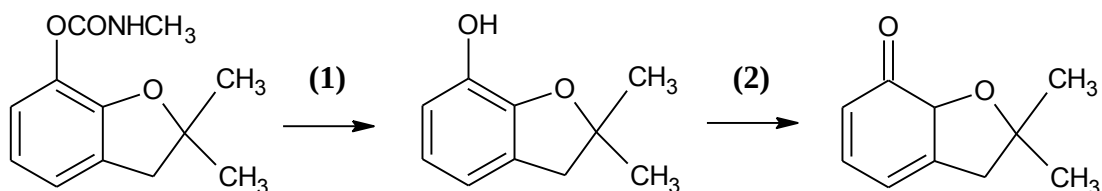
Soluções de estoque de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 2,4-D, diuron e thiram foram preparadas a partir da proporção de água deionizada e acetonitrila (4:1; 3:1; 3:1 v/v), respectivamente.

Soluções de diclofenaco foram preparadas a partir de uma solução de estoque de concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em água deionizada.

Solução de carbofurano hidrolisado (Figura 19) foi preparada dissolvendo 22 mg de carbofurano em 5 mL de acetonitrila. Esta solução foi diluída em hidróxido de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ até o volume de 100,0 mL e após essa etapa, a solução foi

aquecida a uma temperatura de 70° C em um bequer por 1 h para que ocorresse a hidrólise total de carbofurano a carbofurano-fenol.¹⁰⁷

Figura 19 - Reação de hidrólise de carbofurano (1) e sua oxidação eletroquímica (2).

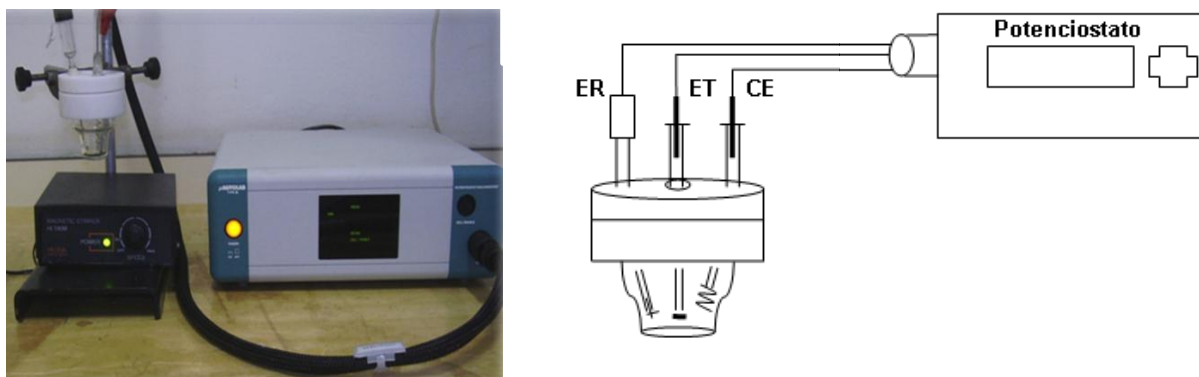


3.2 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

3.2.1 Medidas amperométricas em batelada

As medidas eletroquímicas em batelada foram realizadas em um potenciostato da μ -Autolab Tipo III (Figura 20), usando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl_{sat}) comercial (Analion[®]), um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono ($r = 0,15 \text{ cm}$) ou de carbono vítreo ($r = 0,2 \text{ cm}$).

Figura 20 - Imagem ilustrativa do μ Autolab[®]

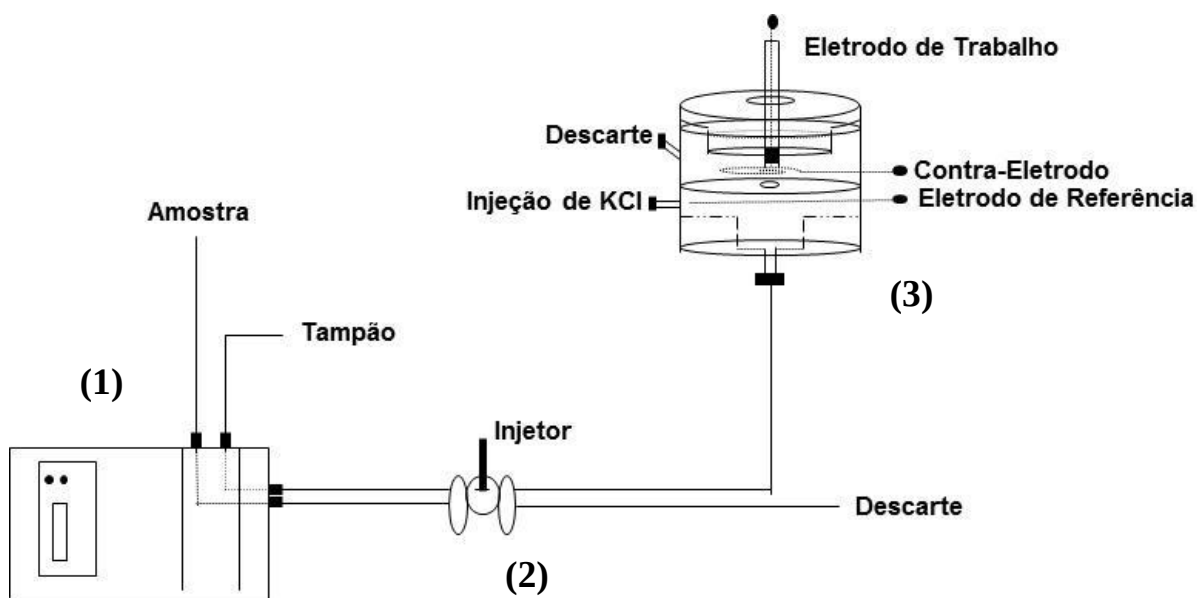


3.2.2 Medidas em fluxo (FIA)

As medidas em análise por injeção em fluxo (FIA) foram realizadas em um potenciostato da Palmsens[®] usando cela eletroquímica em fluxo do tipo *wall-jet*, que contem três eletrodos acoplados: eletrodo de trabalho (EPC), um pseudo-eletrodo de referencia (Ag/AgCl, KCl_{sat}) e um contra-eletrodo de platina. O sistema de injeção em fluxo empregado neste trabalho é composto por uma bomba peristáltica digital de quatro canais (**1**); um injetor de amostra do tipo proporcional, fabricado *at home* em Teflon (**2**); a cela eletroquímica do tipo *wall-jet* como unidade de detecção (**3**); e um potenciostato Palm-Sense[®] da Palm Instruments BV (Figura 27).

Neste sistema as soluções de análise e solução tampão (carregador) foram bombeadas pela bomba peristáltica, através de tubos de PTFE (0,8 mm de diâmetro interno), para o injetor. Na Figura 21 é apresentada uma representação do sistema FIA.

Figura 21 - Imagem ilustrativa do Palmsens[®] (B) conectados a uma cela eletroquímica contendo três eletrodos. Bomba peristáltica (1), injetor (2), cela eletroquímica (3).



3.2.3. Medidas amperométricas em eletrodo de disco rotatório

As medidas eletroquímicas com o sensor biomimético para detecção de 2,4-D foram conduzidas em eletrodo de disco rotatório acoplado ao μ -Autolab Tipo (III), utilizando as mesmas condições de análise do sistema em batelada, sendo o eletrodo de trabalho empregado similar ao eletrodo de pasta de carbono (Figura 22).

Figura 22 - Representação do sistema eletroquímico usando eletrodo de disco rotatório



3.3 CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

3.3.1 Preparação do eletrodo à base de pasta de carbono modificada

Os sensores biomiméticos propostos foram construídos a partir da utilização de complexos organometálicos à base de ftalocianinas e porfirinas (Tabela 5). Estes complexos foram imobilizados na superfície de eletrodos de pasta de carbono, e em seguida analisados eletroquimicamente para cada agrotóxico.

Tabela 5 - Complexos organometálicos utilizados como modificadores biomiméticos.

Complexos testados como potenciais catalisadores P450
<i>Ftalocianina cobre (II)</i>
<i>Hexadecafluoro-29H-31H ftalocianina cobalto</i>
<i>Bis(piridil)ftalocianina ferro (II)</i>
<i>Cloroftalocianina ferro (III)</i>

<i>Tetraquismetoxifenilporfirina cobalto (II)</i>
<i>Ftalocianina cobalto</i>
<i>29H,31H-Ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II) (NiOPc)</i>
<i>Cloro 21H,23H-porfirina 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorofenil) ferro (III)</i>
<i>Ferro protoporfirina IX</i>
<i>Hemina</i>
<i>29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi zinco (II)</i>

As quantidades de modificadores incorporadas no eletrodo de pasta de carbono foram otimizadas visando melhorar o desempenho dos sensores eletroquímicos propostos. Deve-se enfatizar que a homogeneização dos modificadores ocorreu com uso de uma espátula em um pistilo e almofariz de ágata, e a secagem procedeu-se em temperatura ambiente por 12 horas. Após essa etapa foi adicionado cerca de 80 μL óleo mineral (nujol) para obtenção da pasta de carbono. As quantidades de modificadores utilizadas em cada estudo foram:¹⁰⁸

2,4-D: sensor biomimético foi preparado misturando 30 mg de complexo 5,10,15,20-cloro tetraquis (pentafluorophenil)-21H,23H-porpirina ferro (III), 100 mg MWCNT, 100 mg grafite com 1 mL de 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0).

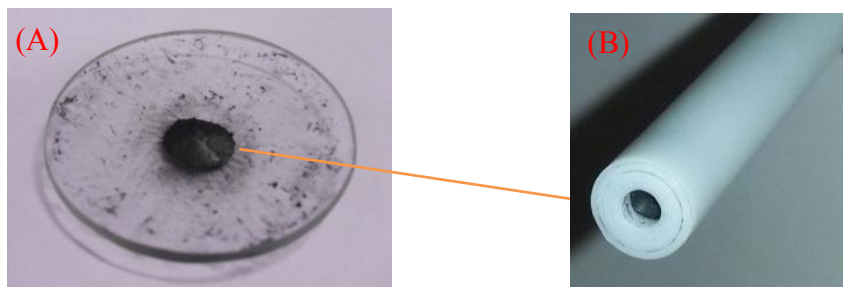
Diuron: sensor biomimético foi construído usando 30 mg de 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina níquel (II) em 100 mg de grafite e 1 mL de 0,1 mol L⁻¹ solução tampão fosfato (pH 7,0).

Carbofurano: sensor biomimético foi construído a partir de 100 mg de grafite, 0,24 mg de óxido de grafeno, 7 mg de hemina e 1 ml de solução tampão fosfato (pH7).

Carbofurano e diuron: a modificação da pasta de carbono ocorreu a partir de 100 mg de grafite, 6 mg de hemina, 8 mg de 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina níquel (II) , 0,25 mg óxido de grafeno e 1 ml solução tampão fosfato (pH 7) .

Solução tampão fosfato foi usada na preparação da pasta de carbono a fim de melhorar a condutividade nas medidas eletroquímicas.

Figura 23 - Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo de trabalho utilizado.



3.3.1.1 Funcionalização dos nanotubos

A funcionalização dos nanotubos ocorreu em uma solução sulfonitrila ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, 3:1 v/v), com agitação por 12 horas. Após essa etapa os nanotubos foram lavados com água deionizada até a solução apresentar pH 6,0-6,5, e finalmente colocados em estufa a uma temperatura de 70 °C por 6 h para secagem (Figura 30). Nesse trabalho deve-se enfatizar que foram testadas várias metodologias de funcionalização de nanotubos, sendo o método que empregou a solução sulfonitrila a que mais apresentou melhor resultado em sensores eletroquímicos.¹⁰⁹

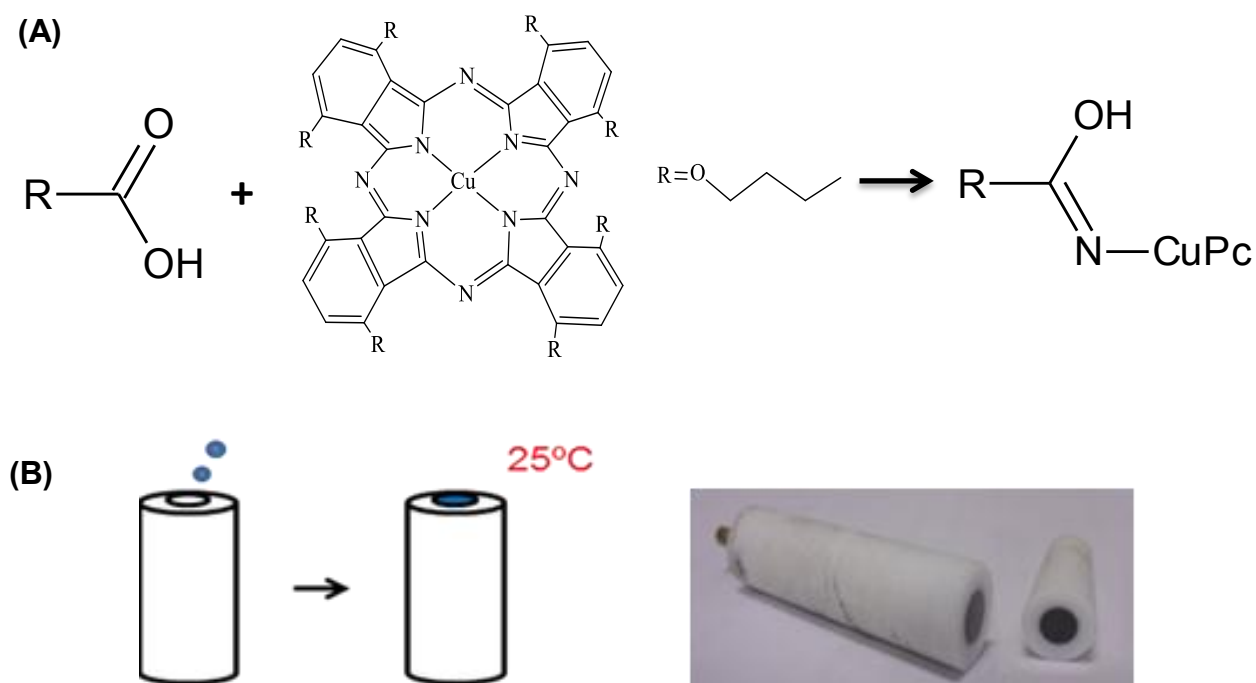
3.3.2 Preparação do sensor à base de carbono vítreo modificado

A preparação do sensor biomimético para detecção de diclofenaco iniciou-se através da limpeza de um eletrodo de carbono vítreo que possui uma área geométrica de 0,13 cm². Para a limpeza do eletrodo, a superfície de carbono vítreo foi polida mecanicamente com alumina, empregando uma politriz. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada e colocado em aparelho de ultrassom durante dois minutos, para retirar os resíduos de alumina que possam ter sido incorporados no corpo do eletrodo.¹¹⁰ Feito isto, a limpeza do eletrodo foi avaliada em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0 mmol L⁻¹, em solução tampão fosfato 0,1

mol L⁻¹ (pH 5,0), isento de oxigênio, sob borbulhamento de N₂ durante 10 minutos em cela eletroquímica, antes da realização das medidas voltamétricas. Nesta etapa foi avaliada a diferença entre os potenciais de picos anódico e catódico, que foi sempre menor que 100 mV, o qual indicou que a limpeza do eletrodo foi satisfatória.

A síntese do filme foi realizada com 2 mg de MWCNT-COOH, 1 mg de *29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II)* misturados com 1 mL de dimetilformamida (DMF) e ultrasonificado por 20 minutos.¹¹¹ A seguir foi colocado 20 µL da solução no eletrodo de carbono vítreo e submeteu-se a secagem ambiente por 12 h. Na Figura 24 é mostrado a reação entre o grupo carboxila do nanotubo funcionalizado com um complexo organometálico. Após a secagem foi verificado a formação de uma película estável e resistente na superfície do eletrodo.

Figura 24 - Reação entre grupo carboxílico e complexo *29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II)* (A), Imagem do eletrodo de carbono vítreo modificado com *29H,31H-Ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi de cobre (II)* e MWCNT-COOH (B).



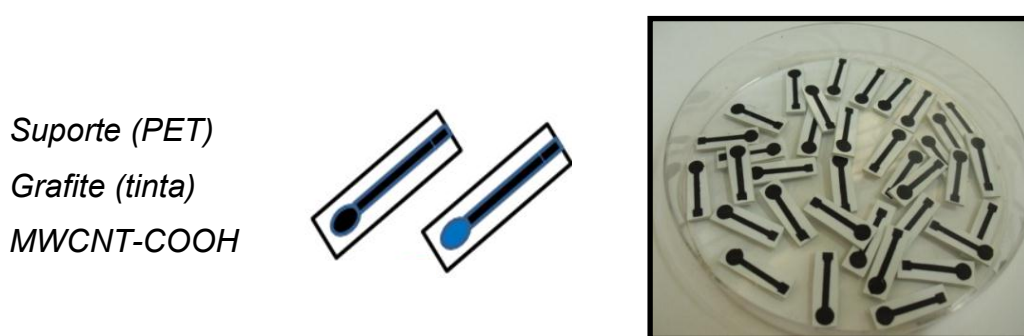
3.3.3 Preparação do eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH

O sensor impresso foi desenvolvido com a colaboração da Prof^a Dra Rosa Fireman Dutra da Universidade Federal de Pernambuco e foi usado para monitoramento de thiram.

A construção do eletrodo impresso com MWCNT-COOH foi realizada utilizando uma tinta de carbono (home-made inks) misturada a uma solução MWCNT-COOH preparada em dimetilformamida (DMF). Em seguida, a mistura foi aplicada sobre o poli(tereftalato de etileno) de apoio (PET) e curada a 60 °C durante 20 min para a formação da película e aderência ao substrato.¹¹² DMF foi usado neste caso para facilitar a dispersão dos MWCNT-COOH e para imobilização no eletrodo.

O pré-tratamento do sensor impresso foi realizado com o objetivo de eliminar resíduos de substâncias indesejáveis e promover maior estabilidade. Para isto, foi usado a voltametria cíclica com 15 varreduras sucessivas em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. Em um intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}) a 50 mV s⁻¹. A eficiência deste pré-tratamento foi avaliada utilizando a solução [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em KCl 0,1 mol L⁻¹.⁴⁹ A Figura 25 mostra eletrodos impressos sintetizados com MWCNT-COOH com área superficial de 0,12 cm².

Figura 25 - Eletrodos impressos modificados com MWCNT-COOH



3.3.4 Estudo de seletividade

-Diuron e 2,4-D: A seletividade dos sensores biomiméticos para detecção de diuron e 2,4 D foi avaliada a partir da análise de vários agrotóxicos utilizando a amperometria. As soluções de cada agrotóxico foram preparadas com água deionizada e acetonitrila na proporção de 4:1 (v/v) na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol

L⁻¹. Os agrotóxicos analisados nesse estudo foram clorpirifós, metribuzin, carbendazim, hexazinona, profenofós e ametrina.

-Carbofurano: A seletividade do sensor foi avaliada pela análise de sete agrotóxicos (clorpirifós, metribuzin, carbendazim, diuron, hexazinona, profenofós, ametrina), além de carbofurano utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ). Todas as soluções foram preparadas com uma concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, utilizando mistura de água deionizada e acetonitrila na proporção de 5:1 (v/v).

-Thiram: Para o estudo de seletividade do sensor eletroquímico para monitoramento de thiram foi utilizado a amperometria em potencial 0,8 V vs. Ag/AgCl. Os agrotóxicos analisados nesse estudo foram o 2,4-D, ametrina, metribuzin e clorpirifós. Todos foram dissolvidos em solução água deionizada e acetonitrila na proporção de na proporção de 3:1 (v/v).

-Diclofenaco de sódio: No estudo de seletividade do sensor para diclofenaco foi empregado à voltametria de onda quadrada em uma faixa de potencial de 0 a 1 V para análise dos fármacos secnidazol, piroxicam, ranitidina, fluconazol galena e efedrina cloridrato. Todos os fármacos empregados nesse estudo eram solúveis em água.

3.3.5 Análise de amostras ambientais

Os sensores eletroquímicos desenvolvidos foram aplicados em amostras ambientais, tais como amostras de rios do Estado de São Paulo, amostras de solo fértil da região de Araraquara e amostras de alimentos provenientes de supermercados da cidade de São Carlos-SP. As amostras ambientais foram submetidas a estudos de recuperação e os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos em CLAE-UV.

3.3.5.1 Análise de amostras de solo

Os sensores biomiméticos foram avaliados em amostras de solo fértil coletadas em três profundidades diferentes na região da cidade de Araraquara (277 km de São Paulo, Brasil). Cerca de 2,0 g de amostras de solo foram pesadas e

adicionadas em um béquer com 25 mL de água deionizada e acetonitrila 4:1, v/v. Em seguida a amostra de solo foi colocada no ultrassom por 5 minutos. Este procedimento foi realizado para dissolver possíveis agrotóxicos presentes nas amostras. Para isto, 1 mL das amostras preparadas foram analisadas no sensor eletroquímico e CLAE-UV. Após ser constatada ausência de agrotóxicos ou possíveis interferentes, pesou-se novamente 0,5 g de amostra de solo e adicionou-se uma concentração conhecida de agrotóxico, e completou-se com água deionizada até o volume de 10 mL. Após essa etapa as amostras foram submetidas à filtração convencional para remover substâncias insolúveis.¹⁰⁹ Testes de recuperação foram conduzidas para cada amostra preparada.

3.3.5.2 Análise em amostras de águas de rios

Os sensores e os MIPs desenvolvidos foram testados em amostras de água de três rios através de experimentos de recuperação. Todas as amostras foram coletadas na região de Araraquara, no interior do Estado de São Paulo (Brasil).

As amostras destinadas para análise em sensores eletroquímicos foram enriquecidas com uma concentração conhecida de agrotóxico em uma proporção de água de rio e acetonitrila de 4:1, v/v.

As amostras para análise em MIP usando homegeneizador foram feitas a partir da adição de 2 concentrações diferentes do agrotóxico diuron utilizando uma mistura de solvente (fosfato/acetonitrila (1:2, v/v)) pH 7,0.

As amostras de águas de rios destinadas a análises em extração em fase sólida foram preparadas a partir da adição de uma concentração de 10 ppm usando um proporção de solvente fosfato/acetonitrila 3:1, v/v em pH 7,0.

O tampão fosfato foi preparado com as águas de rios e o volume de amostra preparado foi de 5 mL.

3.3.5.3 Análise de amostras de alimentos

Os sensores amperométricos propostos para determinação de carbofuran e diuron foram avaliados em amostras de cenoura e tomate (coletados dos dois supermercados diferentes na região de São Carlos, no interior do Estado de São Paulo (Brasil)). As cenouras (*Daucus carota*) e tomates (*Styllus*) foram moídas no liquidificador na presença de uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio a

uma temperatura de 70° C durante 1 hora para hidrolisar a possível presença de carbofurano nos alimentos. Em seguida 20 mL de cada extrato foi centrifugada a uma velocidade de 3.000 rpm e uma pequena alíquota do sobrenadante foi testada no CLAE e no sensor biomimético afim de verificar a presença de agrotóxico. Após essa etapa foi recolhido cerca de 1 ml do sobrenadante de cada extrato e foi enriquecido com uma concentração conhecida de agrotóxico, e diluído em solução tampão fosfato/acetonitrila (4:1, v/v) pH 7,0 até o volume de 10 mL. A determinação da concentração de cada agrotóxico nos extratos foi realizada pelo método de adição de padrão.

3.3.6 Aplicação de sensor biomimético em amostras farmacêuticas

Nesse estudo foram analisados dois medicamentos genéricos contendo 50 e 100 mg de diclofenaco por comprimido.

Inicialmente baseando-se na dosagem de diclofenaco em cada comprimido, foram macerados 2 comprimidos com um pistilo em um almofariz. Através do valor nominal de cada comprimido foi possível preparar uma concentração conhecida de diclofenaco. Após essa etapa as amostras farmacêuticas foram submetidas à filtração convencional para a retirada de substâncias insolúveis. Os resultados obtidos com o sensor proposto foram comparados com o método convencional de análise (CLAE).¹¹³

3.3.7 Aplicação do sensor biomimético em amostras de soro biológico

As amostras de soro biológico foram obtidas voluntariamente de indivíduos aparentemente saudáveis através da coleta de sangue. O sangue foi submetido a um processo de separação usando uma centrifuga com uma rotação de 3.000 rpm. Após essa etapa o sobrenadante (soro biológico) foi recolhido e estocado na geladeira a uma temperatura de -4° C.¹¹⁴ A preparação da solução do soro biológico procedeu-se através da mistura de 1 mL do padrão diclofenaco em uma concentração conhecida e 1 mL de soro. A análise das amostras de soro procedeu-se da utilização de uma alíquota de 100 µL de cada amostra para cada medida eletroquímica. O método de análise usado para determinação de diclofenaco em amostras de soro biológico foi à adição de padrão.

3.4 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

3.4.1 Simulação computacional dos MIPs

Para o desenvolvimento de MIPs sensíveis e seletivos foi realizado inicialmente experimentos computacionais que teve como objetivo avaliar o grau de interação entre o monômero e o template. Desta forma, as simulações computacionais realizadas focaram-se na obtenção da informação que indicasse a maior afinidade entre o(s) analito (s) e diversos monômeros comercialmente disponíveis e que são comumente empregados na síntese de MIPs para diferentes analitos.

Os programas computacionais utilizados nesses estudos foram:

- 1) HyperChem® 8.0.5: Foi utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs.¹¹⁵
- 2) OpenEye® (pacote de *softwares*) contendo os programas:
 - a) *VIDA 3.0.0*: Utilizados para visualizar as moléculas modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.
 - b) *Omega2*: Gera diversos confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros de cada template, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios.
 - c) *Szybki 1.2.2*: Programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portando, mais estável.
- 3) Autolt 3.3.6.0: Aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.
- 4) Multiple Mínima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital Package) 2009: Será utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

Foram avaliados nesse estudo 20 monômeros, os quais foram nomeados de MP1 a MP20 (Tabela 6).

Tabela 6 - Monômeros comumente usados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.

Sigla	Monômero		
MP1	<i>bis-acrilamida de N,N-metileno</i>	MP11	<i>Ácido metilenosuccínico</i>
MP2	<i>Ácido imidazol-4-acrílico</i>	MP12	<i>Ácido metacrílico</i>
MP3	<i>Etil éster de imidazol-4-acrílico</i>	MP13	<i>3-divinilbenzeno</i>
MP4	<i>Ácido acrílico</i>	MP14	<i>4-divinilbenzeno</i>
MP5	<i>Acrilamida</i>	MP15	<i>Estireno</i>
MP6	<i>Acroleína</i>	MP16	<i>1-vinilimidazol</i>
MP7	<i>Alilamina</i>	MP17	<i>2-vinilpiridina</i>
MP8	<i>Acrilonitrila</i>	MP18	<i>4-vinilpiridina</i>
MP9	<i>Etileno glicol dimetacrilato</i>	MP19	<i>Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico</i>
MP10	<i>2-(cianoetilamino)etilmetacrilato</i>	MP20	<i>2-hidroxietil metacrilato</i>

3.4.2 Caracterização dos polímeros molecularmente impressos

As técnicas analíticas mais importantes usadas na caracterização morfológica dos MIP baseiam-se na observação microscópica da superfície do polímero e na medição da porosidade do mesmo e na estrutura dos grupos funcionais do material resultante. A porosidade do polímero determina a acessibilidade dos analitos aos pontos de união presentes no interior da matriz polimérica, para que quanto maior for a porosidade, mais rápido será o processo de transferência de massa e mais rapidamente se alcançará o equilíbrio. As técnicas empregadas nesse estudo encontram-se a seguir:

3.4.2.1 Microscópio eletrônico de varredura

A morfologia dos polímeros impressos e não impressos foram observados através de um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 7500F. As amostras analisadas foram recobertas com ouro e a voltagem de aceleração usada durante a microscopia foi de 2,0 kV.

3.4.2.2 Método BET (Bunauer-Emmett-Teller)

O método de adsorção de BET é o procedimento mais utilizado para a determinação da área superficial específica total. Nesse método, o gás passa sobre uma amostra resfriada à temperatura do nitrogênio líquido (77K), sob pressões de até 2 atm e pressões relativas (P/P_0) inferiores a 0,3. O N₂ adsorvido fisicamente em cada pressão produz uma alteração na composição de saída, registrada por um detector de condutividade térmica, ligado a um registrador potenciométrico. Ao aquecer a amostra, pela perda de contato do N₂ (líquido) com a célula de amostragem, o N₂ é dessorvido. A área dos picos é proporcional à massa de N₂ dessorvida. A partir do volume de N₂ obtido no ensaio e utilizando a equação de BET, determina-se o volume de nitrogênio necessário para recobrir a superfície adsorvente com uma monocamada. O equipamento utilizado foi um Micromeritics GEMINI-VII.

3.4.2.3 Espectroscopia do infravermelho (transformada de Fourier)

Os espectros de infravermelho foram registrados em um aparelho Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR System, na região de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos por transmitância, utilizando a técnica de pastilhamento com KBr. As pastilhas foram confeccionadas usando uma prensa Perkin-Elmer (7 toneladas), diluindo a amostra de interesse em KBr, na proporção de 1:100.

3.5 SÍNTESE DOS MIPS PARA DETERMINAÇÃO DE DIURON

A primeira etapa da síntese consiste em dissolver o template em um solvente porogênico. Em seguida adicionou-se o monômero contendo grupos funcionais complementares àqueles da molécula molde, o que permitiu formar em solução o complexo “monômero-molécula”, por meio de interações não covalentes, entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente foram adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização.⁹⁵⁻⁹⁷

As sínteses de MIP e NIP foram realizadas através da técnica de polimerização em *bulk* (solução) a qual é a mais comum. A preparação dos MIPS foi conduzida em frascos selados contendo o monômero previamente selecionado através das

simulações computacionais. O MIP sintetizado possuía as seguintes quantidades de reagentes: 1×10^{-4} mol L^{-1} de diuron (template), 6 mL solvente porogênico (acetonitrila), 4×10^{-4} mol de monômero, 2×10^{-3} mol reagente de ligação cruzada e $6,1 \times 10^{-5}$ mol de AIBN (iniciador radicalar). As reações ocorreram na ausência de oxigênio sob fluxo de N_2 por, pois retarda a reação de polimerização.^{116,117} O borbulhamento com N_2 ocorreu por 10 minutos e em seguida os tubos de ensaio contendo os reagentes foram colocados em banho maria a uma temperatura estável de 60° C por um período de 24 horas (Figura 26).

Nessa etapa é importante que a temperatura se mantenha sempre constante, pois a variação de temperatura pode comprometer a síntese dos MIPs, e consequentemente a formação dos sítios de ligação monômero:template. Após os primeiros minutos de aquecimento, o iniciador radicalar fornece os radicais livres para formação dos primeiros radicais e a partir deste momento a polimerização se inicia e termina com a formação de um material sólido de cor branca. Os iniciadores radicalares estudados neste trabalho foram o EGDMA e TRIM. Na tabela 7 temos as principais sínteses realizadas nesse trabalho:

Tabela 7: Sínteses realizadas para os monômeros ácido metacrílico e ácido acrílico utilizando diferentes agentes de reticulação.

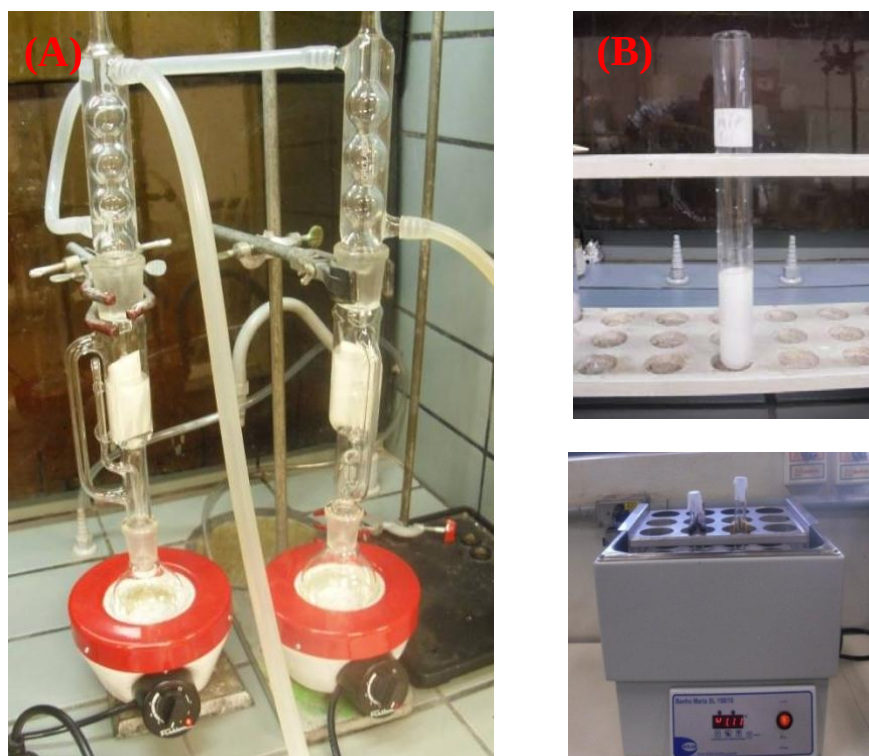
Nome	Monômero (5 mmol)	Agente de reticulação	Solvente (6 mL)	Iniciador
P1	MA	EGDMA	Clorofórmio	AIBN
P2		TRIM		
P3	MA	EGDMA	Tolueno	
P4		TRIM		
P5	MA	EGDMA	Metanol	
P6		TRIM		
P7	MA*	EGDMA	Acetonitrila*	
P8		TRIM*		
P9	AA	EGDMA	Clorofórmio	
P10		TRIM		
P11	AA	EGDMA	Tolueno	
P12		TRIM		

P13	AA	EGDMA	Metanol	
P14		TRIM		
P15	AA	EGDMA	Acetonitrila	
P16		TRIM		

*Valor otimizado

Por fim, os sólidos poliméricos resultantes foram moídos, peneirados e submetidos a varias lavagens com solvente no sistema sohxlet por um período de 96 horas (4 dias) com uma solução de metanol e ácido acético (9:1, v/v), afim que ocorra a extração do analito. É importante ressaltar que a extração do template deve ser completa para formação dos sítios de ligação. A Figura 26 apresenta o sistema sohxlet empregado na lavagem dos polímeros sintetizados.

Figura 26 - Sistema sohxlet usado para limpeza (a) e sistema de aquecimento empregado nas sínteses dos polímeros (b)



Após a etapa de lavagem deve-se notar que não há excesso de reagentes como monômeros funcionais no polímero. Espera-se que o número de sítios de

ligações não específicos sejam bem reduzidos, uma vez que os grupos funcionais que definem os sítios de reconhecimento estão teoricamente ligados ao template.

Vale recordar que a escolha dos monômeros foi baseada de acordo com as simulações computacionais realizadas. Sendo que nesse estudo foram escolhidos, um monômero com alta (ácido metacrílico) e outro com baixa energia de ligação monômero-analito (ácido acrílico).

3.6 Estudo da cinética de adsorção dos polímeros molecularmente impressos

Nesse estudo cerca de 30 mg de MIP e NIP foram previamente pesados e transferidos para frascos com tampa e adicionados em um volume de 5 mL de solução de diuron com concentração de 100 ppm, sendo as soluções preparadas nas proporções v/v (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 1:2, 1:3, e 1:4) de fosfato/acetonitrila. Os frascos foram lacrados e agitados durante um intervalo de tempo específico em um homogeneizador. Os intervalos de tempo foram: 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos.^{118,119} Ao término deste período, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e analisadas em CLAE-UV.

3.7 Isotermas de adsorção

Quantidades de 30 mg de MIP e NIP foram previamente pesados e transferidas para frascos com tampa e adicionadas em um volume de 5,0 mL de solução de diuron de concentrações entre 10 e 180 ppm, sendo as soluções preparadas nas proporções 1:2 (v/v) de 0,05 mol L⁻¹ de tampão fosfato/acetonitrila (pH 7,0) (Figura 27). Os frascos foram lacrados e agitados durante um intervalo de tempo de 180 minutos. Ao término deste período, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e analisadas no CLAE-UV. A quantidade de substrato que permaneceu livre em solução foi determinada em análise CLAE e a concentração adsorvida pelo MIP (concentração de substrato adsorvido/g de polímero) é determinada mediante a subtração da quantidade inicial de substrato na solução (Equação 5).¹²⁰

$$C_{\text{ppm adsorvido pelo polímero}} = C_{\text{ppm Total}} - C_{\text{ppm CLAE}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Figura 27 – Homogeneizador utilizado nos ensaios de religação de MIP/template

3.8 Teste de seletividade de MIPs

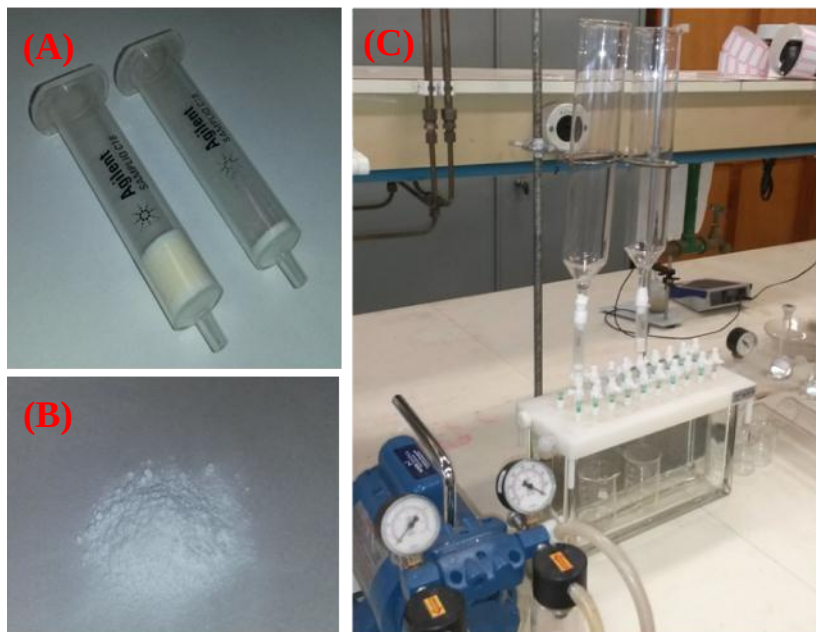
A seletividade do MIP foi avaliada quando misturados em 0,05 mol L⁻¹ tampão fosfato e acetonitrila (pH 7,0) em proporção (1:2, v/v) com outros agrotóxicos. As moléculas utilizadas nesse estudo foram o carbofurano e o 2,4-D e as concentrações usadas nesta análise foram de 25, 50, 75 e 100 ppm.¹²¹

Pesou-se 30 mg de MIP e NIP em frascos de 10 mL de capacidade e transferiu-se o volume preparado contendo as concentrações de cada analito e submeteu-se a agitação magnética por 180 minutos. Após essa etapa, passaram-se as soluções em filtros de 0,45 µm, separando MIP e NIP, e através do CLAE-UV determinou-se a concentração de cada analito.

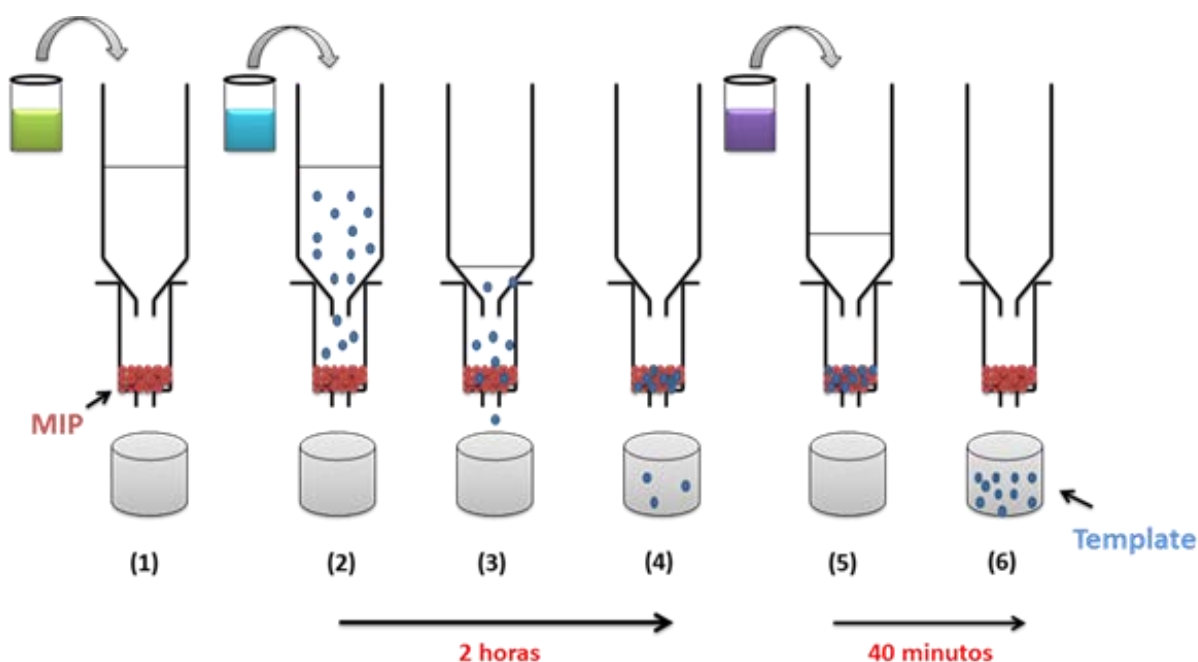
3.9 Análise em extração em fase sólida usando MIP (MISPE)

Os testes de pré-concentração do template (diuron) foram realizados utilizando-se uma quantidade de 200 mg de cada MIP e NIP, que foram empacotados em cartuchos de SPE de 6 mL de capacidade (Figura 28).

Figura 28 - Sistema de extração em fase sólida. (A) Cartuchos de MISPE; (B) MIP e (C) Sistema de pré-concentração automatizado com manifold e bomba a vácuo.



Inicialmente foi realizada a preparação da coluna (MISPE) através da passagem de 25 mL de água e 25 mL de acetonitrila/água deionizada (1). Os solventes eluídos foram armazenados para análise em CLAE. Um volume de 100 mL da solução contendo 10 ppm de diuron preparado em 0,05 mol L⁻¹ de tampão fosfato/acetonitrila (1:2, v/v) pH 7,0 foi percolada a uma vazão de 1 mL min⁻¹ em cada cartucho C18 contendo o polímero a fim de avaliar a capacidade de retenção do analito neste tipo de sistema (2-3). Após passar pelo MISPE, a solução de amostra foi coletada para análise para verificar quanto de analito não havia sido retido (4). Posteriormente foi passada, à mesma velocidade, 10 mL de acetonitrila para eluição do analito e posterior quantificação no CLAE (5-6). O uso de metanol ao invés de acetonitrila nessa última etapa não promoveu diferenças significativas na extração do template. Nessas análises foi acoplada uma bomba a vácuo para controlar o volume de amostra extraído do cartucho/minuto, conforme a Figura 29.

Figura 29 - Etapa de SPE usada neste trabalho

3.10 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS (CLAE)

Foi empregado um cromatógrafo Shimadzu modelo 20A, com detector UV/Visível SPD-20A, mostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A₅, acoplado a um microcomputador (Figura 30). A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C18 da marca Shimadzu Shim – Pack CLC – ODS. Todas as amostras antes de ser analisadas no CLAE foram submetidas à filtração com filtros de 0,45 µm conectados a uma seringa.

As condições cromatográficas usadas para cada analito encontram-se na Tabela 8:

Tabela 8: Condições cromatográficas de cada analito.^{112,122-123}

Analito	Fase móvel	Proporção de solvente (v/v)	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)
2,4-D	ACN/H ₂ O	75:25	225	3,8
Carbofurano	ACN/H ₂ O	50:50	254	4,3
Diuron	ACN/H ₂ O	75:25	225	4,8
Diclofenaco	ACN/H ₂ O/HF	63:34,5:0,5	225	5,2

Figura 30 - Cromatógrafo empregado neste trabalho (CLAE)

CAPÍTULO IV

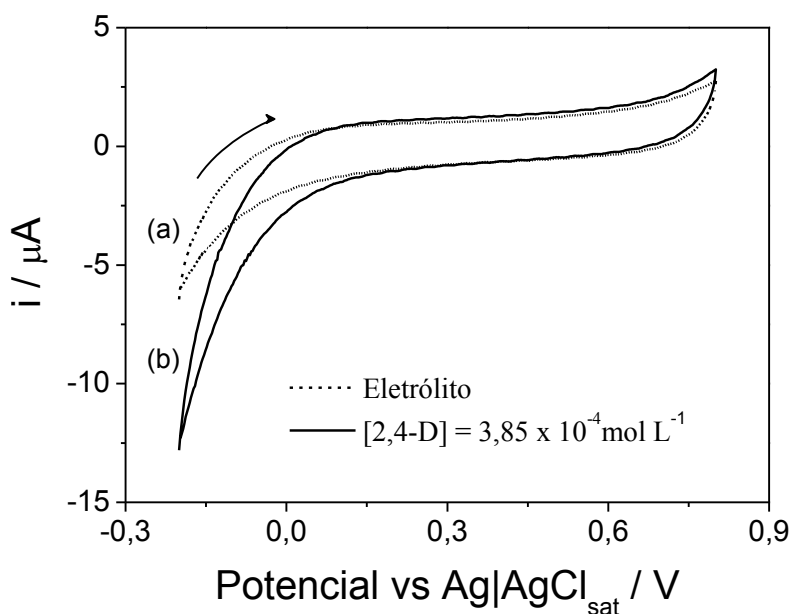
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES:

4.1 SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE 2,4-D

4.1.1 Caracterização eletroquímica de 2,4-D por voltametria cíclica em eletrodo de pasta de carbono modificado com cloro 21H,23H-ftalocianina 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil) ferro (III)

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados com o sensor biomimético em uma faixa de potencial de -0,2 a 0,8 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Na Figura 31a é mostrado o voltamograma cíclico correspondente ao eletrólito de suporte. Observa-se que há ausência de picos de oxidação (i_{pa}) e de redução (i_{pc}) que poderiam ser referentes ao complexo organometálico utilizado, entretanto estes não foram observados. A curva 31b apresenta o voltamograma cíclico do eletrólito na presença de 2,4-D na concentração de $3,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, promovendo uma acentuada variação da corrente catódica a partir de 50 mV vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), caracterizando a redução eletroquímica do 2,4-D na superfície do sensor.

Figura 31 - Voltamograma cíclico do sensor biomimético (A) do eletrólito e (B) presença de $3,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 2,4-D. Eletrólito: Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



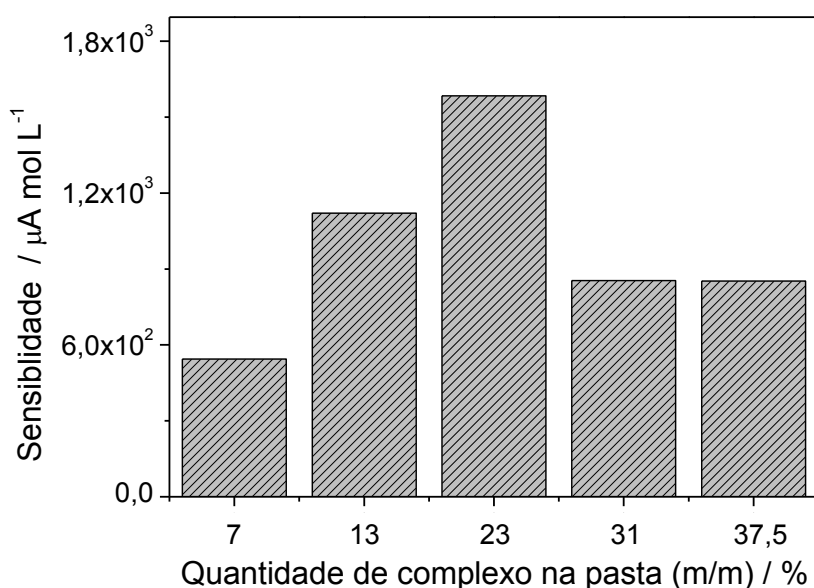
Adicionalmente, como não se observou nenhuma variação de corrente anódica, o sistema foi classificado como irreversível. Por outro lado, cabe ressaltar, que a

ausência de pico catódico impossibilita realizar análises quantitativas usando técnicas como voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Todavia a voltametria cíclica foi útil para verificar o comportamento eletroquímico do 2,4-D na presença do complexo *cloro-21H,23H-ftalocianina 5,10,15,20-Tetraquis(pentafluorofenil) ferro (III)*.

Após ter sido verificada a resposta eletroquímica do sensor para 2,4-D, procurou-se aperfeiçoar as condições de análise, visando obter o melhor rendimento nas análises eletroquímicas quantitativas. Estas informações foram obtidas usando a amperometria. Essa técnica foi escolhida como técnica eletroquímica para quantificação de 2,4-D, uma vez que ela não depende diretamente do pico redox (i_{p_a} ou i_{p_c}).

A otimização dos parâmetros analíticos usando amperometria foram respectivamente, potencial aplicado, pH, tipo de solução tampão, concentração de solução tampão e quantidade de complexo na preparação da pasta. A escolha do melhor parâmetro analítico foi realizada através do maior valor de sensibilidade obtido em curvas analíticas obtidas em amperometria. Na Figura 32 é mostrado um estudo da resposta do sensor em função de diferentes quantidades de complexo incorporadas na pasta de carbono, sendo a quantidade que apresentou melhor resposta foi a de 23% (m/m).

Figura 32 - Estudo da resposta eletroquímica em amperometria da quantidade de complexo incorporado no eletrodo de pasta de carbono. Condições: Solução fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), $E_{apl} = 100$ mV.



Todos os parâmetros analíticos otimizados com o sensor biomimético à base de pasta de carbono sem MWCNT obtidos pelo método amperométrico, encontram-se indicados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros otimizados* para a resposta do sensor biomimético sem MWCNT.

Parâmetros Avaliados						
Quantidade de complexo usado em 100 mg grafite	13	23*	31	37,5	---	---
pH	6,0*	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
Solução tampão	Acetato	Fosfato*	TRIZMA	Pipes	TRIS	BR
Fosfato / mol L ⁻¹	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1*	0,15
Potential vs Ag/AgCl / mV	-300	-200	-150	-100*	100	150

Adicionalmente, visando avaliar a influência de nanotubo de carbono na detectabilidade do sensor proposto, foram realizados neste trabalho, estudos do efeito do uso de nanotubos de carbono de parede múltipla não funcionalizado (A1 a A5) e funcionalizado (A6) na preparação do sensor biomimético. Conforme mostra a Figura 33, verifica-se que a pasta preparada com 9% de MWCNT não funcionalizado, não apresentou efeito na resposta do sensor. Com o aumento da percentagem de nanotubos na composição da pasta de carbono modificada, verifica-se um incremento na sensibilidade do sistema. Entretanto, ao funcionalizar os nanotubos de carbono, conforme mostrado no sensor A6 (preparado com 50% m/m, MWCNT funcionalizado/grafite) observa-se que ocorre um aumento bem significativo na sensibilidade do sensor, passando de $1,8 \times 10^3 \mu\text{A L mol}^{-1}$ com A1 para $1,8 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ para A6, representando um aumento em 10 vezes na resposta do sensor.

A Figura 34 mostra os perfis de resposta e a Figura 35 as respectivas curvas analíticas, obtidos com os sensores biomiméticos A1 (A) e A6 (B), mostrando o aumento da sensibilidade, que foi favorecida pela presença dos nanotubo de carbono funcionalizados na pasta de carbono modificada.

Figura 33 - Estudo de resposta analítica para o sensor biomimético utilizando várias proporções grafite/nanotubo não-funcionalizado (m/m) (A1-A5), e nanotubo funcionalizado (A6).

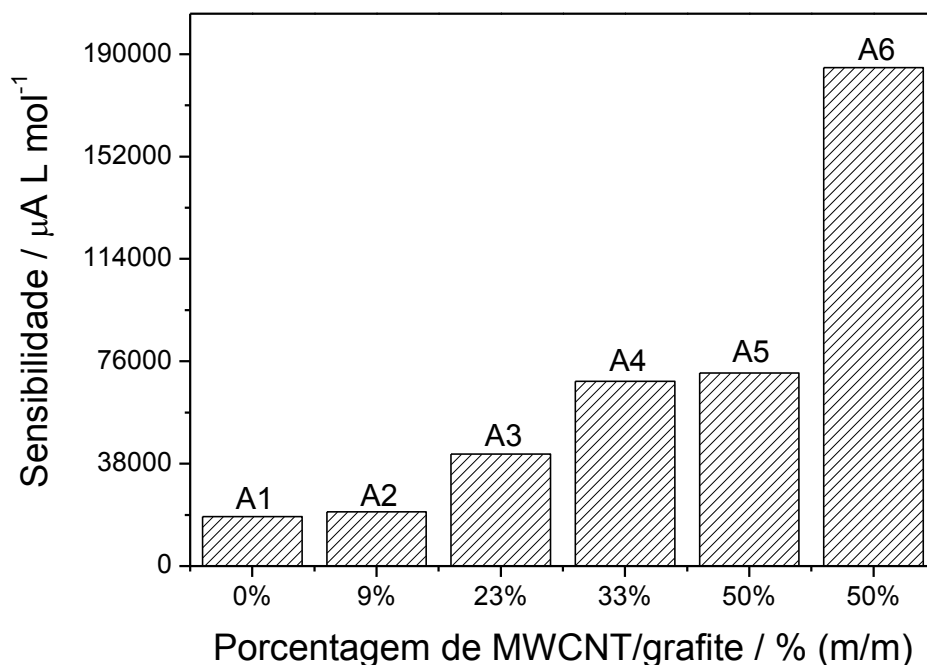


Figura 34 - Perfil amperométrico do sensor à base de EPC modificado com complexo cloro-21H,23-ftalocianina-5,10,15,20-tetraquis (pentafluorofenil) ferro (III) na ausência (A) e presença de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato pH 6,0 e $E_{\text{apl}} = -100\text{mV}$.

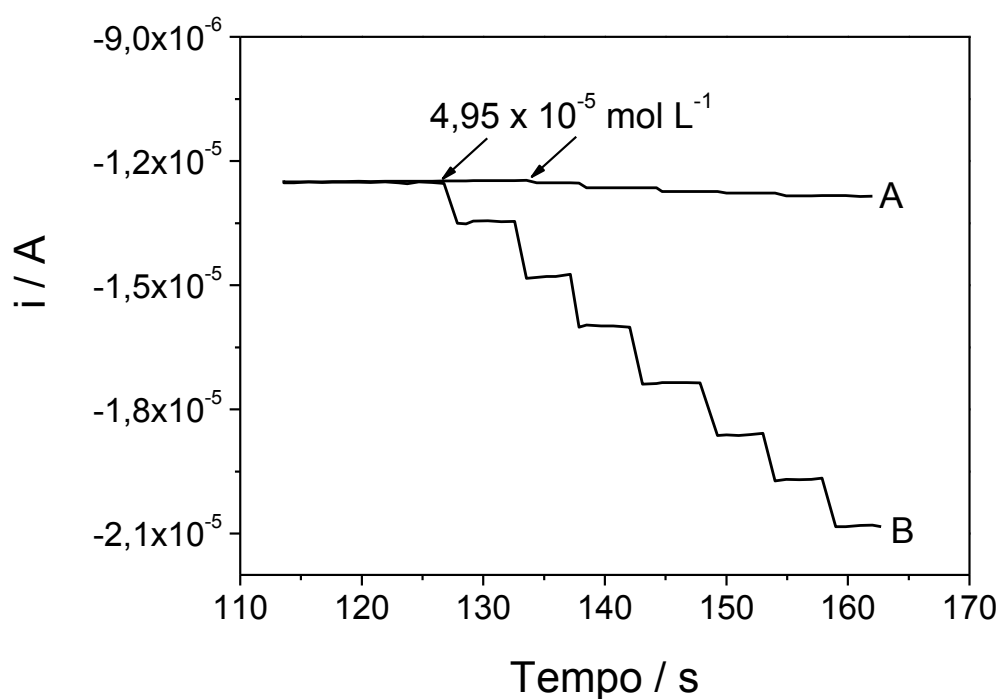
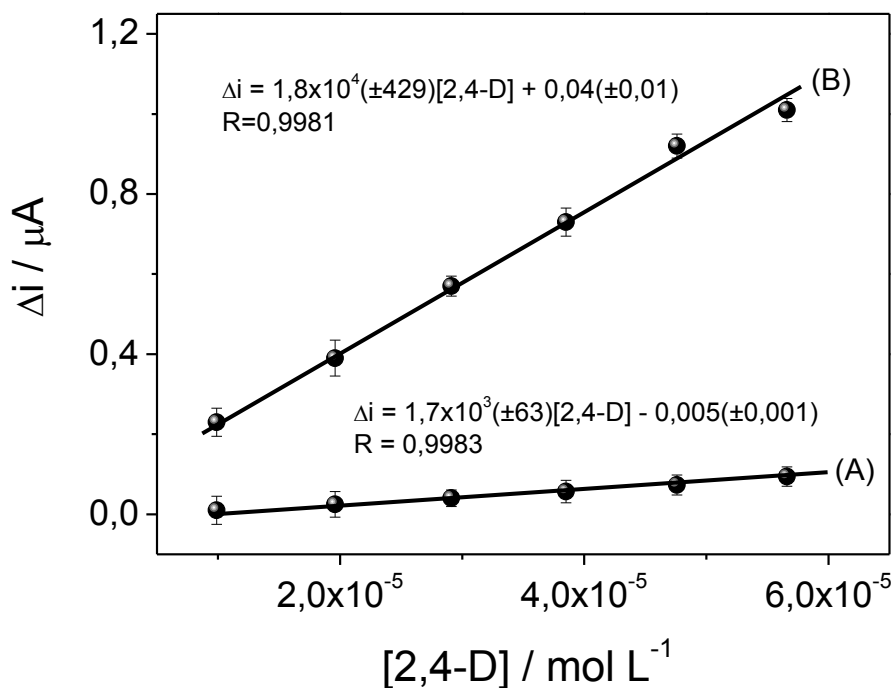
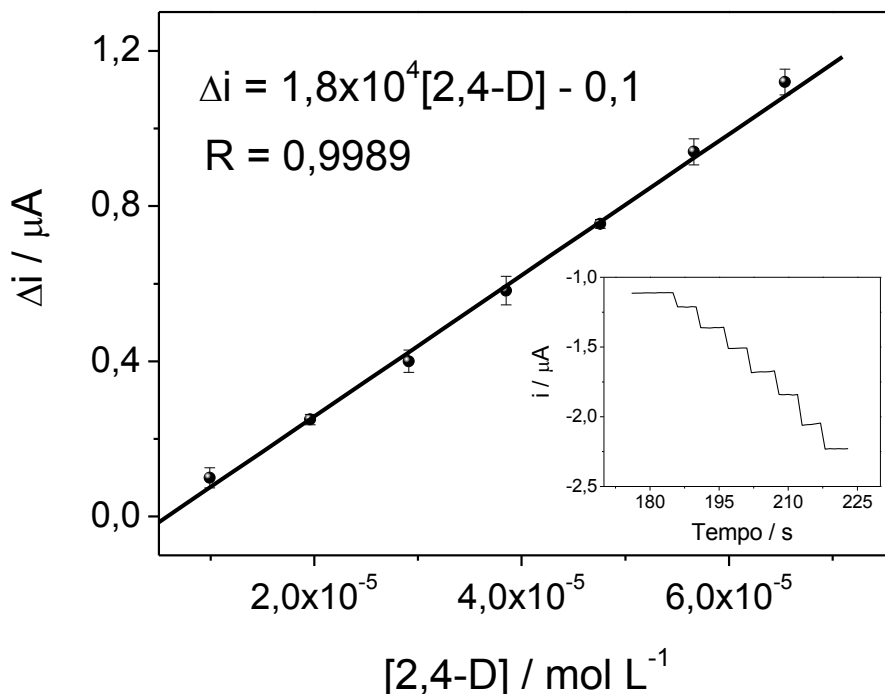


Figura 35 - Perfil das curvas analíticas para detecção do herbicida 2,4-D obtidas com os dados apresentados na Figura 45. (A) Na ausência e (B) na presença de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com grupos carboxílicos.



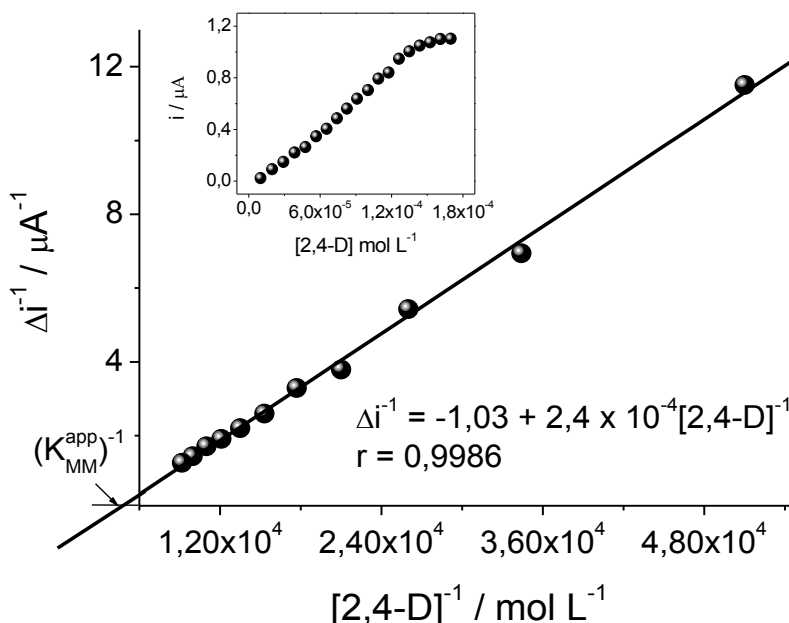
Assim, este sensor nas condições otimizadas apresentou uma composição de complexo e nanotubos funcionalizados respectivamente de 23% e 50% (m/m) na pasta de carbono. A Figura 36 mostra a curva analítica obtida sob as condições otimizadas de preparação e análise. Nestas condições o sensor mostrou uma faixa linear de resposta entre $9,9 \times 10^{-6}$ e $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, uma sensibilidade de $1,8 \times 10^4 (\pm 429)$ μA mol L⁻¹ e limites de detecção e quantificação de $2,1 \times 10^{-6}$ e $6,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.¹²⁴ A repetibilidade nas medidas e construção de sensores, em termos de RSD (desvio padrão relativo) foi de 5,6% e 7,3%, respectivamente.

Figura 36 - Curva analítica obtida usando o sensor proposto modificado com 23% complexo e 50% de MWCNT, sob condições otimizadas e seu respectivo amperograma.



4.1.2 Avaliação das características biomiméticas do sensor

O caráter biomimético do sensor proposto foi avaliado considerando que este sensor deveria apresentar características similares à de um biossensor enzimático, uma vez que o complexo usado apresenta uma estrutura química análoga à do sítio ativo da P450. Assim, isto foi avaliado através do perfil de resposta obtido com a amperometria. Comparando-se com um sistema enzimático, onde o mecanismo é catalisado pelo composto biológico, inicialmente o sinal de corrente aumenta linearmente com a concentração do substrato (2,4-D), até um dado valor, onde a partir dessa concentração o sinal de corrente alcança um valor máximo, obtendo-se assim um perfil hiperbólico, que sugere que o complexo utilizado no sensor proposto segue uma cinética *pseudo*-Michaelis-Menten (Figura 37, gráfico inserido).^{125,126}

Figura 37 - Gráfico do duplo recíproco obtido com o sensor biomimético.

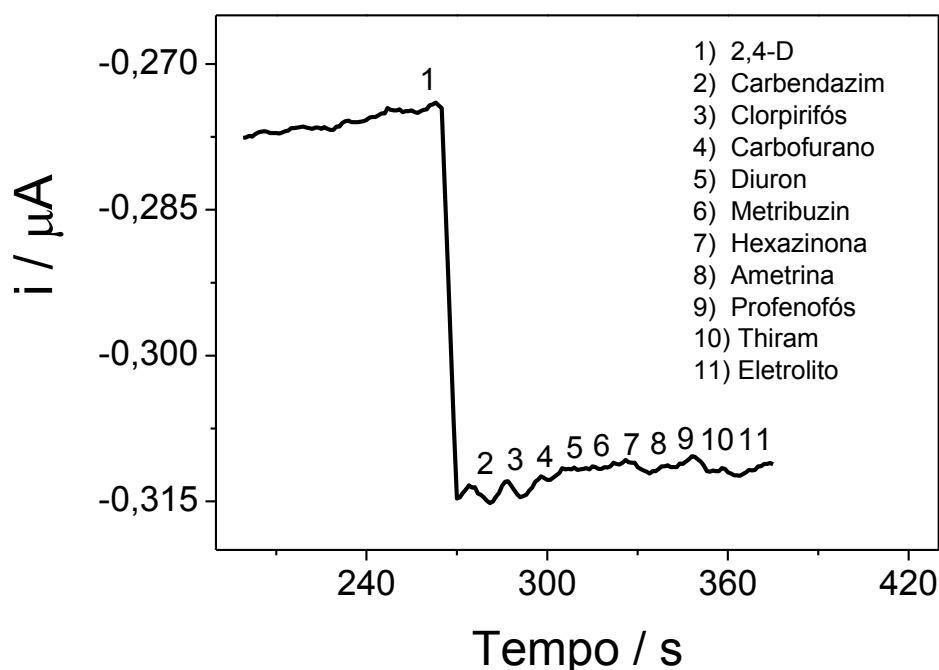
Esse gráfico foi linearizado obtendo-se o gráfico de *Lineweaver-Burk* ou gráfico do duplo recíproco (Figura 37) do qual se pode determinar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}). O valor encontrado foi de $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, cujo valor indica um bom grau de afinidade entre o complexo *cloro-21H,23H-ftalocianina 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil) ferro (III)* e o analito, 2,4-D. O valor de K_{MM}^{app} obtido encontra-se dentro dos intervalos de K_{MM}^{app} obtidos para a enzima P450 (CYP 2C9), que foi entre 10^{-4} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.^{127,128} Na literatura foi encontrado que a CYP 2C9 é responsável pela metabolização de agrotóxicos, não sendo reportados ainda estudos que apresentem valores de K_{MM}^{app} entre a CYP 2C9 com 2,4-D.

4.1.3 Seletividade

A seletividade do sensor biomimético foi confirmada a partir da avaliação da resposta do sensor através da amperometria em potencial -100 mV vs. Ag/AgCl. Os agrotóxicos analisados nesse estudo foram: clorpirifós, metribuzin, carbendazim, carbofurano, diuron, hexazinona, profenofós, ametrina, thiram e 2,4-D. Os resultados obtidos na Figura 38 mostram que somente o 2,4-D apresentou sinal analítico nas

condições otimizadas. Isso demonstra o caráter altamente seletivo do sensor, o que era esperar para um sensor biomimético. A concentração utilizada nesta análise com cada agrotóxico foi de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 38 - Estudo de seletividade com diversos agrotóxicos em amperometria. Medidas realizadas em tampão fosfato em pH 6,0 e acetonitrila (4:1 v/v), $E_{\text{apl}} = -100 \text{ mV vs Ag/AgCl}$.



4.1.4 Análise de amostras ambientais

O sensor proposto foi avaliado em amostras de solo enriquecidas com 2,4-D, conforme o processo de amostragem e enriquecimento abordados na parte experimental. Os resultados das análises foram obtidos empregando a amperometria (Tabela 10) que mostraram uma recuperação de 2,4-D próximo a 100%, que evidencia ausência de efeito de matriz nesse tipo de amostra. Pode-se notar que os resultados apresentaram boa repetibilidade (experimentos realizados em triplicatas), com RSD abaixo de 4%. Verificou-se que dentre as análises realizadas, um simples polimento do eletrodo de pasta de carbono era suficiente para a renovação da superfície.

Tabela 10 - Valores de recuperação encontrados com o sensor biomimético modificado com MWCNT em amostras de solo após enriquecimento com 2,4-D.

Amostras de solo/profundidade (cm)	[2,4-D] / mol L ⁻¹		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado (%RSD)	
0-10	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,70 \times 10^{-5}$ (3,1)	94
10-20	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,75 \times 10^{-5}$ (3,7)	95
20-40	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^{-5}$ (1,4)	98

n = 3

4.1.5 Estudo de repetibilidade do sensor biomimético

Na Tabela 11, pode ser observada, a repetibilidade do sensor biomimético através do estudo de repetibilidade interdias e intradias. Os valores obtidos em RSD mostraram menores variações na sensibilidade em estudos intradia em relação à interdias. O tempo de vida do eletrodo foi avaliado por um período de 10 dias em uso contínuo, sendo feita média das sensibilidades de 3 curvas analíticas obtidas a cada dia. O valor de RSD encontrado foi de 5,5% indicando a alta confiabilidade do sensor na análise de 2,4-D. Adicionalmente foi realizado estudo operacional apresentando aproximadamente 8 determinações por cada porção de modificador adicionado no EPC. Lembrando que em EPC pode-se renovar a superfície do eletrodo através de um simples polimento em papel (sulfite).

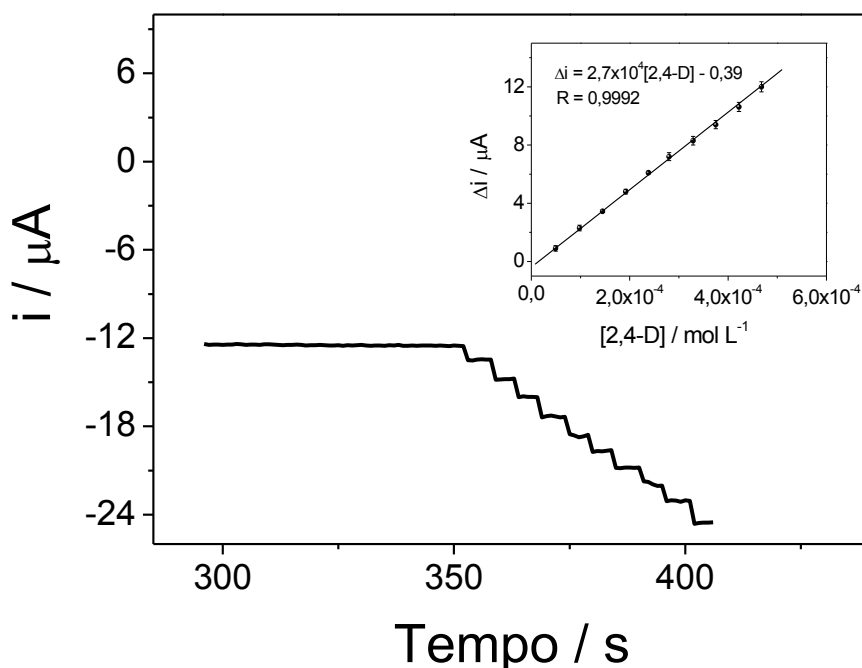
Tabela 11: Estudo de repetibilidade do sensor biomimético

Parâmetro (unidade)	Resposta
Reprodutibilidade intradia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas).	3,5%
Reprodutibilidade interdias (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas).	4,1%
Tempo de vida (uso contínuo) (RSD%)	10 dias (5,5)

4.1.6 Estudo eletroquímico de sensor biomimético em eletrodo de disco rotatório para detecção do ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)

Baseando-se nos resultados obtidos com o 2,4-D em sistema batelada foram realizadas análises adicionais em eletrodo de disco rotatório de dimensão 3 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. As análises foram conduzidas em amperometria nas mesmas condições de análise do sensor biomimético em batelada (potencial -100 mV vs Ag/AgCl, solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 6). Pode-se notar na Figura 39 que a utilização do sistema hidrodinâmico possibilitou melhora na resposta do sensor, aumentando a sensibilidade do sensor biomimético, quando comparado com o sistema em batelada, onde a sensibilidade é menor.

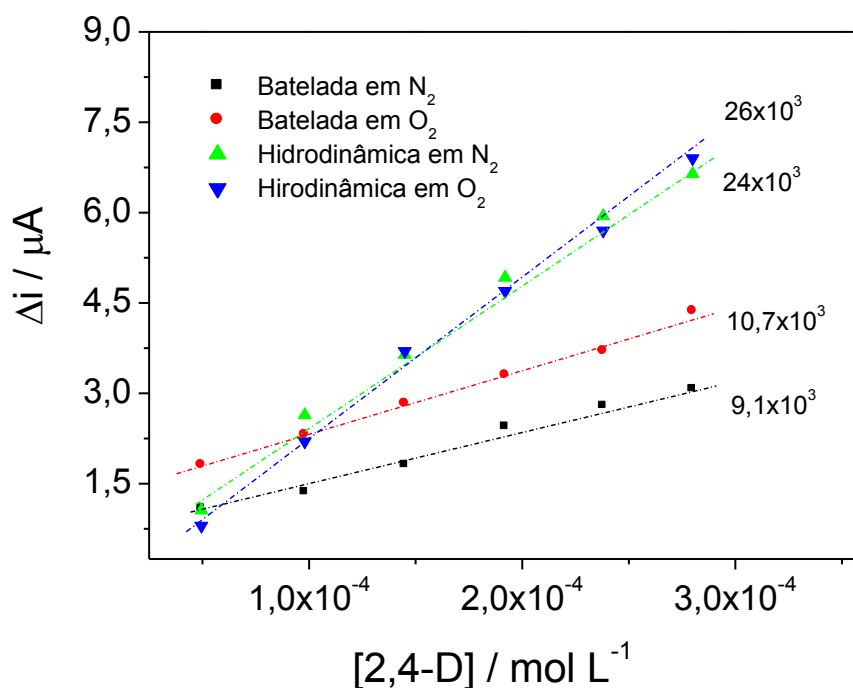
Figura 39 - Perfil de resposta do amperograma e sua curva analítica em eletrodo de disco rotatório (RDE) obtidas a partir de adições sucessivas de [2,4-D] = $4,95 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹



Também foi possível observar que em meio de nitrogênio a resposta eletroquímica praticamente ficou constante, quando analisado os valores de sensibilidades das curvas analíticas que foram obtidas a partir de amperogramas. Na Figura 40 temos os valores de sensibilidade em meio de oxigênio foi $1,1 \times 10^4$ e de nitrogênio foi de $9,1 \times 10^3 \mu\text{A L mol}^{-1}$. Comparando-se as sensibilidades podemos dizer que o oxigênio que se encontra dissolvido no eletrólito não apresenta efeito tão

significativo na resposta eletroquímica do 2,4-D. É observado o aumento da sensibilidade devido ao efeito do sistema hidrodinâmico. Isso ocorre devido à contribuição do transporte de massa que ocorre por difusão e convecção, sendo que essa última apresenta um maior efeito de transporte. Nesse caso, o analito que se encontra em solução atingirá a superfície do eletrodo mais efetivamente que no sistema estático na qual o transporte de massa é realizado por difusão. No estudo de velocidade de rotação do eletrodo de trabalho foram avaliados 100, 125, 150, 200 rpm, sendo 100 rpm o melhor intervalo encontrado na qual se conseguia amperogramas mais estáveis e reprodutíveis.

Figura 40 - Perfil da curva analítica em sistemas batelada e hidrodinâmico na ausência e presença de O_2 e suas respectivas sensibilidades ($\mu A L mol^{-1}$).

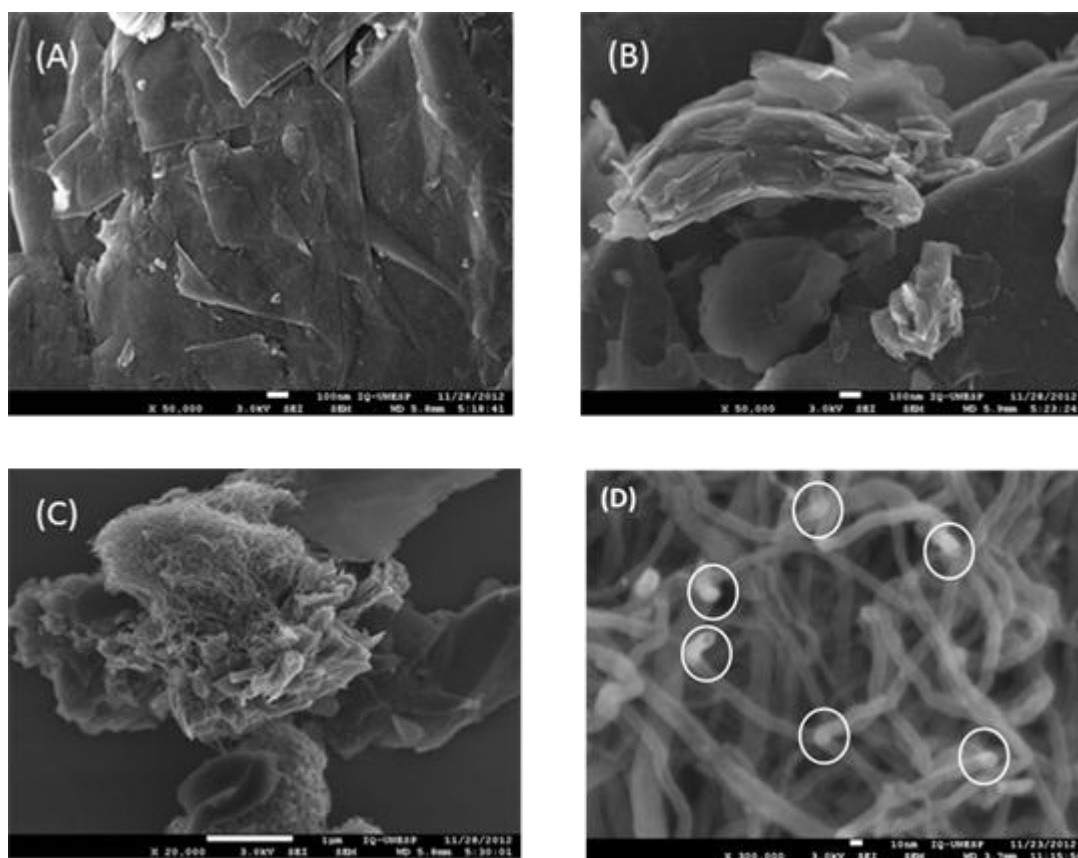


Deve-se enfatizar que o eletrodo utilizado nessa etapa é diferente do eletrodo usado na etapa inicial, sendo a profundidade da cavidade onde se adicionou a pasta é 3 vezes maior que o eletrodo utilizado anteriormente. Assim foram realizados para fins de comparação, análise com o eletrodo em modo estático e em rotação de 100 rpm que foi a condição otimizada.

Na figura 41 são mostradas imagens de FEG-SEM dos modificadores usados na construção do sensor biomimético. Em (A) temos a imagem do grafite, (B)

grafite, complexo e (C) e (D) grafite, complexo e MWCNT-COOH. Visualiza-se em (D) que as extremidades dos nanotubos encontram-se mais arredondadas, fato que evidencia a presença de grupos carboxílicos que foram inseridos durante a funcionalização. O diâmetro dos MWCNT foi medido, sendo obtido para os MWCNT não funcionalizados aproximadamente 24,7 nm e para os MWCNT-COOH aproximadamente 16 nm. A funcionalização propiciou inserir grupos carboxilas que auxiliaram na condutividade elétrica e também propiciou obter nanotubos mais uniformes, livre de impurezas e com tamanhos menores tanto em comprimento e diâmetro.

Figura 41 - Imagens obtidas em Microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM): (A) Grafite, (B) Amostra contendo grafite e complexo (cloro 5,10,15,20-Tetraquis(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina de ferro (III)), (B) grafite+complexo+MWCNT-COOH, (C) e (D) MWCNT-COOH.

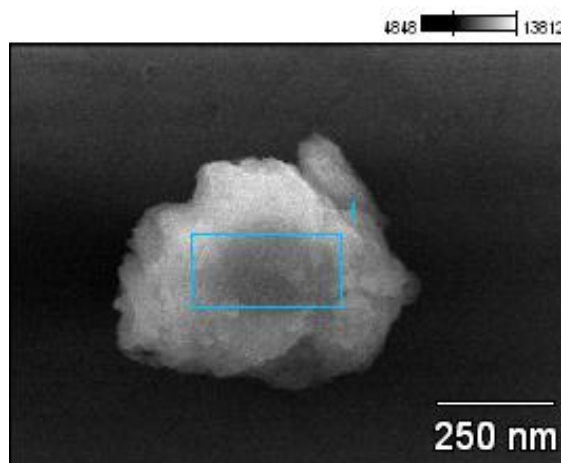


Na Figura 42 é apresentada uma imagem obtida no FEG-SEM de uma amostra contendo o complexo cloro 5,10,15,20-Tetraquis (pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-

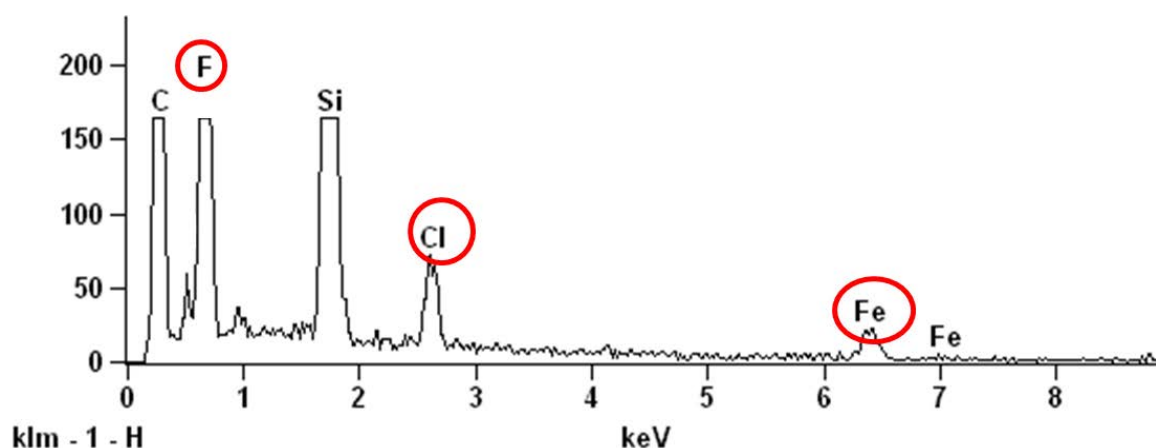
porfirina ferro (III). Dessa imagem, uma região foi selecionada para análise química através da espectroscopia dispersiva de raios-X (EDX) a fim de verificar a presença do complexo. Analisando o EDX pode-se verificar a presença dos átomos de flúor (F), cloro (Cl) e ferro (Fe) que constituem a estrutura química do complexo. Devemos enfatizar que na pasta de carbono não ocorre a interação química entre o complexo e o nanotubo, pois se encontram em forma de partícula sólida na pasta de carbono.

Figura 42 - Imagem em MEV do complexo cloro 5,10,15,20-Tetraquis (pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina de ferro (III) (A) e seu EDX (B). Condições do MEV: Aceleração de voltage: 7.0 kV, magnificação: 10^5 .

(A)



(B)

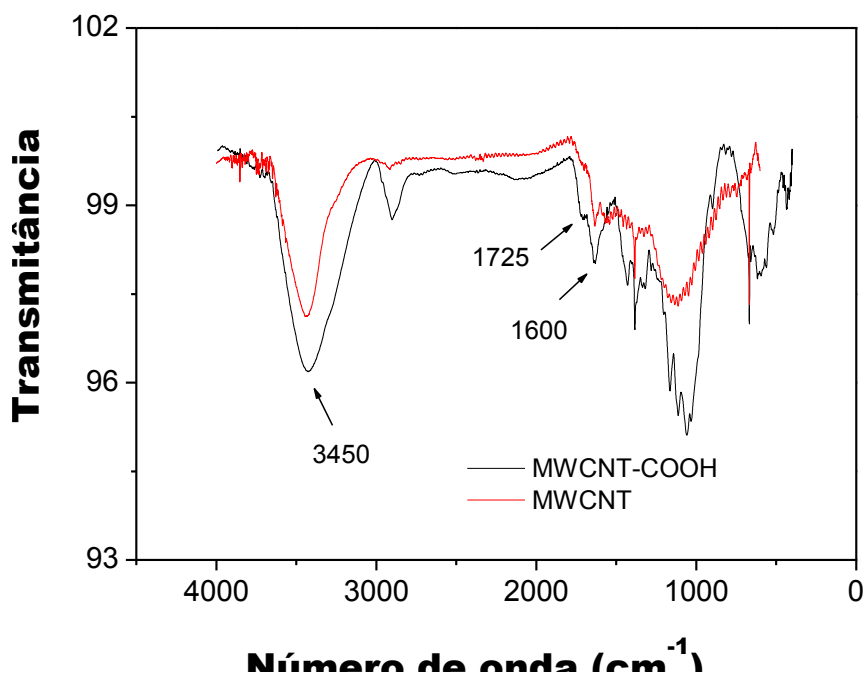


O tratamento químico foi realizado em meio oxidante através de uma solução sulfonitrila ($3\text{H}_2\text{SO}_4:1\text{HNO}_3$) que funcionaliza a superfície do carbono com o

ancoramento de grupos funcionais como hidroxila (-OH), carboxila (-COOH) e carbonila (-C=O).¹²⁹

Os grupos carboxila do MWCNT foram também caracterizados em espectroscopia de infravermelho (FTIR). Na Figura 43, o espectro de infravermelho (IV) dos nanotubos tem uma intensa bandas de absorção cobrindo a região entre 4000 - 400 cm^{-1} .¹³⁰ O pico de 3450 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo -OH pertencente ao grupo carboxila presente na amostra de MWCNT-COOH. O pico de grande magnitude visualizada em 1600 e 1725 cm^{-1} corresponde respectivamente à banda de estiramento C-OH e -C=O dos ácidos carboxílicos presente nas extremidades do nanotubos de carbono.

Figura 43 - Análise de MWCNT e MWCNT-COOH em FTIR

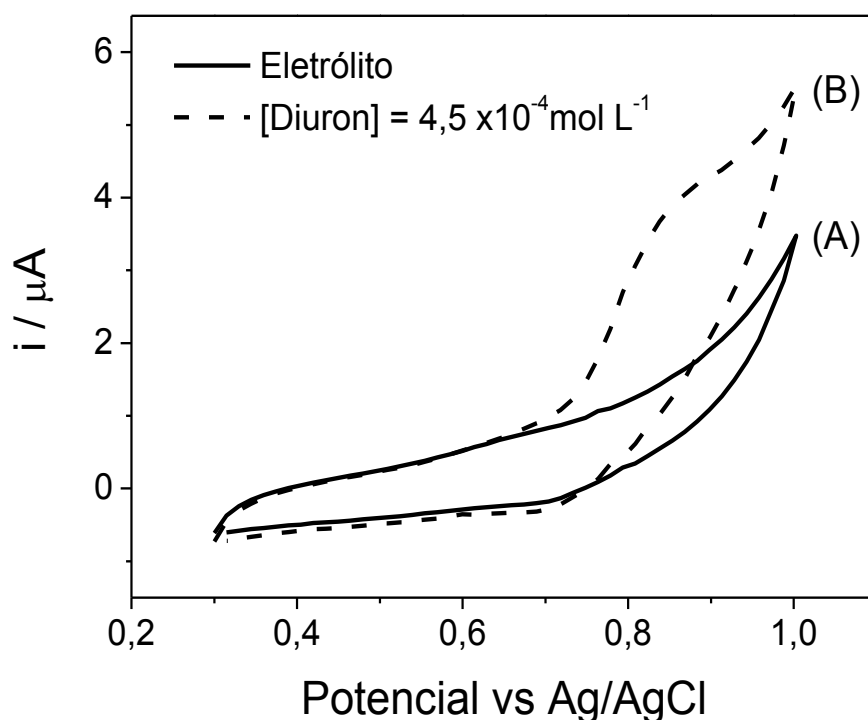


4.2 SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE DIURON

4.2.1 Caracterização e otimização eletroquímica do diuron em eletrodo de pasta de carbono modificada com 29H,31H-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II)

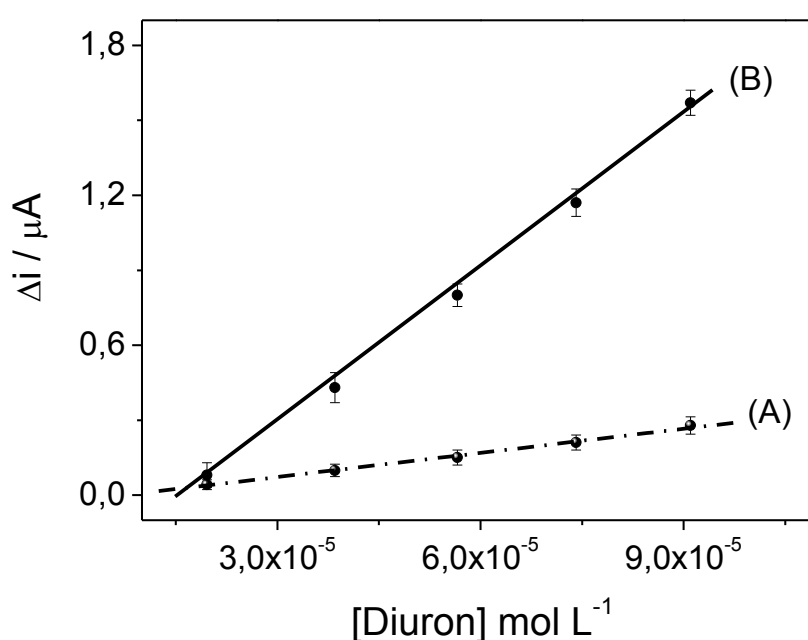
A caracterização eletroquímica do sensor biomimético foi realizada usando voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -0,25 a 1 V. A Figura 44 apresenta um voltamograma cíclico do eletrólito (A), e em (B) o eletrólito na presença de diuron na concentração de $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Pode-se notar que nesse intervalo de potencial estudado, o diuron apresenta uma corrente de pico anódica (i_{pa}) caracterizando uma oxidação eletroquímica em potencial de 750 mV vs. Ag/AgCl (KCl_{sat}). O perfil do voltamograma cíclico sugere que o sistema seja irreversível, caracterizando um sistema eletrocatalítico.^{131,132}

Figura 44 - Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com 29H,31H-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II) (NiOPc). Na ausência e presença de diuron. Eletrólito: Fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0), $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.



Após verificar o aumento irreversível da corrente de oxidação de diuron no sensor proposto, a seguir, iniciaram-se as medidas amperométricas em potencial de 750 mV vs. Ag/AgCl, afim de verificar a influência do complexo na preparação da pasta de carbono. As respectivas curvas analíticas que foram obtidas estão representadas na Figura 45.

Figura 45 - Resposta analítica (Δi vs [Diuron]) para eletrodo de pasta de carbono não modificada (A) e modificada (B). Medidas realizadas na amperometria em tampão fosfato pH 8,0, potencial aplicado de 750mV.



É observado que o eletrodo modificado provoca um aumento de 6,35 vezes na sensibilidade do sensor proposto. Assim, para obter o melhor valor para a relação (m/m) complexo/pasta de carbono, este parâmetro foi otimizado. Os outros parâmetros otimizados pode ser encontrado na Tabela 12.

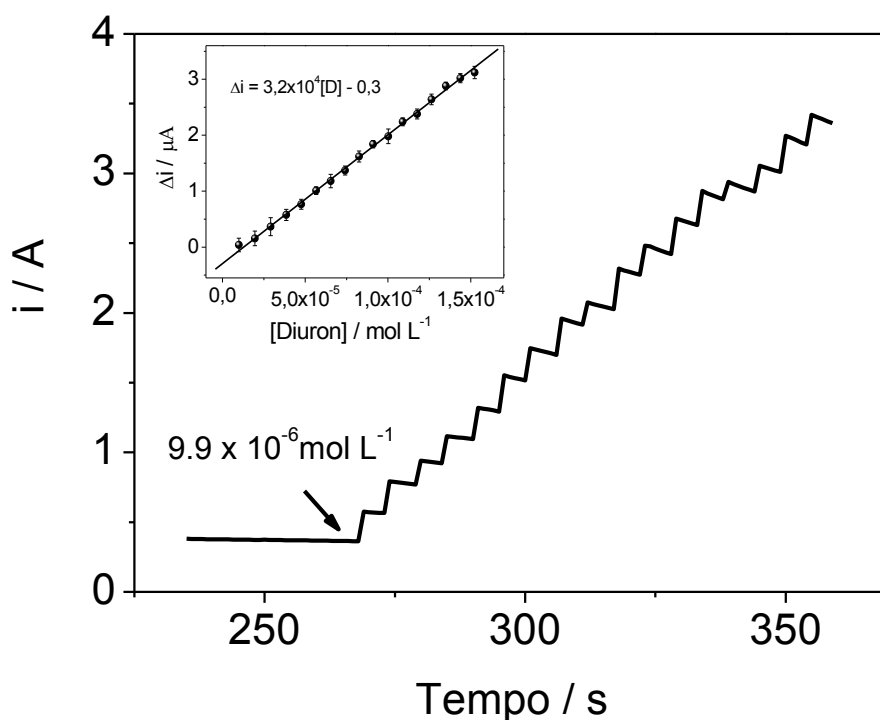
Tabela 12 - Parâmetros otimizados e características do sensor biomimético para diuron.

Parâmetros Avaliados						
Quantidade de complexo / % (m/m)	13	23	31*	37,5	---	---
pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0*	8,5

Tampão	Acetato	Fosfato*	TRIZMA	Pipes	TRIS	BR
Fosfato / mol L ⁻¹	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1*	0,15
Potential vs Ag/AgCl / mV	600	650	700	750*	800	850

O sensor proposto apresentou nas condições otimizadas uma resposta linear para diuron entre $9,9 \times 10^{-6}$ e $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 46), uma sensibilidade de $2,3 \times 10^4 (\pm 3 \times 10^2)$ $\mu\text{A mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $3,1 \times 10^{-6}$ e $9,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.¹²⁴

Figura 46 - Curva analítica obtida para diuron em condições otimizadas (inserido) e amperograma típico obtido com o sensor biomimético. Medidas realizadas em fosfato 0,1 mol de L⁻¹ (pH 8,0).



4.2.2 Proposta de Mecanismo de resposta do sensor proposto

O mecanismo proposto da reação eletroquímica do diuron com o complexo *NiOPc* iniciar-se-ia pela oxidação do complexo de níquel (etapa 1). A seguir, na

presença de diuron ocorre a reação redox entre o diuron e o complexo níquel (III) reduzindo-se para níquel (II) e simultaneamente oxidando o diuron (etapa 2), caracterizando um sistema eletroquímico do tipo EC (Figura 47). Assim, a corrente observada corresponderia à regeneração do complexo níquel (II) para complexo níquel (III) que foi oxidado na presença de diuron.

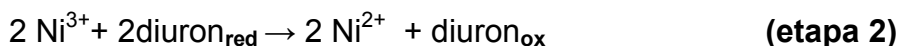
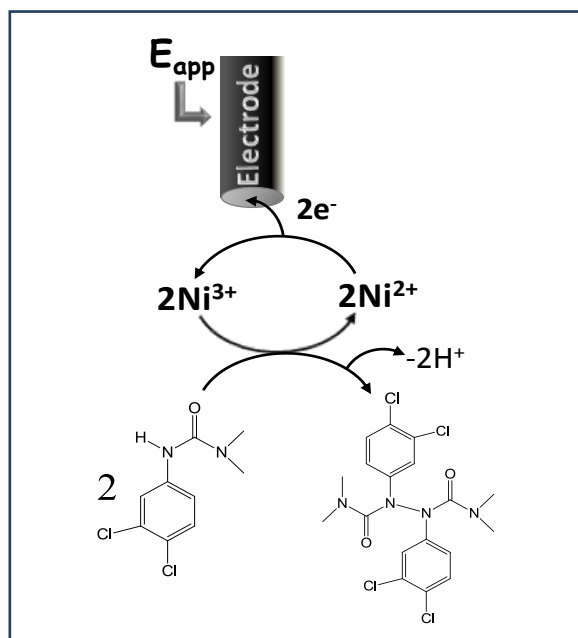


Figura 47 - Proposta de mecanismo de reação do diuron e o modificador biomimético.¹³²

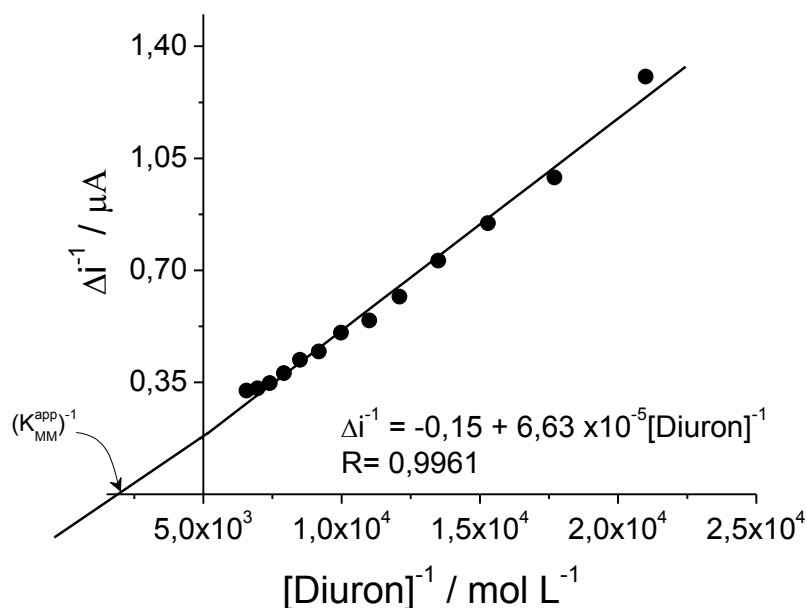


4.2.3 Verificação do caráter biomimético do sensor

O sensor biomimético proposto foi avaliado em concentrações acima da região de resposta linear, obtendo-se um perfil hiperbólico, que é característico de biossensores enzimáticos e sensores biomiméticos.^{125,126} Para estimar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}), construiu-se o gráfico de duplo-recíproco (Figura 48), cujo valor foi $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Esse valor encontra-se de acordo com o esperado para biossensores e sensores biomiméticos (10^{-6} a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).^{127,128} Esse

valor K_{MM}^{app} indica a forte afinidade do analito com a fase sensora, representado pelo complexo $NiOPc$.

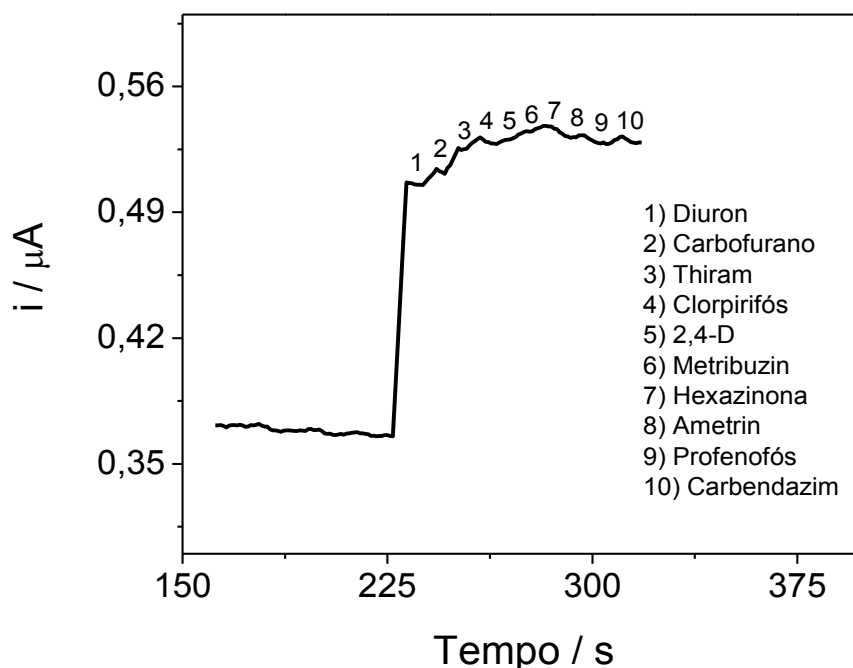
Figura 48 - Gráfico do Duplo recíproco obtido a partir do sensor à base de $NiOPc$.



A seletividade do sensor proposto foi avaliada a partir da resposta do sensor na presença de 10 agrotóxicos (2,4-D, carbofurano, thiram, clorpirifós, diuron, metribuzin, hexazinona, ametrina, profenofós e carbendazim) em amperometria. A avaliação da resposta eletroquímica procedeu-se através de adições sucessivas dos analitos e eletrolito de 1-10 dos quais apenas o diuron apresentou resposta eletroquímica mensurável em potencial de 750 mV vs Ag/AgCl (Figura 49).

Verificou-se também em soluções contendo esses agrotóxicos que foi possível construir a curva analítica e quando comparado com a resposta com a curva analítica na ausência desses possíveis interferentes, a queda na resposta eletroquímica foi aproximadamente de 4%. Isso demonstra que o sensor é altamente promissor, robusto e estável em medidas eletroquímicas.

Figura 49 - Estudo de seletividade com diversos agrotóxicos em amperometria. Medidas realizadas em tampão fosfato em pH 6,0 e acetonitrila (4:1 v/v), potencial aplicado de 750 mV vs. Ag/AgCl. [Agrotóxicos] = $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



4.2.4 Análise em amostras ambientais

Os resultados encontrados na recuperação de diuron em amostras de águas de rios e em solo a diferentes profundidades, podem ser vistos na Tabela 13. Os testes de recuperação foram realizados em triplicada e os resultados obtidos foram aproximadamente próximos a concentração adicionada, evidenciando que nesses meios analisados praticamente não ocorreu efeito de matriz. A aplicação com sucesso do sensor proposto permite estender a aplicabilidade sensível e seletiva do dispositivo para outros tipos de amostras. Deve-se enfatizar que o RSD obtido nas medidas eletroquímica foi relativamente baixo, demonstrando a repetibilidade e principalmente a confiabilidade do sensor eletroquímico desenvolvido.

Tabela 13 - Dados obtidos na recuperação de diuron em amostras águas de rios com o sensor biomimético.

Amostras	[Diuron] / mol L ⁻¹		Recuperação / %
	Adicionado	Encontrado (RSD%)	
Jacaré-Guaçu	5,0 x 10 ⁻⁵	4,7 x 10 ⁻⁵ (3,6)	94
Jacaré-Pepira	5,0 x 10 ⁻⁵	5,2 x 10 ⁻⁵ (2,9)	104
Chibarro	5,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁵ (2,6)	101
Solo (0-10cm)	5,0 x 10 ⁻⁵	4,8 x 10 ⁻⁵ (2,5)	95
Solo (10-20cm)	5,0 x 10 ⁻⁵	5,3 x 10 ⁻⁵ (3,1)	105
Solo (20-40 cm)	5,0 x 10 ⁻⁵	5,3 x 10 ⁻⁵ (4,1)	106

n = 3

4.2.5 Aplicação de sensor biomimético para detecção de diuron em amostra de alimento (tomate)

As amostras de tomate fortificadas foram analisadas com o sensor biomimético utilizando a amperometria em potencial de 750 mV vs. Ag/AgCl. Na avaliação dos amperogramas obtidos, visualizou-se que o sinal eletroquímico do padrão e da amostra de tomate fortificada com diuron na concentração 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, apresentou uma taxa de recuperação próxima a 100%, evidenciando que no meio analisado não houve efeito de matriz. Quando comparado os resultados obtidos do sensor biomimético com o CLAE-UV, os resultados foram similares, comprovando que esse sensor pode ser utilizado na determinação de diuron nesse tipo de matriz (Tabela 14).

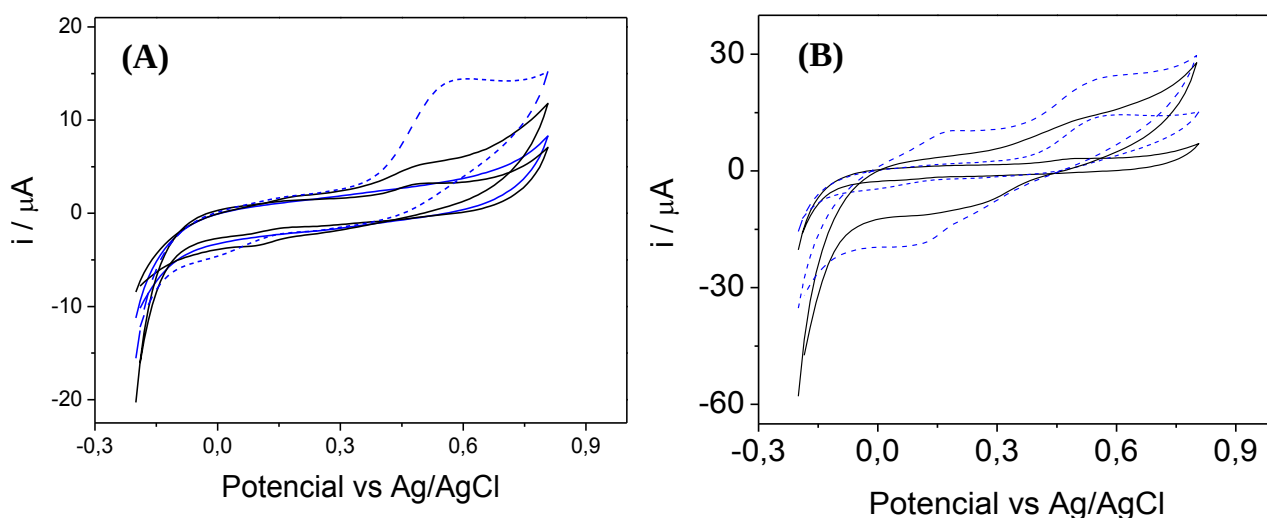
Tabela 14 - Resultados obtidos com o sensor biomimético em amostras de tomate fortificadas.

Amostras de Tomate	[Diuron] adicionado / mol L ⁻¹	[Diuron] encontrado / mol L ⁻¹	CLAE / mol L ⁻¹
nº 1	5,0x10 ⁻⁵	4,94x10 ⁻⁵ (±4,5)	5,0x10 ⁻⁵ (±0,5)
nº 2	5,0x10 ⁻⁵	5,12x10 ⁻⁵ (±3,3)	5,1x10 ⁻⁵ (±0,8)
nº 3	5,0x10 ⁻⁵	4,71x10 ⁻⁵ (±2,0)	4,82x10 ⁻⁵ (±0,3)

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE CARBOFURANO

Os estudos eletroquímicos para o desenvolvimento de um sensor biomimético para detecção de carbofurano foram realizados com o complexo hemina e óxido de grafeno. Na Figura 50A é apresentado um voltamograma cíclico para o sensor não modificado e modificado com hemina em um intervalo de potencial entre -0,2 a 0,8 V. Constatou-se que a resposta eletroquímica do eletrodo não modificado não apresentou corrente de pico (i_{pa}), e sim uma variação da corrente de oxidação. Mas quando avaliado o voltamograma cíclico do sensor biomimético, uma corrente de pico em potencial de 550 mV foi visualizada. Essa resposta eletroquímica deve-se a reação acoplada de hemina e carbofurano o qual promoveu a oxidação eletroquímica do carbofurano na superfície do eletrodo. A ausência da corrente catódica na faixa de potencial estudada mostra que esse sistema é do tipo irreversível.

Figura 50 - Voltamograma cíclico do sensor não modificado e modificado com hemina (A), modificado com hemina e hemina e óxido de grafeno (B). Condições de análise: [carbofurano] = 1×10^{-4} mol L⁻¹, Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), $v = 50$ mVs⁻¹.

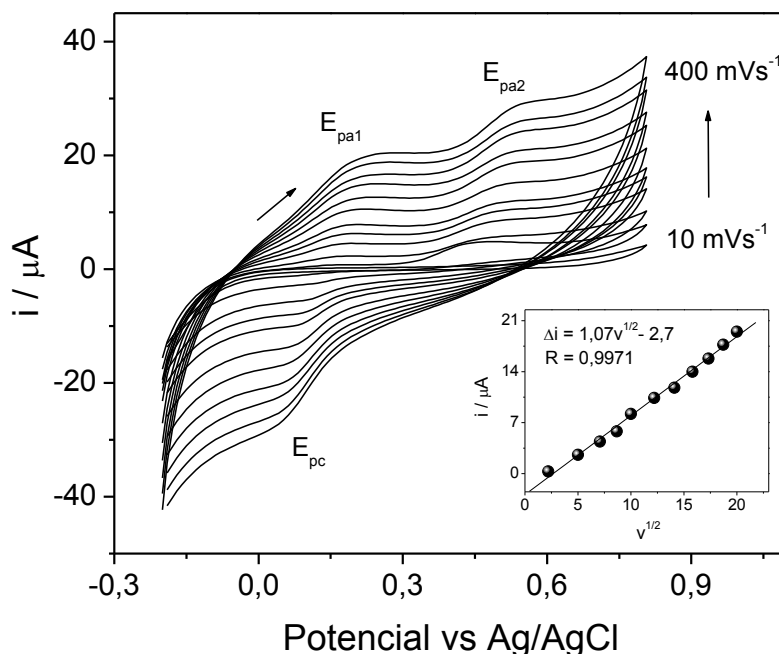


Na Figura 50B é feito uma comparação entre as curvas voltamétricas do sensor biomimético e sensor biomimético modificado com oxido de grafeno. Pode ser visto claramente no sensor biomimético modificado com óxido de grafeno o aparecimento de dois picos redox, sendo uma corrente de pico anódica em 0,25 V e uma corrente de pico catódica em 0,1 V, correspondendo à oxidação e redução do ferro

pertencente à hemina. Pode-se notar claramente que o uso de óxido de grafeno aumentou a resposta eletroquímica do sensor biomimético. Experimentos com eletrodo modificado somente com óxido de grafeno também foram realizados, não apresentando o mesmo perfil voltamétrico quando se utilizou o sensor biomimético modificado com óxido de grafeno. Sugere-se que a hemina empregada como modificador biomimético esteja promovendo uma eletrocatalise e que quando incorporado na pasta de carbono, o óxido de grafeno contribuiu com o aumento do sinal analítico.

O estudo de velocidade de varredura com o sensor proposto foi realizado entre 10-400 mVs⁻¹ e foi verificado a presença de dois picos anódicos em 0,25 e 0,55 V e uma corrente catódica em 0,15 V (Figura 51). Conforme a velocidade de varredura foi aumentada a corrente de pico anódico e catódico também aumentou. O gráfico de corrente de pico (i_{pa1}) vs raiz quadrada da velocidade de varredura (insert) apresentou um perfil de resposta linear, demonstrando que o transporte de massa do carbofurano do meio eletrolítico para a superfície do sensor é controlada por difusão.^{133,134}

Figura 51 - Variação da corrente de pico anódica com a velocidade e varredura (A) e gráfico de Δi_{pa1} vs $v^{1/2}$ (B). Condições de análise: [carbofurano] = 5×10^{-4} mol L⁻¹, Fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).



4.3.1 Influência do pH na voltametria de onda quadrada (VOQ)

O intervalo de pH analisado na cela eletroquímica foi entre 5 a 8 e a técnica eletroquímica usada foi a voltametria de onda quadrada (VOQ). A partir da Figura 52 foi constatado que em pH ácidos a resposta eletroquímica é menor devido a protonação do carbofurano. Quando analisado o pH 7,0 foi encontrado o maior sinal de corrente de pico (i_{pa}), sendo então escolhido para as análises eletroquímicas.

Figura 52 - Estudo em VOQ do pH realizado com o sensor proposto. Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0), $f = 10 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acc} = 0 \text{ V}$ e $t_{acc} = 50 \text{ s}$, $[\text{carbofurano}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

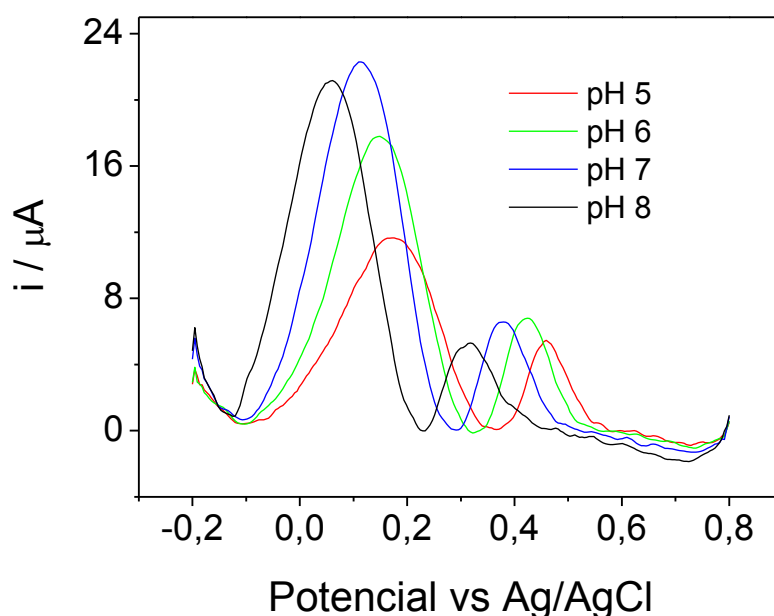


Tabela 15 - Parâmetros otimizados do sensor biomimético proposto

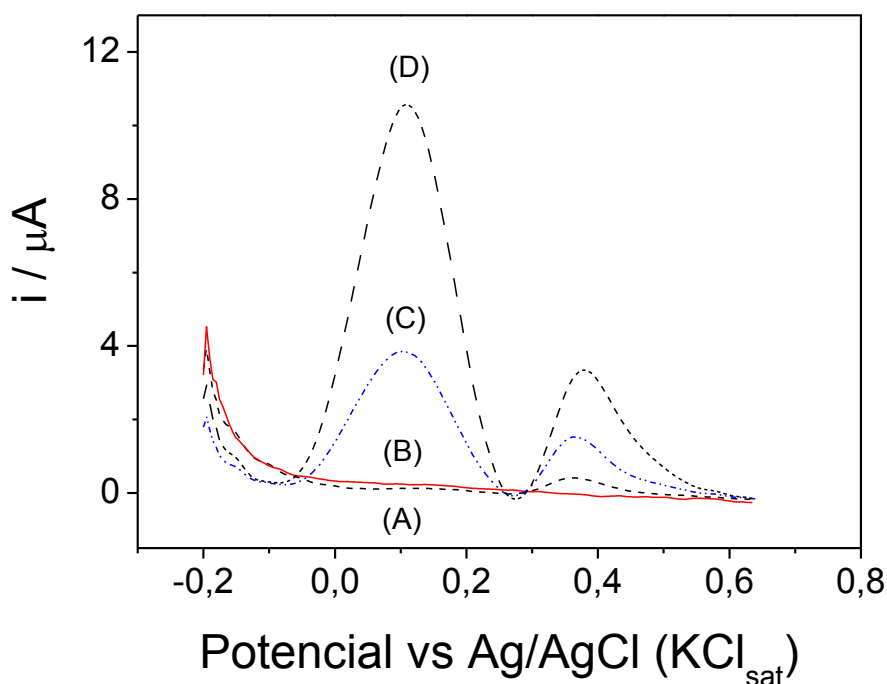
Quantidade de complexo na pasta/ % (m/m)	7*	9	13	23
Quantidade de óxido de grafeno na pasta / % (m/m)	0,02	0,04	0,11*	0,15
pH	6,0	6,5	7,0*	7,5
Tampão	Fosfato*	BR	TRIS	TRISMAN
Fosfato / mol L^{-1}	0,01	0,05	0,075	0,1*

*Valor otimizado. BR: tampão Britton-Robson.

4.3.2 Efeito do uso dos modificadores no sensor eletroquímico

Figura 53 mostra a resposta eletroquímica em voltametria de onda quadrada através do uso de modificadores na superfície do eletrodo. É visualizado a corrente de pico anódico do carbofurano em eletrodo não modificado na ausência (A) e presença (B) de carbofurano, sensor modificado com hemina (C) e sensor modificado com hemina e óxido de grafeno (D). A modificação do eletrodo promoveu o aumento da resposta eletroquímica, contribuindo com a melhora da sensibilidade e seletividade do sensor biomimético.

Figura 53 - Estudo da resposta eletroquímica em voltametria de onda quadrada (VOQ) do eletrodo não modificado, na ausência (A) e na presença (B) de carbofurano, sensor biomimético (C) e do sensor biomimético modificado com óxido de grafeno (D) na presença de carbofurano. Condições de análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$, $E_{\text{ACC}} = 0 \text{ V}$ e $T_{\text{ACC}} = 50 \text{ s}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) $[\text{carbofurano}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

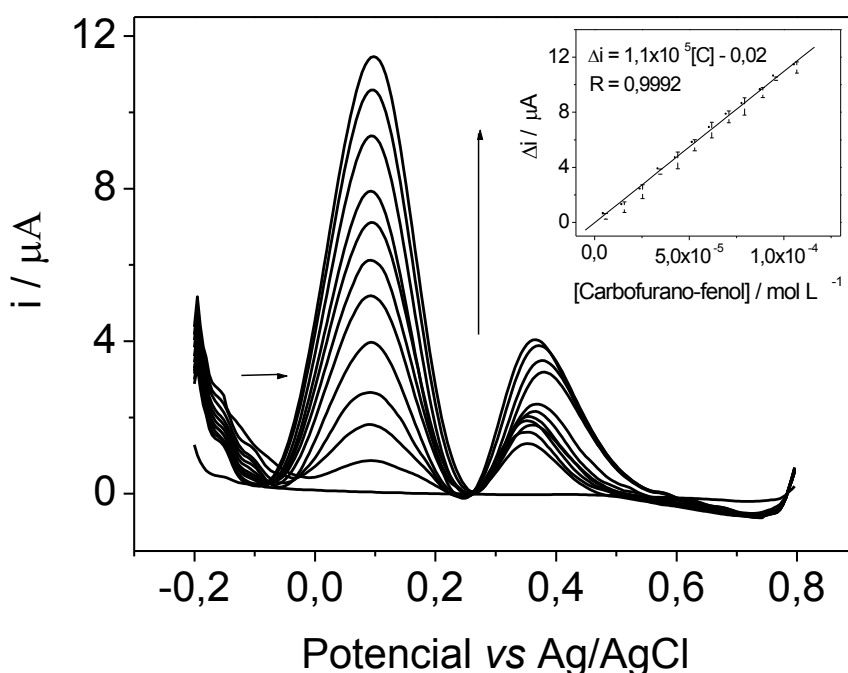


4.3.3 Análise em voltametria de onda quadrada e pulso diferencial

Os picos de corrente obtidos em voltametria de onda quadrada foram quantificados a partir de adições sucessivas de carbofurano na concentração de $2,0$

$\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O potencial de análise escolhido para as análises foi em 110 mV vs Ag/AgCl por apresentar elevada reprodutibilidade e estabilidade.

Figura 54 - Perfil da VOQ nas condições otimizadas obtido a partir de adições sucessivas de carbofurano na concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e sua curva analítica (B). Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0), $f = 10 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acc} = 0 \text{ V}$ and $t_{acc} = 50 \text{ s}$.

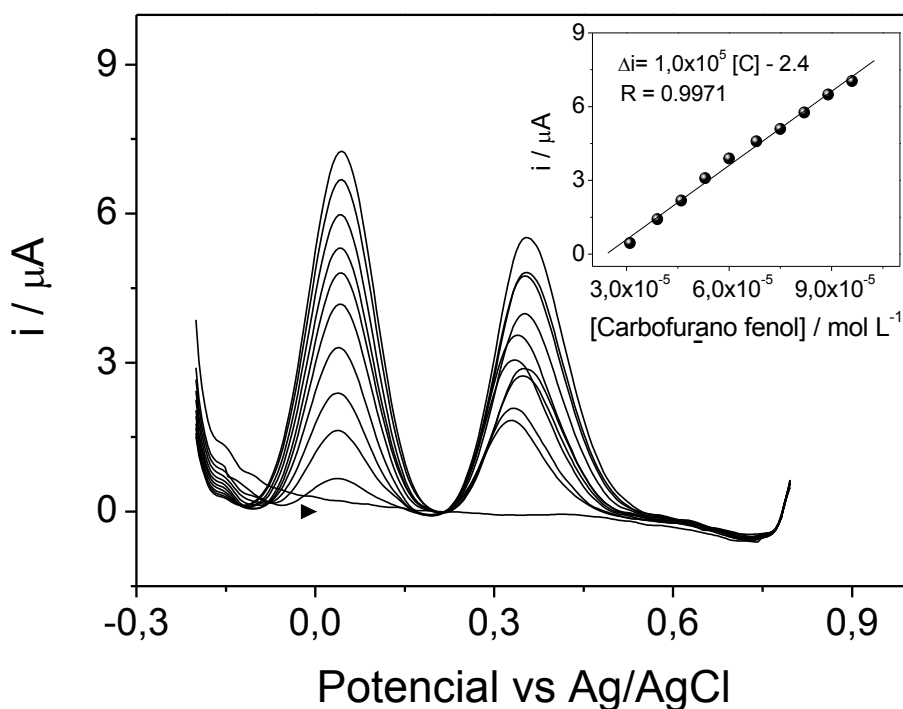


O sensor apresentou uma resposta linear para o carbofurano entre $5,0 \times 10^{-6}$ - $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 54), uma sensibilidade de $1,1 \times 10^5 \mu\text{A mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $1,5 \times 10^{-6}$ e $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.¹²⁴

Adicionalmente foram realizados estudos em voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizando em princípio as mesmas condições experimentais da voltametria de onda quadrada (VOQ). Foi visualizado que a faixa linear de resposta usada em DPV não apresentou quantificação nas primeiras adições de carbofurano-fenol. Dessa forma, foi realizado um estudo da concentração de carbofurano-fenol, sendo encontrada uma faixa linear de resposta de $2,0 \times 10^{-5}$ - $6,54 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção e quantificação de $0,63 \times 10^{-5}$ e $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 55). A partir dos resultados obtidos, a voltametria de onda quadrada (VOQ) foi escolhida como técnica electroquímica para determinação de carbofurano, pois apresentou maior

limite de detecção e consequentemente maior sensibilidade em relação à voltametria de pulso diferencial.

Figura 55 - Perfil de resposta em pulso diferencial (DPV) obtido em diferentes concentrações de carbofurano. Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7), Tempo de modulação= 0,5 s, f= 10 Hz, A= 100 mV, ΔEs= 4 mV, E_{acc}= 0 V and t_{acc}= 50 s, [Carbofurano] = 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.



Os resultados obtidos com o sensor biomimético proposto mostrou uma faixa linear de resposta satisfatória e um baixo potencial de análise que permitiu obter altas seletividades nas análises eletroquímicas, especialmente quando aplicado em amostras complexas. Outra característica que torna este dispositivo relativamente mais vantajoso em comparação com os outros descritos na literatura (Tabela 16) é a capacidade de renovação da superfície do eletrodo através de um simples polimento, tornando o uso do sensor proposto viável em numerosas análises.

Tabela 16 - Sensores eletroquímicos usados para detecção de carbofurano.¹³⁵⁻¹³⁷

Eletrodo	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	i _p / mV	Técnica
ECV (CoO/GO) ^a	5,0x10 ⁻⁷ – 2,0x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁸	400	DPV
Screen-printed de carbono ink	4,0x10 ⁻⁷ - 4,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁸	250	DPV
ECV (MWCNT/AChE) ^b	4,5x10 ⁻¹³ – 4,5x10 ⁻⁶	4,5x10 ⁻¹⁵	350	CV
ECV (AChE/Fe ₃ O ₄) ^c	5,0x10 ⁻⁹ – 9,0x10 ⁻⁸	3,6x10 ⁻⁹	600	VOQ
EPC^d	5,0 x 10⁻⁶ – 1,1x10⁻⁴	1,5 x 10⁻⁶	110	VOQ

^a Eletrodo de carbono vítreo modificado com oxido de cobalto e oxico de grafeno.

^b Eletrodo de carbono vítreo modificado com enzima acetilcolinesterase e nanotubos de carbono de parede múltipla.

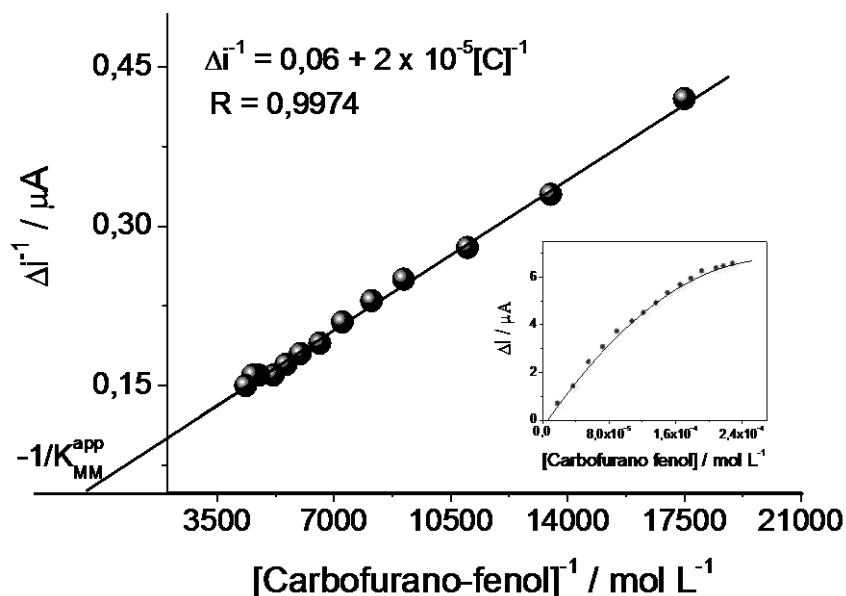
^c Eletrodo de carbono vítreo modificado com enzima acetilcolinesterase e nanocomposito de ferro.

^d Eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina e óxido de grafeno usado neste trabalho.

4.3.4 Caracterização do sensor biomimético

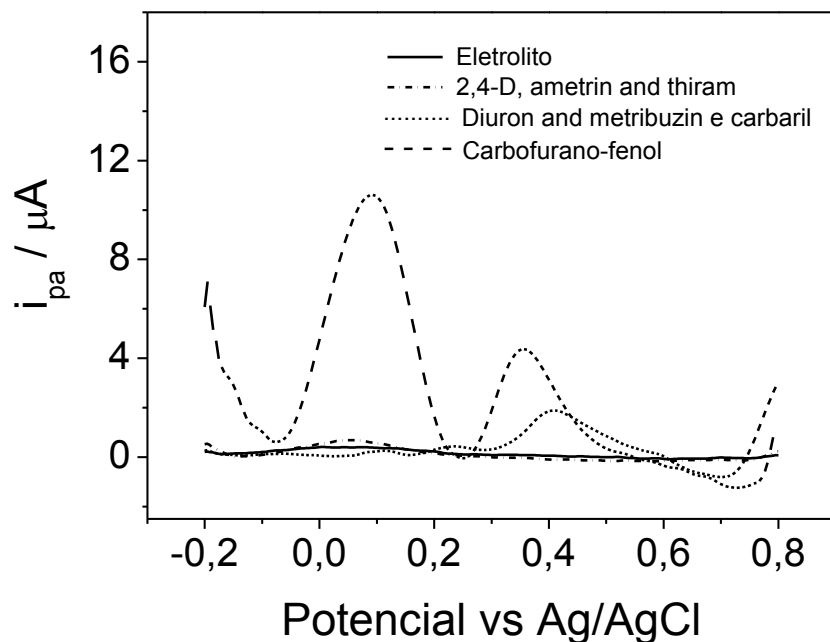
O caráter biomimético do sensor proposto foi avaliado em voltametria de onda quadrada, e apresentou inicialmente uma corrente que aumentou linearmente com a concentração do substrato (carbofurano), até um dado valor até alcançar um valor máximo, obtendo-se assim um perfil hiperbólico. O gráfico obtido é característico de biossensores e supõe-se nesse caso que o complexo utilizado no sensor proposto esteja seguindo uma cinética de Michaelis-Menten. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}) foi determinada a partir do gráfico de *Lineweaver-Burk*, sendo encontrado o valor de $3,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 56). Este valor indica o grau de afinidade entre o complexo hemina e o carbofurano.^{125,126} Como mencionado anteriormente há na literatura estudos que confirmam a ação da enzima P450 (CYP 2C9) na metabolização de agrotóxicos. Assim, uma comparação do K_{MM}^{app} obtido com o K_{MM}^{app} referente à CYP 2C9 para cada agrotóxico, não há no momento.^{127,128}

Figura 56 - Perfil hiperbólico obtido em VOQ (A) e gráfico do duplo recíproco obtido com o sensor biomimético (B).



4.3.5 Estudo de seletividade

A seletividade do sensor proposto para detecção carbofurano-fenol foi avaliada através da resposta de cinco soluções diferentes de agrotóxicos solúveis em água e acetonitrila na proporção de (5:1 v/v). A Figura 57 mostra a resposta do sensor proposto para os agrotóxicos de 2,4-D, thiram, diuron, metribuzin, ametrina e carbofurano-fenol. Somente o carbofurano-fenol apresentou resposta eletroquímica mensurável com um pico de corrente anódica (i_{pa}) no potencial de 110 mV vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). O intervalo de potencial estudado em VOQ foi entre -0,2 a 0,8 mV e a concentração preparada para todos os agrotóxicos foi de $5,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$.

Figura 57 - Estudo de seletividade de carbofurano com o sensor proposto

4.3.6 Aplicação do sensor em amostras reais

O carbofurano-fenol foi analisado em duas amostras de alimentos, utilizando o sensor proposto. A determinação eletroquímica de carbofurano-fenol foi efetuada por VOQ utilizando o método de adição de padrão. Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação realizados utilizando amostras de cenoura apresentaram recuperação próximo a 100%, o que indica que não houve efeito de matriz ou uma substância química que influenciasse na resposta eletroquímica do sensor (Tabela 17). Pode-se observar que os resultados obtidos com o método proposto estão de acordo com o valor obtido pelo método CLAE. Estes resultados indicam que o método proposto é fiável e eficaz para a determinação carbofurano-fenol.

Tabela 17 - Resultados obtidos de análises de amostras de tomates e cenoura coletados de supermercados da cidade de São Carlos/SP.

Amostras	Resultados encontrados para o sensor / mol L ⁻¹	Resultados encontrados no CLAE / mol L ⁻¹	Test- <i>t</i>
Cenoura nº 1	2,55(±0,21) ^a	2,43(±0,04) ^a	0,99
Cenoura nº 2	2,71(±0,20) ^a	2,46 (±0,03) ^a	2,2
Tomates nº 1	2,50(±0,14) ^a	2,41 (±0,02) ^a	1,1
Tomates nº 2	2,43(±0,04) ^a	2,36 (±0,05) ^a	3,0

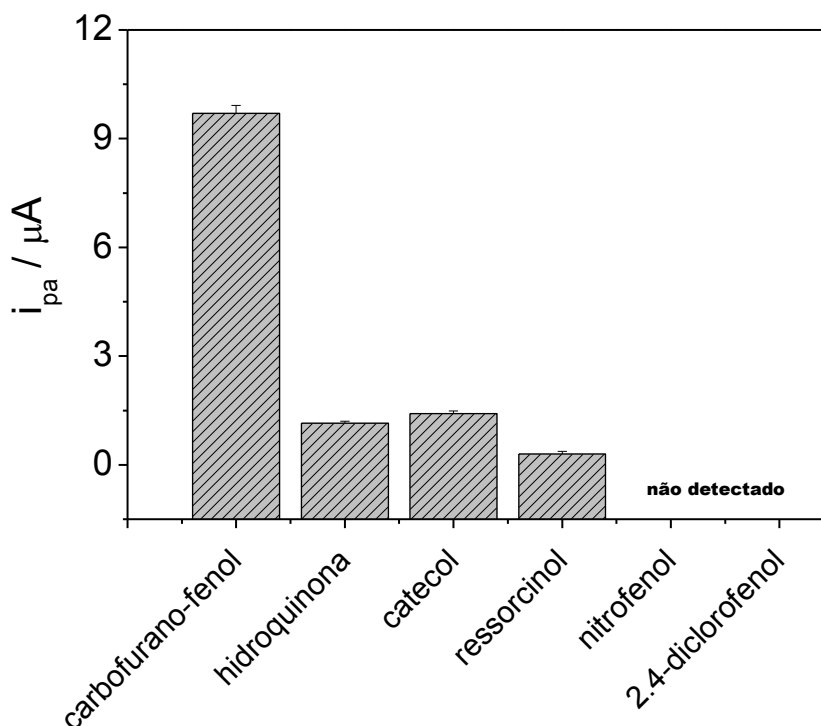
*Desvio padrão de 3 triplicadas $^a[\text{Carbofurano}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$.

Valores críticos de t em 95% em nível de confiança, $t_t = 4.303$. Valores obtidos considerando os valores comparativos como verdadeiros.

4.3.7 Estudo da resposta eletroquímica do sensor proposto para diferentes compostos fenólicos

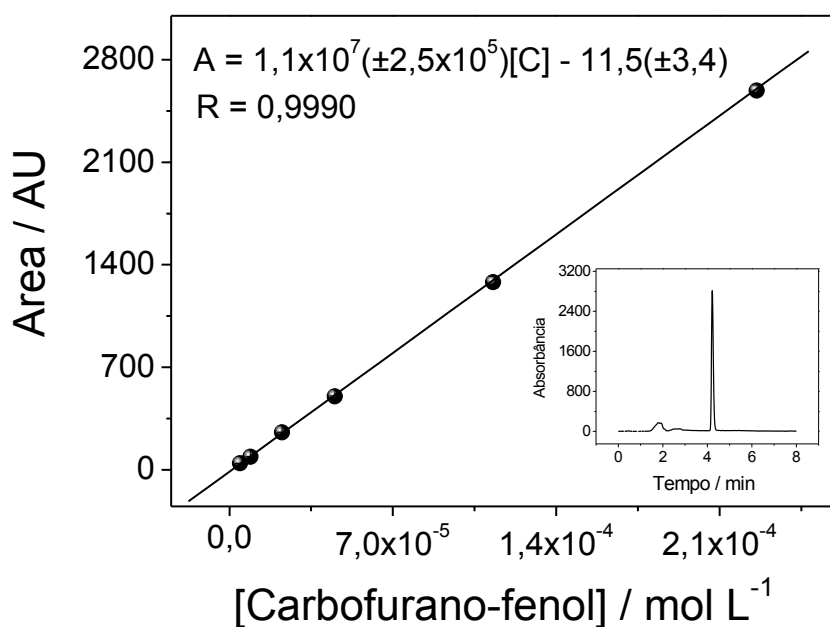
A Figura 58 mostra a resposta eletroquímica do sensor proposto obtido em VOQ para catecol, resorcinol, hidroquinona, 2,4-diclorofenol e carbofurano. A resposta relativa obtida para cada composto foi avaliada a partir da corrente de pico (i_{pa}) em potencial 110 mV. Os resultados mostraram que o eletrodo foi mais sensível para carbofurano em relação à catecol e hidroquinona, não apresentando resposta para 2,4-diclorofenol e resorcinol na técnica VOQ. Considerando-se que as matrizes analisadas não há presença desses interferentes, a aplicação deste sensor para a determinação de carbofurano-fenol em amostras de cenoura e tomate pode ser realizado sem problemas.

Figura 58 - Estudo da resposta eletroquímica de compostos fenólicos com o sensor proposto em VOQ. Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0), $f = 10 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acc} = 0 \text{ V}$ and $t_{acc} = 50 \text{ s}$, $[\text{carbofurano}] = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



As análises por CLAE-UV foram realizadas para a detecção e quantificação de carbofurano-fenol, utilizado neste trabalho como um método comparativo. Quando aplicado às amostras de alimentos, os resultados foram semelhantes aos do método de detecção proposto (sensor biomimética). Figura 59 mostra um cromatograma (inserção) e da curva analítica de carbofurano-fenol.

Figura 59 - Cromatograma do carbofurano-fenol (inserido) e curva analítica. Condições de análises: acetonitrila / água deionizada na razão 50:50 (v/v), taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹, volume de amostra injetada de 10 µL e comprimento de onda de 254 nm.

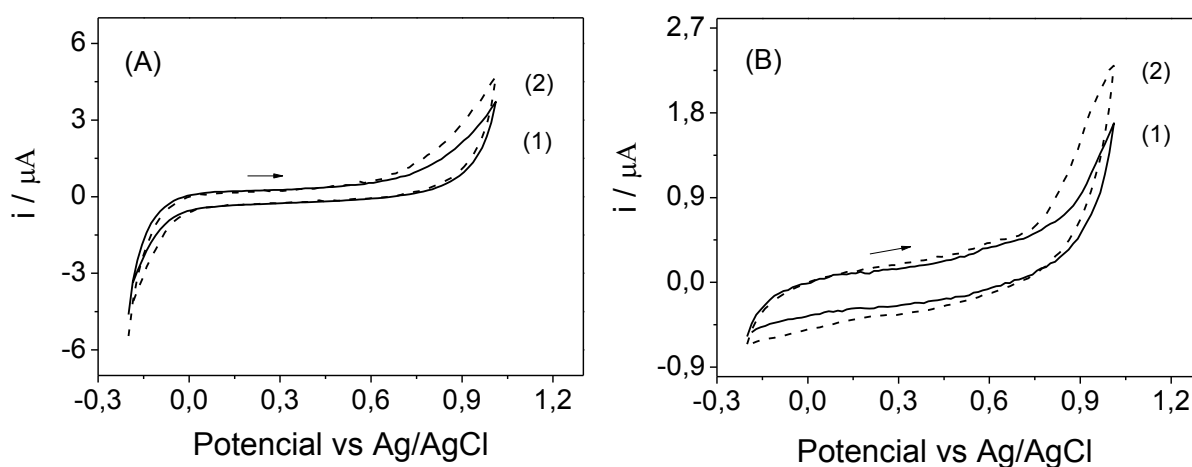


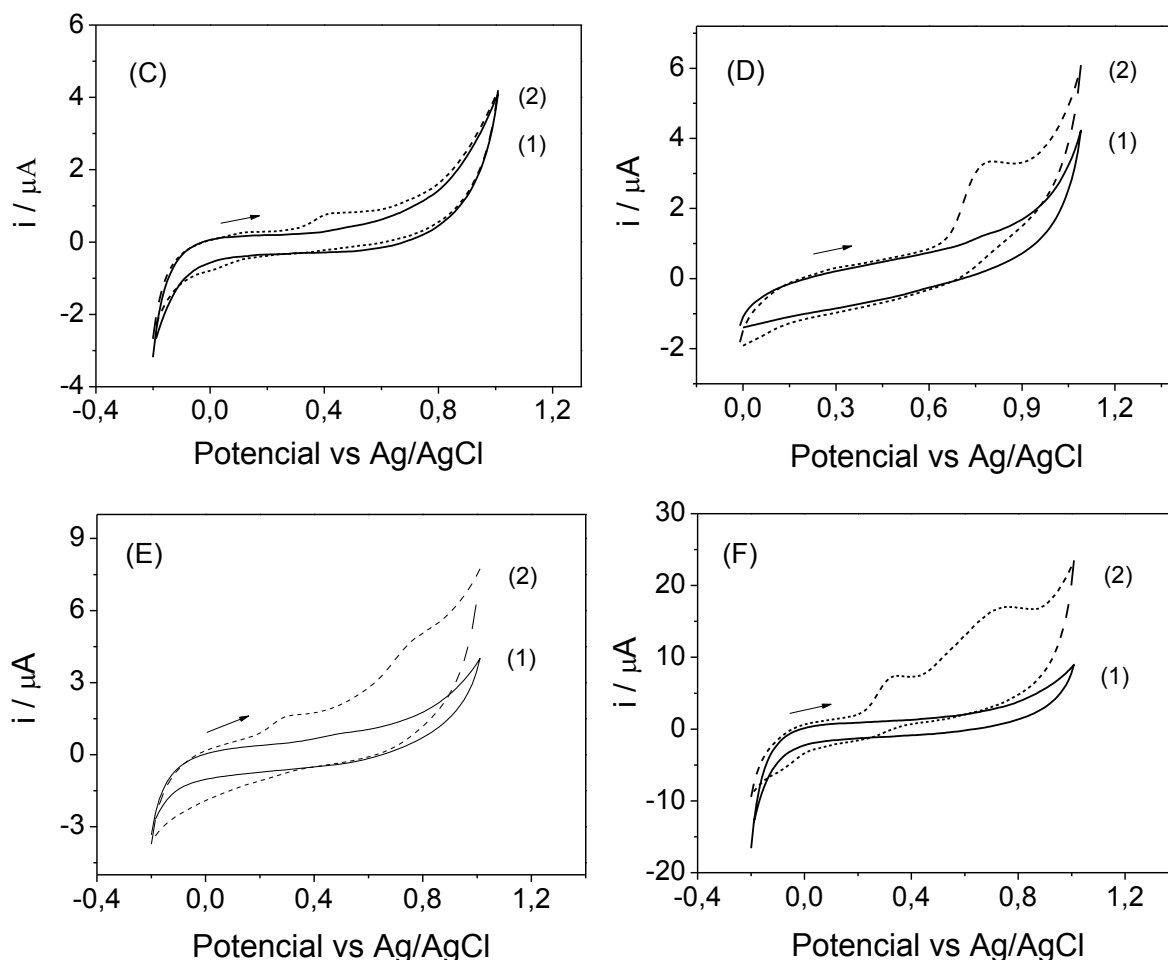
4.4 DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE CARBOFURANO E DIURON EM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

4.4.1. Perfil de resposta da mistura de analitos por voltametria cíclica

As medidas eletroquímicas do sensor proposto na presença de carbofurano-fenol e diuron foi realizada em sistema batelada usando voltametria cíclica, de modo a avaliar o efeito eletrocatalítico do complexo hemina e NiOPc na resposta do sensor. A Figura 60 mostra voltamogramas cíclicos, na ausência e na presença de carbofurano-fenol e diuron, usando eletrodo de pasta de carbono não modificado em uma faixa de potencial de -0,2 a 1,0 V. A resposta eletroquímica pode ser verificada a partir da variação de corrente anódica no potencial de 650 mV e 800 mV (Figura 60A e 60B). Quando o sensor foi modificado com hemina para detecção carbofurano-fenol e NiOPc para detecção de diuron foi visualizado uma corrente de pico anódica bem definida e um baixo potencial redox, quando comparado com o eletrodo não modificado.

Figura 60 - Resposta eletroquímica de carbofurano-fenol e diuron em eletrodo de pasta de carbono: eletrodo não modificado (A-B), modificado com NiOPc (C), modificado com hemina (D), modificado com NiOPc e hemina (E) e eletrodo modificado com NiOPc, hemina e oxido de grafeno (F) na ausência (1) e presença (2) de carbofurano-fenol e diuron. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5), [Carbofurano-fenol e diuron] = 5,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹, ν = 50 mVs⁻¹





Na Figura 60C e 60D pode ser visto, respectivamente, uma corrente de pico anódica (i_{pa}) correspondente ao carbofurano-fenol no potencial de 350 mV e um pico de corrente anódica (i_{pa}) correspondente ao diuron no potencial de 750 mV vs Ag/AgCl. Na Figura 60E temos os complexos hemina e NiOPc incorporado na pasta de carbono. O potencial de oxidação típico foi mantido em 350 mV para carbofurano e 750 mV para diuron. Na ordem de aumentar o sinal de corrente obtido para cada analito foi adicionado óxido de grafeno (GO) na composição de pasta de carbono, a qual proporcionou aumento da sensibilidade do sensor (Figura 60F). Este aumento no sinal observado era esperado, devido ao fato de GO ser um material condutor com elevada área superficial, o que permite a pré-concentração dos analitos na superfície do eletrodo, permitindo um aumento no sinal eletroquímico.^{53,54}

4.4.2 Otimização da resposta do sensor

No estudo da resposta do sensor pode ser observado que a presença do complexo na pasta causou um aumento na sensibilidade do sensor. Os resultados obtidos da otimização são apresentados na Tabela 18. A melhor resposta foi obtida em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato (pH 7,5), aplicando-se um 800 mV to diuron vs. Ag/AgCl (KCl_{sat}).

Tabela 18 - Parâmetros otimizados do sensor proposto para detecção de diuron e carbofurano.

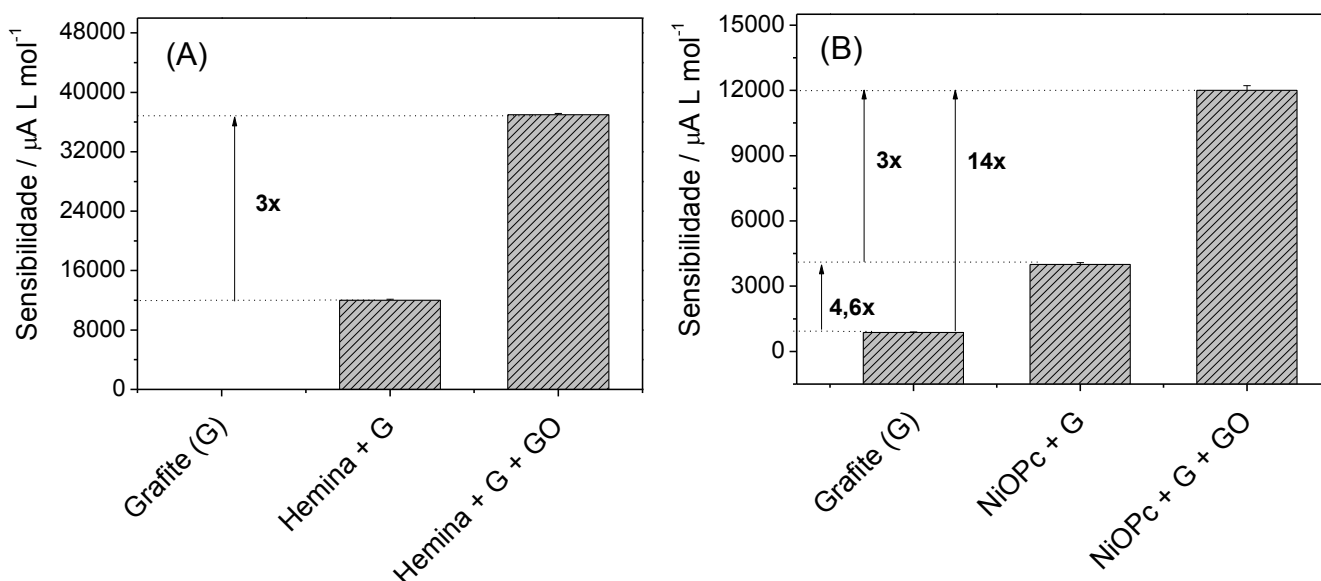
Quantidade de hemina na pasta / % (m/m)	5,5*	7	9	12
Quantidade de NiOPc na pasta / % (m/m)	5	7,5*	9	12
Quantidade de óxido de grafeno na pasta / % (m/m)	0,02	0,04	0,11	0,25*
pH	6,0	6,5	7,0	7,5*
Tampão	fosfato*	BR	TRIS	Pipes
Fosfato / mol L^{-1}	0,01	0,05	0,1*	0,15

*Valor otimizado. BR: Britton-Robson

4.4.3 Efeito do uso de modificadores na resposta do sensor proposto

O efeito do uso dos complexos hemina e óxido de grafeno foram realizados em sistema FIA com detecção amperométrica. Para isto, eletrodo não modificado, eletrodo modificado com NiOPc, hemina e óxido de grafeno foram testados com o sensor. Os resultados mostraram um aumento de sinal quando complexo NiOPC e hemina foram usados na composição da pasta de carbono. Quando GO foi usado o sinal eletroquímico aumentou, permitindo obter maiores sensibilidades para o sensor. Na Figura 61, a sensibilidade dos modificadores foi obtida através da média de 3 curvas analíticas em sistema FIA

Figura 61 - Sensibilidades obtidas através da voltametria de onda quadrada para cada modificador imobilizado na superfície do eletrodo: (A) carbofurano-fenol, (B) diuron.



A sensibilidade do sensor modificado com hemina/óxido grafeno e NiOPC/óxido grafeno foi $3,7 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ and $1,2 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$, respectivamente. A sensibilidade de carbofurano-fenol foi aumentada em 3 vezes quando o eletrodo foi modificado com hemina e oxido de grafeno em relação ao eletrodo modificado com hemina (Figura 61A). Quando a sensibilidade obtida para diuron foi comparada com o eletrodo não modificado, o aumento em sensibilidade foi de 14 vezes (Figura 61B). A construção da curva analítica em sistema FIA foi realizado através dos gráficos construídos em potencial de 350 e 800 mV, o qual foi usado para detecção de carbofurano-fenol e diuron, respectivamente. A quantidade de cada modificador usado neste estudo foram 5,5 mg hemina, 7,5 mg NiOPc e 0,25 mg óxido de grafeno em 100 mg de grafite.

4.4.4 Estudo de pH e potencial em FIA

Inicialmente foi realizado um estudo de potencial aplicado no sistema, sendo o melhor potencial encontrado foi de 450 mV para carbofurano e 800 mV para diuron. Após essa etapa o intervalo de pH de 5,0 a 8,0 foi investigado em amperometria. A corrente de pico anódico do carbofurano e diuron foi melhor para o pH 7,5. Assim, o pH 7,5 foi escolhido para os experimentos, pois apresentou maior valor de corrente de pico (Tabela 19). A concentração de carbofurano e diuron usada nessas análises foi de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 19 - Estudo de potencial e pH em FIA

	<i>Potencial / V</i>	<i>i_{pa} / μA</i>	<i>pH</i>	<i>i_{pa} / μA</i>
Carbofurano	0,30	0,3	5,0	1,1
	0,40	0,8	7,0	1,3
	0,45*	1,0	7,5*	1,6
	0,60	1,0	8,0	1,4
Diuron	0,60	0,2	5,0	0,6
	0,70	0,8	7,0	1,0
	0,75	1,1	7,5*	1,4
	0,80*	1,3	8,0	1,4

*Valor otimizado

4.4.5 Estudo do fluxo e volume de amostra injetado em FIA

A escolha do melhor fluxo no sistema FIA foi baseado na maior intensidade de corrente de pico. As taxas de fluxo estudadas foram entre 0,4 e 1,4 mL min⁻¹, sendo o valor ótimo para análise de 1,2 mL min⁻¹. O volume da amostra injetado (Vi) foi testado usando uma alça com volume de 50, 75 e 100 μL. O sinal aumentou com o aumento Vi, atingindo a saturação em 100 μL. Um volume de 75 μL foi escolhido porque apresentou bom sinal de corrente, sem afetar a frequência de amostragem (Tabela 20).

Tabela 20 - Estudo em fluxo e volume injetado de amostra em FIA

<i>Fluxo / mL min⁻¹</i>	<i>i_{pa} / μA</i>	<i>Volume / μL</i>	<i>i_{pa} / μA</i>
0,4	2,9	50	7,5
0,8	6,7	75*	9,8
1,2*	9,1	100	10,0
1,4	9,5	--	--

*Valor otimizado

4.4.6 Mecanismo de reação proposto para carbofurano e diuron

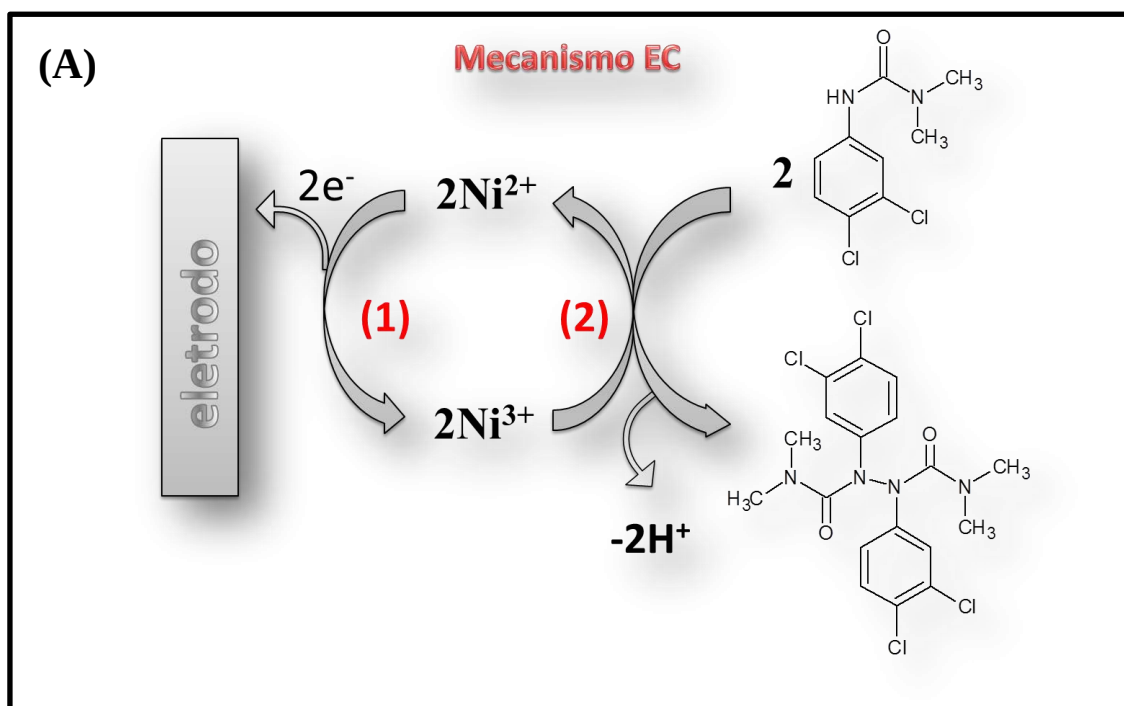
4.4.6.1 Reação de diuron com complexo NiOPc

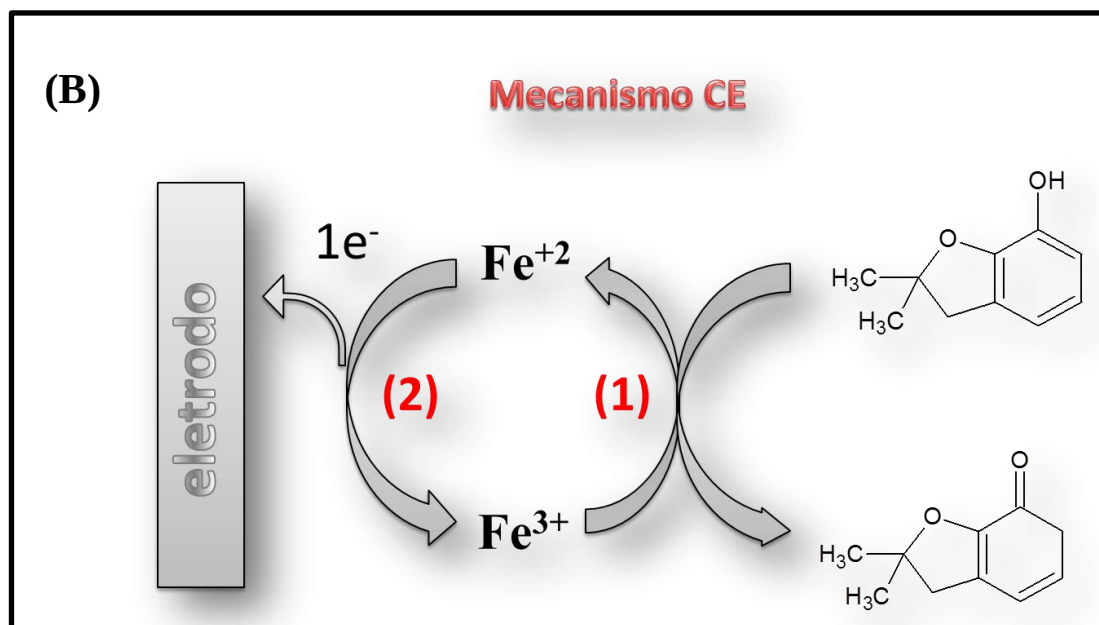
A reação entre complexo NiOPc e diuron é iniciada através da oxidação de Ni^{2+} do complexo NiOPc através de uma etapa eletroquímica, gerando espécies ativas (Ni^{3+}). O Ni^{3+} formado reage com diuron promovendo a redução de Ni^{3+} para Ni^{2+} e a oxidação de diuron formando espécie dímera (Figura 62A). O mecanismo proposto é baseado em um sistema eletroquímico-químico do tipo EC.¹³⁸⁻¹⁴¹

4.4.6.2 Reação de carbofurano e complexo hemina

O mecanismo sugerido para a resposta do sensor para carbofurano-fenol e hemina começa com a reação entre carbofurano-OH e hemina-Fe (III) no potencial de 450 mV, permitindo a reação eletroquímica de carbofurano-OH para carbofurano=O, e promoveu simultaneamente a redução de ferro (III) para ferro (II) no complexo hemina. Em uma segunda etapa ocorre a oxidação eletroquímica de hemina-Fe (II) para hemina-Fe (III), caracterizando um mecanismo químico-eletroquímico do tipo CE (Figure 62B).¹⁴²⁻¹⁴⁴

Figura 62 - Mecanismo proposto da reação carbofurano-fenol (A) e diuron (B). A reação procede com etapa 1 seguida da etapa 2.





4.4.7 Características analíticas do sistema FIA

As medidas de carbofurano-fenol usando sistema FIA mostrou curvas analíticas com concentrações entre $5,0 \times 10^{-6}$ - $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, um coeficiente de correlação de 0,9999, uma sensibilidade de $3,7 \times 10^4$ ($\pm 2,0 \times 10^2$) $\mu\text{A L mol}^{-1}$, e um limite de detecção de $1,67 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.¹²⁴ O potencial de análise para carbofurano-fenol usado nas medidas eletroquímicas foi de 450 mV Ag/AgCl(KCl_{sat})_{FIA} (Figura 63A).

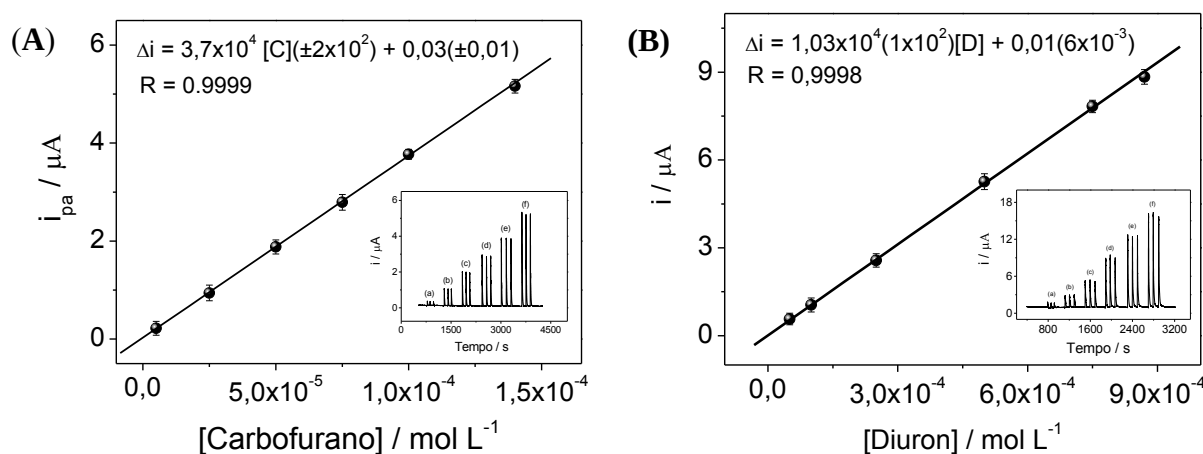
A obtenção do Diagrama para diuron foi realizado através da aplicação de um potencial redox de 800 mV e assumindo que carbofurano-fenol e diuron possam estar presentes em uma mesma amostra, as análises para determinação de diuron seguiu algumas etapas. Deve-se ter inicialmente a resposta eletroquímica de carbofurano-fenol em potencial de 450 mV e resposta eletroquímica de carbofurano-feno e diuron em potencial de 800 mV. Deve-se considerar que a resposta em 450 mV é somente de carbofurano-fenol e assim através de uma medida indireta o diuron pode ser determinado, conforme a equação 5 abaixo:

$$I_{\text{pa}}(\text{diuron}, 800 \text{ mV}) = I_{\text{pa}}(\text{carbofurano and diuron}, 800 \text{ mV}) - I_{\text{pa}}(\text{carbofurano}, 450 \text{ mV}) \quad \text{(Equação 5)}$$

O sinal eletroquímico de diuron pode ser obtido através da subtração da corrente de pico total que corresponde ao sinal eletroquímico de diuron e carbofurano-fenol menos a corrente de pico obtido com a resposta eletroquímica de carbofurano-fenol. É importante mencionar que a corrente de pico de carbofurano-fenol foi adotado como referência depois de muitas análises eletroquímicas em sistema FIA na ausência e presença de diuron, aplicando um potencial de 450 e 800 mV vs Ag/AgCl. Analisando os resultados obtidos em termos de sensibilidade a partir de curvas analíticas foram muito reproduzíveis (Tabela 21).

A Figura 63B mostra o Diagrama obtido para diuron na qual apresentou uma faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, um coeficiente de correlação de 0,9998, uma sensibilidade de $1,0 \times 10^4$ ($\pm 1 \times 10^2$) $\mu\text{A L mol}^{-1}$, e limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.¹²⁴

Figura 63 - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de carbofurano (mol L⁻¹): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$ e diuron (mol L⁻¹): (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-4}$; (f) $8,7 \times 10^{-4}$ Curvas analíticas de carbofurano (A) e diuron (B) Medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0.45$ (A) e 0.8 V (B).



Deve-se considerar que as curvas analíticas obtidas para diuron na ausência e na presença de carbofurano foram semelhantes quando analisados os valores de sensibilidade obtidos. Assim, a determinação eletroquímica de carbofurano e diuron na mesma solução foi possível, utilizando esta metodologia de análise.

Tabela 21 - Estudo de potencial obtido com o sensor proposto em FIA

	<i>Potencial / V</i>	<i>Medidas</i>	<i>Sensibilidade / $\mu\text{A L mol}^{-1}$</i>	<i>RSD (%)</i>
Carbofurano	0,45	nº 1	$3,72 \times 10^4 (\pm 1,6 \times 10^2)$	3,9
		nº 2	$3,61 \times 10^4 (\pm 3,3 \times 10^3)$	
		nº 3	$3,90 \times 10^4 (\pm 1,2 \times 10^2)$	
	0,8	nº 4	$3,64 \times 10^4 (\pm 2,2 \times 10^2)$	2,5
		nº 5	$3,70 \times 10^4 (\pm 2,0 \times 10^3)$	
		nº 6	$3,52 \times 10^4 (\pm 1,0 \times 10^3)$	

Tabela 22 é mostrada um breve resumo das características obtidas em FIA na detecção de carbofurano-fenol e diuron.

Tabela 22: Parâmetros otimizados e características analíticas obtidas para o sensor proposto no sistema FIA.

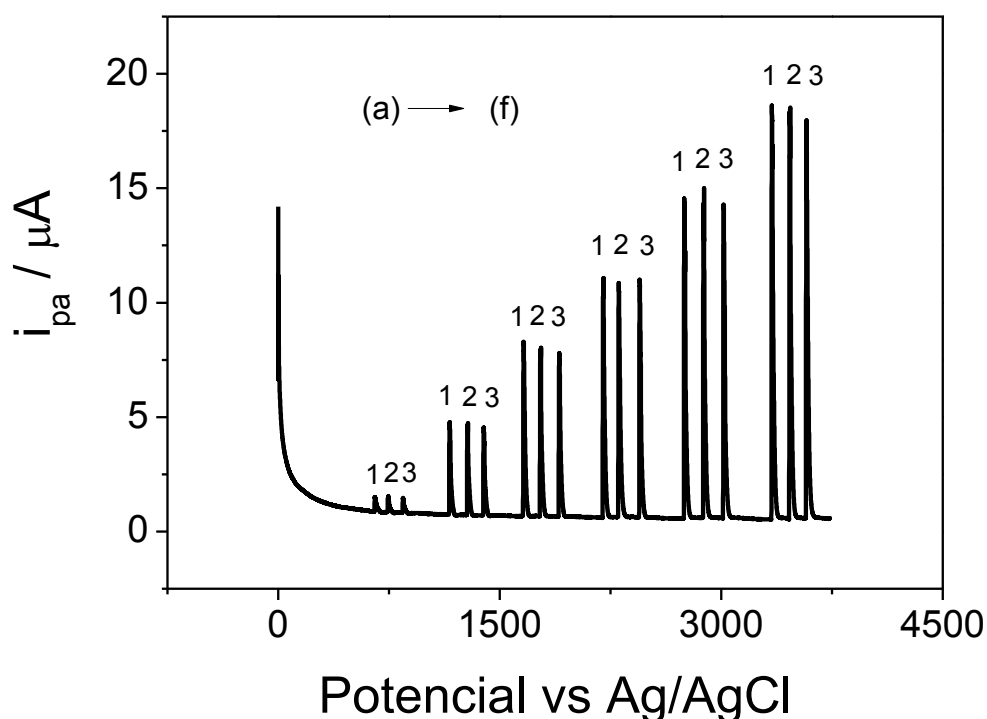
Parâmetro	Valor	
	Carbofurano	Diuron
Vazão (mL min^{-1})	1,2	1,2
V_i (μL)	75	75
$E_{\text{apl}} / \text{V vs. Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$	0,45	0,8
Faixa de resposta (mol L^{-1})	$5,0 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5} - 8,7 \times 10^{-4}$
Sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	$3,7 \times 10^4 (\pm 2,0 \times 10^2)$	$1,0 \times 10^4 (\pm 1,0 \times 10^2)$
Limite de Quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5,0	49
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,7	16
Medida de repetibilidade (RSD, n=21)	4,4	
Frequência Analítica	40 amostras h^{-1}	

4.4.8 Estudo de seletividade

A seletividade do sensor para detecção de carbofurano e diuron foi avaliada através da análise de várias soluções de agrotóxicos solúveis em acetonitrila/água deionizada (1:5 v/v). As análises foram realizadas em amperometria com os agrotóxicos de 2,4-D, thiram, ametrina, hexazinona, clorpirifós, diuron e carbofurano.

A injeção em FIA dos agrotóxicos foi realizada como se segue: **(1)** carbofurano-fenol e diuron, **(2)** e **(3)** 2,4-D, ametrina, hexazinona, thiram, clorpirifós, carbofurano-fenol e diuron. Pode ser notado que os agrotóxicos não influenciaram na resposta eletroquímica de diuron e carbofurano-fenol no potencial de 450 (não mostrado) e 800 mV. Deve ser lembrar que o sistema de análise utilizado está sob fluxo contínuo, minimizando assim qualquer problema de contaminação da superfície do eletrodo. (Figura 64). A concentração preparada para todos os agrotóxicos estavam na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 64 – Gráfico FIA obtido com o sensor em diferentes concentrações de agrotóxicos (mol L^{-1}), Carbofurano-fenol: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$, Diuron: (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $4,0 \times 10^{-4}$; (e) $5,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,0 \times 10^{-3}$, [Outros agrotóxicos] = $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em todas medidas. Condições de análises: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,8 \text{ V}$.

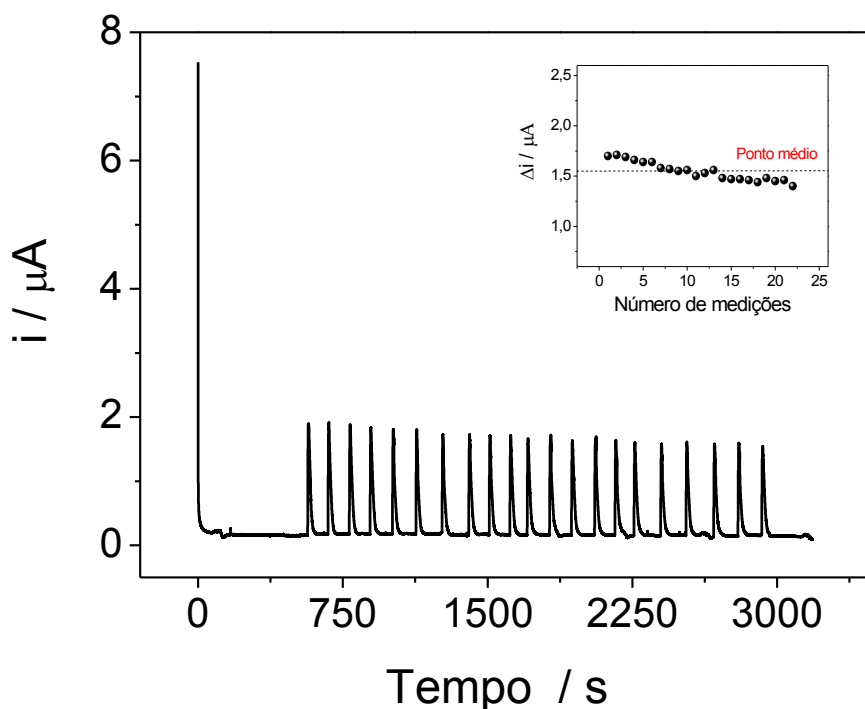


4.4.9 Estudo de repetibilidade

A repetibilidade do sensor foi investigada utilizando injeções sucessivas de solução de diuron e carbofurano na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo foi calculado, sendo o valor encontrado para $n=21$ de 4,4% (Figura 65). Sob as condições empregadas, o sensor poderia ser operado com uma frequência de análise de 40 injeções por hora.

Assim, pode-se dizer que as análises em FIA não devem apresentar qualquer dificuldade, uma vez que a calibração do sensor deve ser sempre realizada antes da sua utilização.

Figura 65 - Estudo de repetitividade em FIA a partir de 21 injeções sucessivas de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de carbofurano e solução diuron, $E_{\text{APL}} = 0,8 \text{ V}$. As medições foram realizadas em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5).

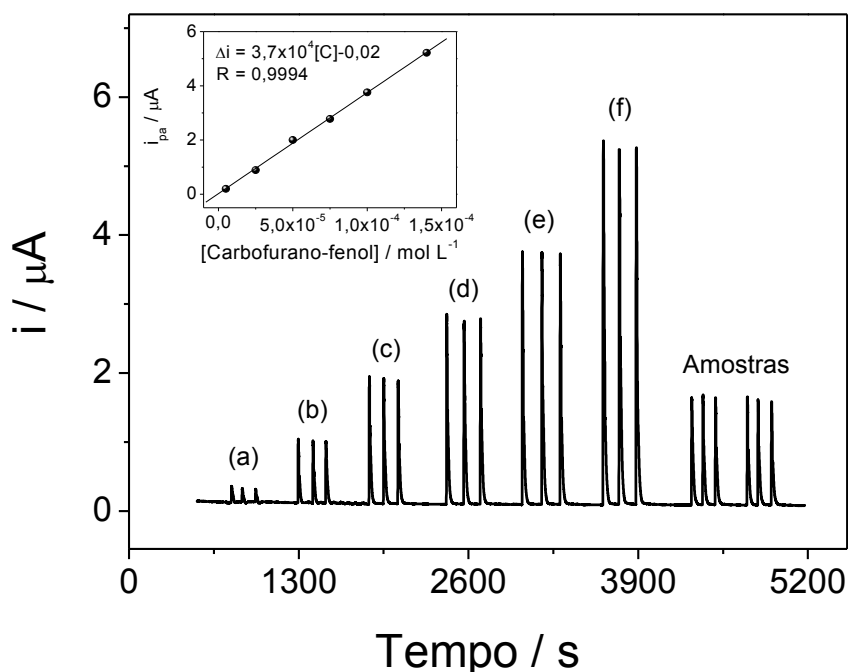


4.4.10 Aplicação de sensor eletroquímico em cenouras e amostras de solo

A determinação eletroquímica de carbofurano e diuron em amostras de cenoura e solo foi realizada em FIA utilizando o método padrão externo. Inicialmente

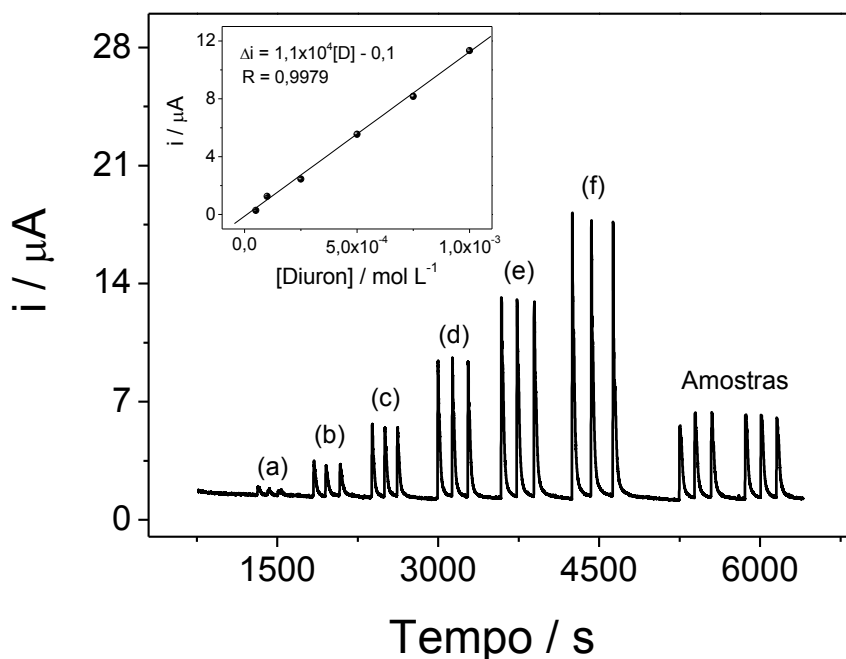
foi construído o gráfico FIA para carbofurano com a aplicação de potencial de 450 mV. A curva de calibração foi obtida a partir de injeções sucessivas em triplicata de carbofurano. Depois de realizadas injeções dos padrões foram injetadas às amostras de cenoura (triplicata), conforme a Figura 66 e 67.

Figura 66 - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de carbofurano (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$ e diuron (mol L^{-1}): $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-4}$; (f) $8,7 \times 10^{-4}$. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,45 \text{ V}$.



O cálculo da concentração de carbofurano nas amostras de cenoura foi realizado utilizando a curva de calibração obtida no FIA. A curva analítica correspondente ao diuron foi obtida subtraindo-se o valor total de cada corrente de pico anódica menos o valor de cada corrente de pico anódica do carbofurano. Assim, este estudo foi realizado em duas etapas em FIA, uma análise em potencial de 450 mV e outra em 800 mV vs. Ag/AgCl.

Figura 67 - Sinal FIA obtido usando sensor eletroquímico para diferentes concentrações de diuron (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $2,5 \times 10^{-5}$; (c) $5,0 \times 10^{-5}$; (d) $7,5 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $1,3 \times 10^{-4}$ e diuron (mol L^{-1}): 5,0 $\times 10^{-5}$; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-4}$; (f) $8,7 \times 10^{-4}$. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) e $E_{\text{apl}} = 0,8 \text{ V}$



O procedimento experimental para análise das amostras de solo foi conduzido da mesma maneira que as amostras de cenoura. O procedimento foi baseado na adição de uma concentração conhecida dos padrões nas amostras de solo e através das análises em FIA determinou-se a percentagem de recuperação para cada amostra.

A concentração de carbofurano e diuron encontrados nas amostras de solo e de cenoura no estudo de recuperação encontra-se na Tabela 23 e 24. Os resultados obtidos nos experimentos de recuperação realizados com amostras de solo e cenoura mostraram recuperações próximas à concentração adicionada, indicando que não houve efeito da matriz para estas amostras. Pode ser observado que os resultados obtidos pelo método proposto estão de acordo com o valor obtido com o método comparativo (CLAE).

Tabela 23: Resultados obtidos para a análise de solo coletado na cidade de São Carlos-SP.

Agrotóxicos	Amostras / solo	Método proposto		Método CLAE	
		Adicionado / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Medido / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Adicionado / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Medido / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹
Carbofurano fenol	nº 1	4,0	4,1 ($\pm 0,15$)	4,0	3,9 ($\pm 0,01$)
	nº 2	4,0	4,2 ($\pm 0,06$)	4,0	4,2 ($\pm 0,09$)
Diuron	nº 1	4,0	4,0 ($\pm 0,46$)	4,0	4,1 ($\pm 0,12$)
	nº 2	4,0	4,2 ($\pm 0,17$)	4,0	3,9 ($\pm 0,22$)

Tabela 24: Resultados obtidos para a análise de amostra de cenoura

Agrotóxicos	Amostras / cenoura	Método proposto		Método CLAE	
		Adicionado / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Medido / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Adicionado / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	Medido / $\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹
Carbofurano- fenol	nº 1	4,0	4,0 ($\pm 0,15$)	4,0	4,1 ($\pm 0,07$)
	nº 2	4,0	4,3 ($\pm 0,14$)	4,0	4,2 ($\pm 0,02$)
Diuron	nº 1	4,0	4,1 ($\pm 0,10$)	4,0	3,9 ($\pm 0,09$)
	nº 2	4,0	3,8 ($\pm 0,09$)	4,0	3,7 ($\pm 0,03$)

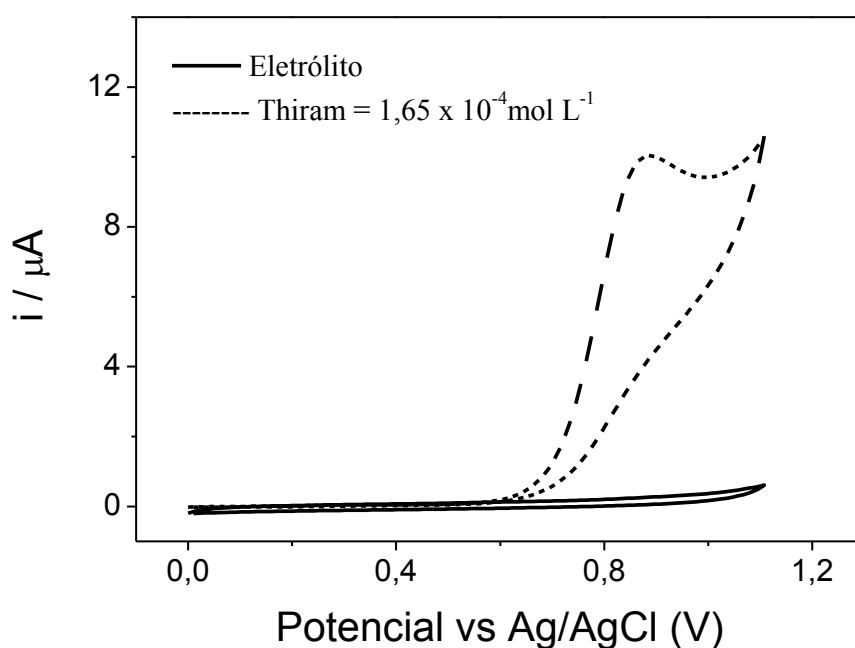
*Desvio padrão de triplicatas

O desenvolvimento do sensor biomimético para determinação de carbofurano-fenol e diuron em amostras de solo e alimentos possibilitou demonstrar através dos resultados obtidos, a aplicabilidade desse sensor em matrizes ambientais sem perda da eficiência analítica. As características vantajosas obtidas com esse dispositivo o tornam altamente promissor, sendo uma alternativa analítica para determinação de diuron e carbofurano.

4.5 ANÁLISE ELETROQUÍMICA DE THIRAM EM ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM MWCNT-COOH

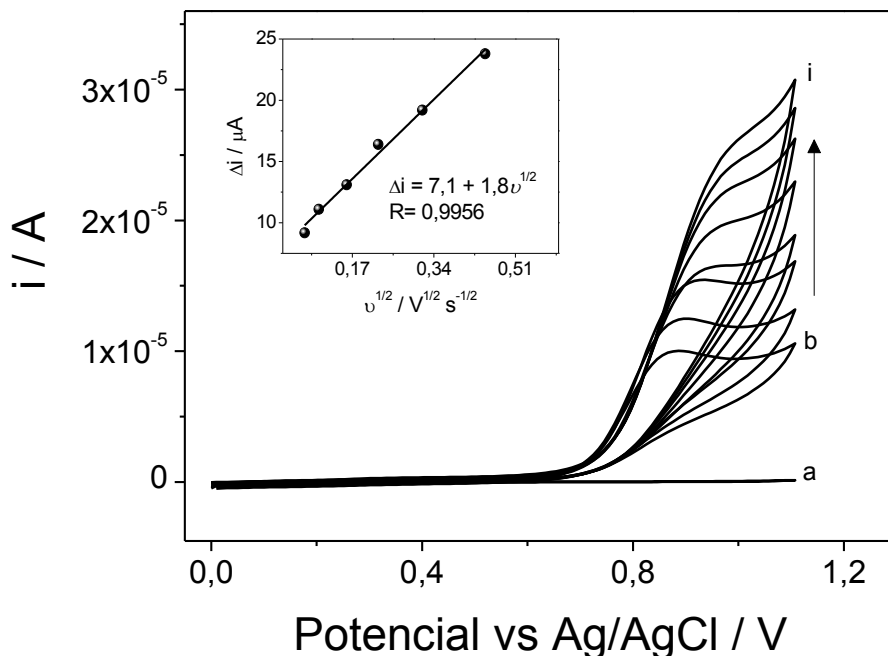
Estudos preliminares utilizando voltametria cíclica permitiram analisar o comportamento eletroquímico do fungicida thiram. Através do voltamograma cíclico da Figura 68, observou-se um aumento considerável na corrente anódica a partir do potencial de 650 mV, o qual corresponde à oxidação do thiram na superfície do sensor, atingindo um máximo em 800 mV. Adicionalmente, verifica-se a ausência de uma corrente catódica caracterizando o processo eletroquímico como irreversível e/ou catalítico.

Figura 68 - Voltamograma cíclico para o eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH. Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A fim de estimar parâmetros importantes da oxidação eletroquímica do thiram, tais como coeficiente de difusão, coeficiente de transferência eletrônica e o número de elétrons envolvidos, foram realizadas diversas análises, tais como velocidade de varredura em voltametria cíclica. O estudo do efeito da velocidade de varredura foi realizado conforme a Figura 69, que mostra o perfil linear do gráfico i_p vs $v^{1/2}$ (raiz quadrada da velocidade de varredura). Através da linearidade obtida pode-se confirmar que o transporte de massa do analito para a superfície do eletrodo foi realizado por difusão.

Figura 69 - Variação da corrente de pico anódica com a velocidade de varredura e gráfico de Δi_p vs $v^{1/2}$ (inserido).



O gráfico inserido na figura anterior possibilitou a determinação do coeficiente de difusão (D_0) do analito através da inclinação da reta e a equação de Andrieux and Savèant (Equação 6). O coeficiente de difusão (D_0) encontrado foi de $5,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.¹⁴⁵

$$\Delta i_p = 0,496 F A C_s D_0^{1/2} \left(\frac{F}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: C_s é a concentração de thiram em mol cm^{-3} ; D_0 é o coeficiente de difusão, F é a constante de Faraday, $R = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$ e $A = 0,125 \text{ cm}^2$.

Observando os gráficos das Figuras 68 e 69, observou-se que a oxidação do thiram sofre um processo irreversível e dessa forma a equação 7 de Randles-Sevcik foi aplicada para determinação do número de elétrons da reação.¹⁴⁶

$$j_p = (2,99 \times 10^5) n [(1 - \alpha) n_a]^{1/2} D_0^{1/2} C_s v^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

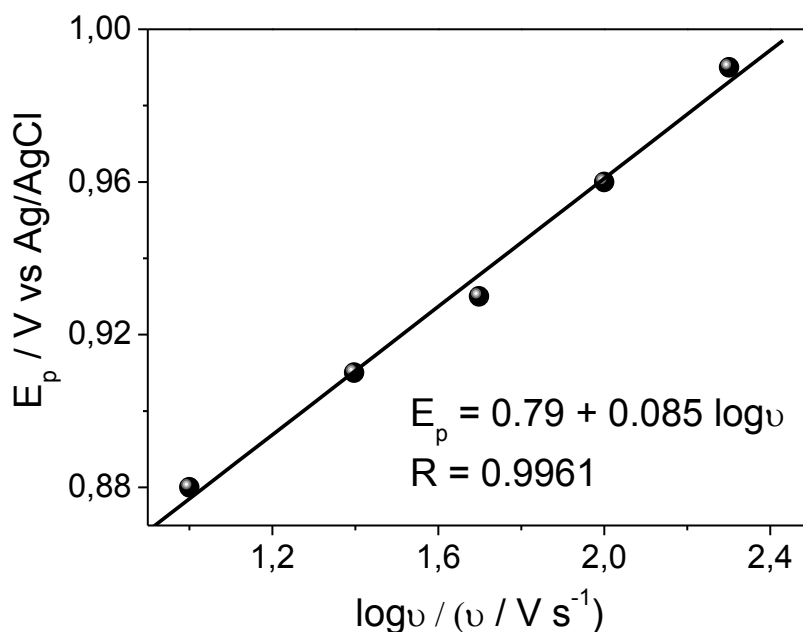
Onde: j_p = densidade de corrente em $A\ cm^{-2}$, n = número de elétrons totais, α = coeficiente de transferência de carga, D_0 é o coeficiente de difusão, C_s é a concentração de thiram e $v^{1/2}$ = raiz da velocidade de varredura.

Todavia, na ordem de estimar o valor de n , é necessário calcular o valor de $[(1 - \alpha)n_a]$. Em sistemas catalíticos ou irreversíveis, um cálculo aproximado é baseado na relação linear entre o potencial de pico anódico (E_p) vs $\log v$ (Figura 70). A relação entre a inclinação e a equação 8, forneceu um valor para o fator $[(1 - \alpha)n_a]$ de 0,35.

$$0,084 = \frac{1.15RT}{[(1 - \alpha)n_a]F} \quad \text{Equação 8}$$

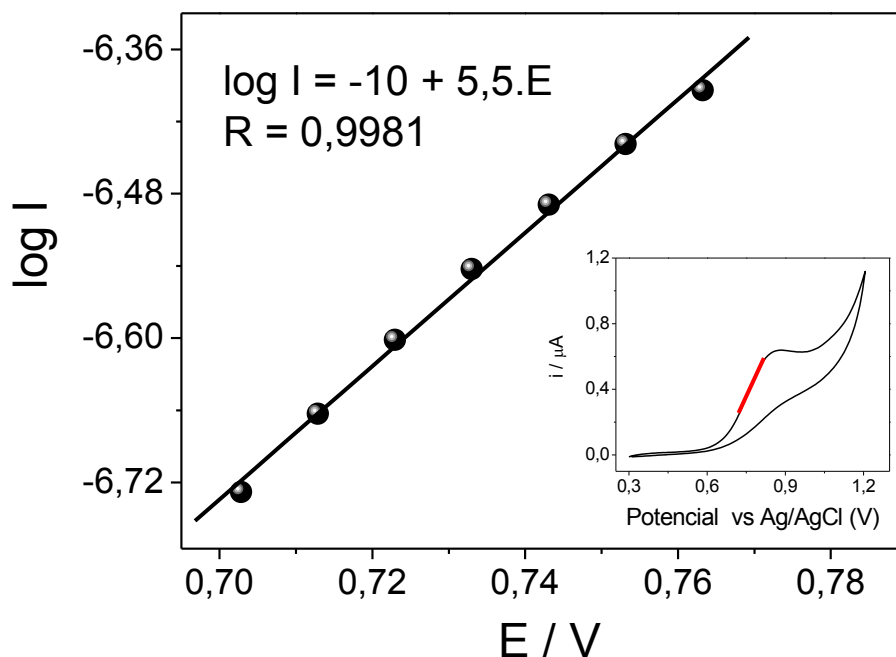
Após calcular o valor de $[(1 - \alpha)n_a]$ utilizando a equação 8 e o coeficiente de difusão estimado do thiram, foi possível calcular o número de elétrons envolvidos na eletrooxidação catalítica do thiram sobre a superfície do sensor impresso. O valor obtido para “ n ” foi de 1,7 ou seja 2 elétrons.

Figura 70 - Variação linear do potencial de oxidação (E_p) vs $\log v$. Medidas realizadas em tampão fosfato (pH 8,0) contendo $1,92 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de thiram.



Com base no voltamograma mostrado na Figura 71, foi possível estimar o coeficiente de transferência de elétrons (α) através da lei de Tafel.¹³⁴ Assim, com o valor da inclinação do gráfico inserido na Figura 71 estimou-se um valor aproximado para α , usando a relação na qual a inclinação = $n(1-\alpha)F/2,3RT$, da qual se pode obter o valor de 0,84 (usando $n = 2$), que caracteriza um processo catalítico, com elevada transferência eletrônica. Isto indica que a oxidação de thiram neste sensor ocorreu por via eletrocatalítica.¹³⁴

Figura 71 - Voltamograma cíclico utilizado para cálculo do coeficiente de transferência eletrônica (α_a) a partir da região de Tafel. Condições de análise: Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) e acetonitrila (4:1, v/v), $\nu = 300$ mVs⁻¹.



4.5.1 Estudo da influência do pH e do potencial nas medidas eletroquímicas.

No estudo de otimização do sensor impresso modificado com MWCNT-COOH foram avaliados o pH e o potencial aplicado. A escolha do melhor parâmetro em relação ao pH e ao potencial, baseou-se em avaliar a maior sensibilidade obtida através das medidas amperométricas. De acordo com a Figura 72 e 73, observou-se que no estudo de pH, o tampão com valor de pH 8,0, apresentou maior resposta em

termos de sensibilidade e o mesmo ocorreu no estudo de potencial, no qual o melhor potencial foi em 800 mV.

Figura 72 - Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do potencial aplicado.

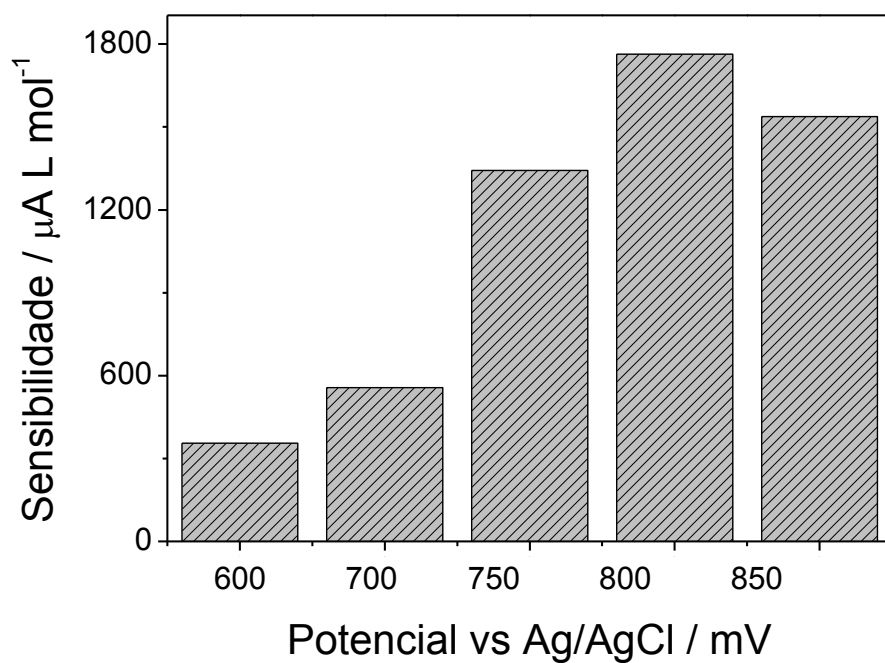
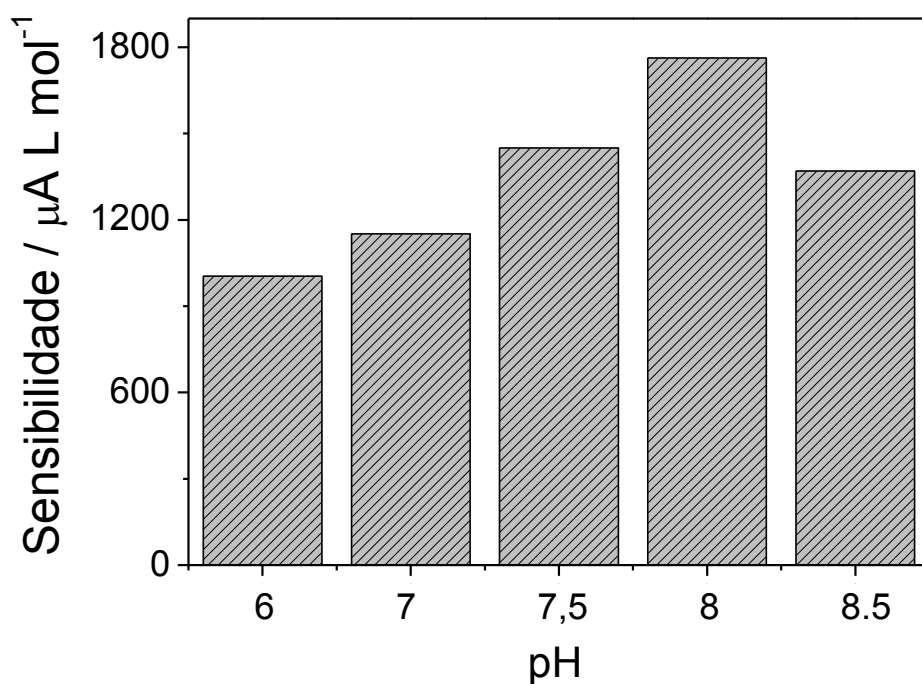


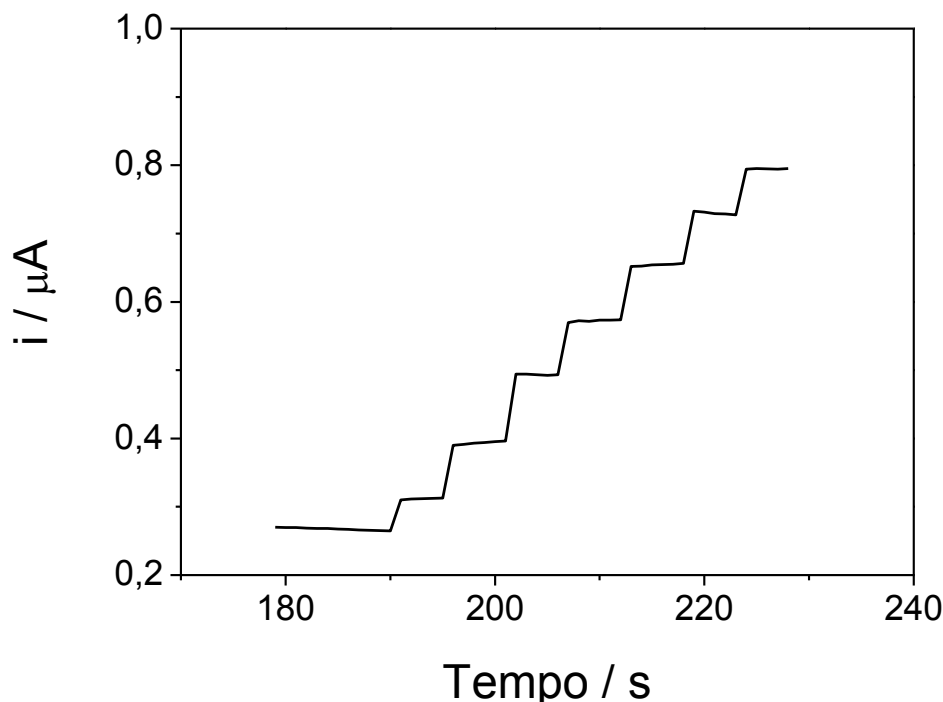
Figura 73 - Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do pH.



4.5.2. Perfil amperométrico do eletrodo impresso na presença de thiram

Na Figura 74 é mostrado o amperograma obtido para o sensor impresso modificado com MWCNT-COOH na presença de thiram e nas condições de análise otimizadas. As medidas foram realizadas em potencial de 800 mV, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 8,0. Durante a análise utilizando essa técnica, um período de tempo de espera em segundos foi necessário para a ocorrência de descarga de corrente (corrente não-faradaica). Após estabilização da corrente as medidas foram realizadas, assegurando assim, que a corrente faradaica da reação entre o complexo e thiram seja aquela registrada. Degraus de corrente proporcionais à concentração do analito no meio analisado são obtidos a partir de adições sucessivas.

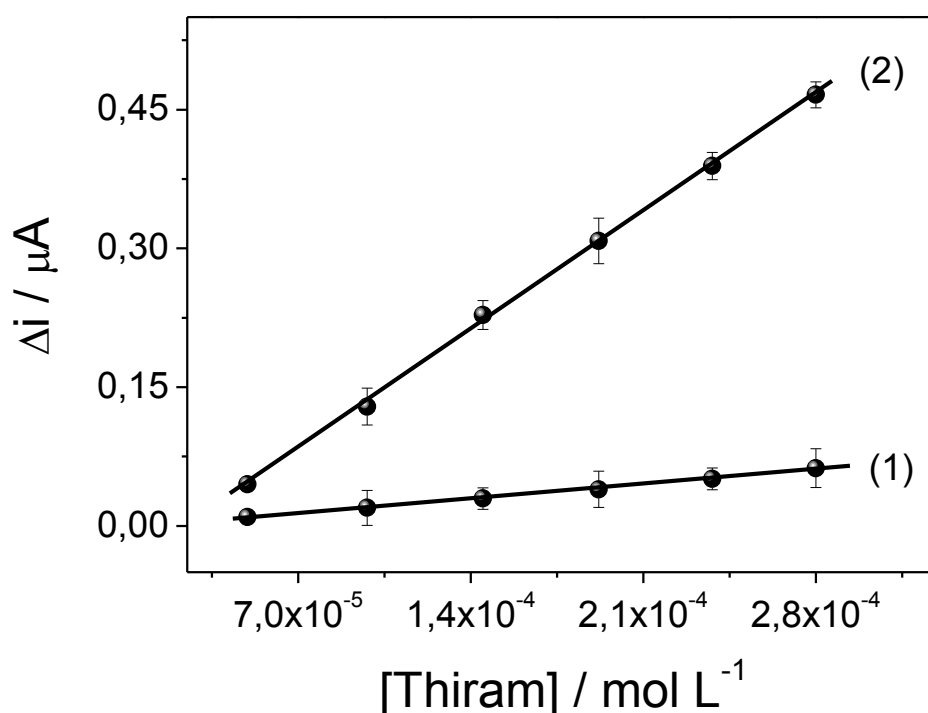
Figura 74 - Perfil amperométrico do sensor nas condições otimizadas, obtido para adições sucessivas de $4,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de thiram.



A Figura 75 apresenta a curva analítica do eletrodo impresso sem MWCNT (1) e o sensor impresso modificado com MWCNT-COOH (2). Quando comparadas às sensibilidades visualizou-se que o sensor modificado com MWCNT-COOH

apresentou sensibilidade de $1831 \mu\text{A L mol}^{-1}$, enquanto que o sensor sem MWCNT apresentou sensibilidade de $226 \mu\text{A L mol}^{-1}$. Isto equivale a um ganho de sensibilidade de 8 vezes. A curva analítica do sensor impresso modificado com MWCNT-COOH apresentou uma resposta linear para thiram entre $4,9 \times 10^{-5}$ e $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, um limite de detecção $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.¹²⁴

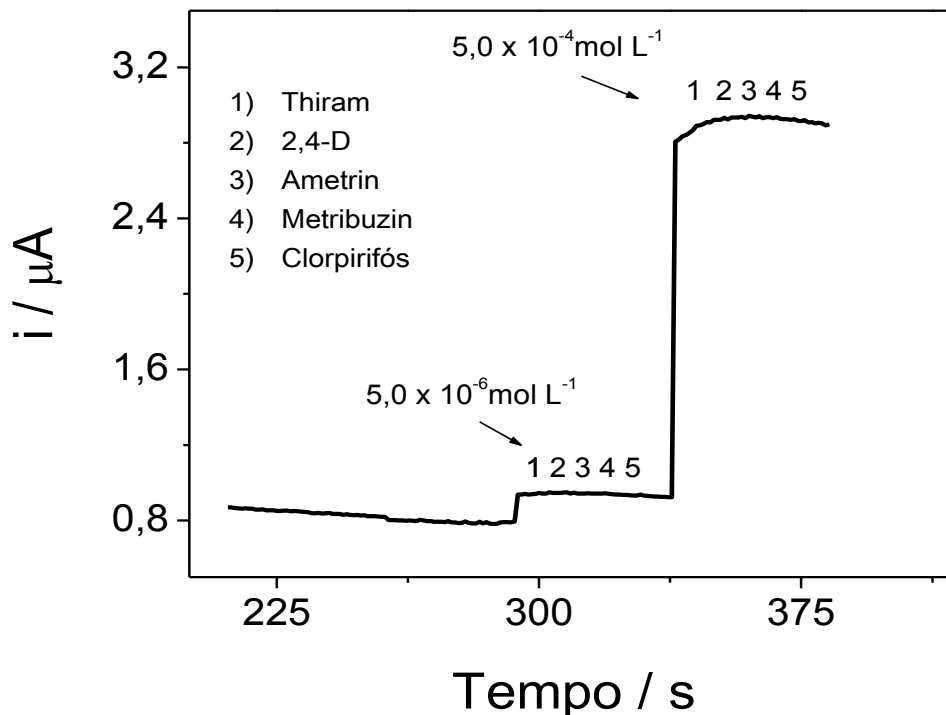
Figura 75 - Curva analítica do eletrodo impresso não modificado (1) e o modificado com MWCNT (2).



4.5.3 Estudo de Seletividade

No estudo de seletividade foram avaliados 5 agrotóxicos (carbofurano, 2,4-D, ametrin, metribuzin e clorpirifós), usando a amperometria em potencial fixo de 800 mV vs Ag/AgCl. Foram usadas nesse estudo duas concentrações diferentes ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e observou-se que somente o thiram apresentava resposta eletroquímica, demonstrando assim seu caráter seletivo, frente a esses agrotóxicos estudados (Figura 76).

Figura 76 - Estudo de seletividade de thiram em amperometria usando dois níveis de concentração em potencial de 800 mV. Medidas realizadas em tampão fosfato e acetonitrila (4:1 v/v) pH 8.



4.5.4 Análise de solo

As análises de solo foram realizadas em triplicata e os resultados encontrados na recuperação de thiram em amostras de solo sob várias profundidades quando comparados ao sinal eletroquímico do thiram em fosfato pH 8, observou-se valores de concentração bem próximos a concentração adicionada, evidenciando que nesses meios analisados praticamente não ocorre efeito de matriz (Tabela 25). Sendo assim, o sensor proposto pode ser usado como método um alternativo para determinação de thiram.

Tabela 25 - Dados obtidos na recuperação de thiram em amostras de solo

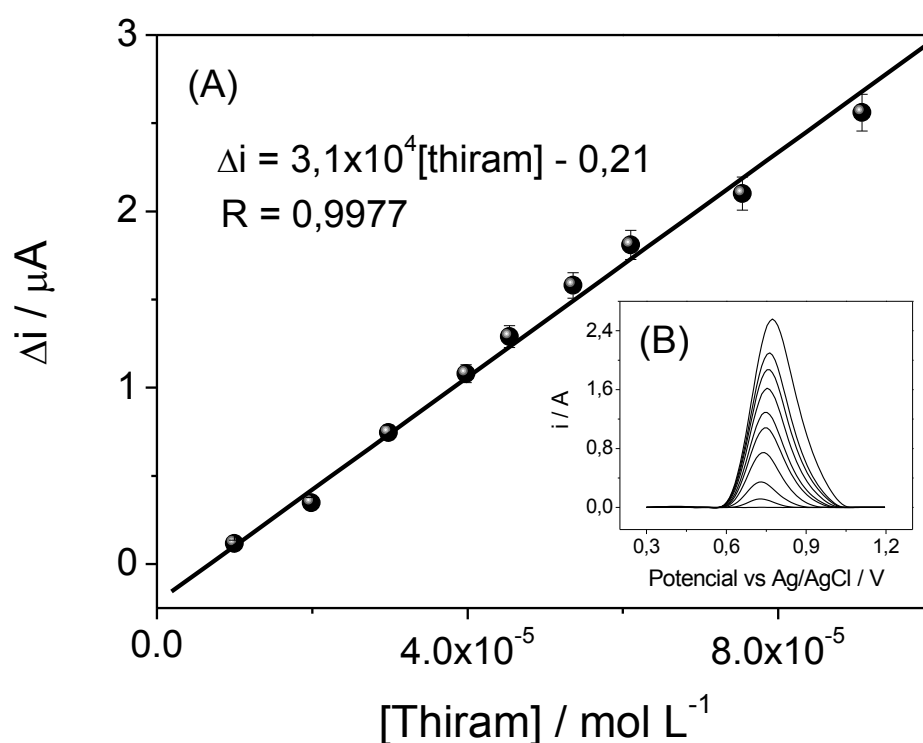
Amostras de solo (profundidade / cm)	[Thiram] / mol L ⁻¹		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado (RSD)	
Solo (0-10)	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$ (4,4)	101
Solo (10-20)	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-4}$ (2,9)	102
Solo (20-40)	$1,00 \times 10^{-4}$	$0,95 \times 10^{-4}$ (2,8)	95

n = 3

4.5.5 Estudo da resposta eletroquímica de thiram em voltametria de onda quadrada

O eletrodo impresso modificado com MWCNT-COOH foi avaliado em voltametria de onda quadrada na tentativa de quantificar o thiram em concentrações mais baixas, quando comparado à determinação amperométrica. Na Figura 77, que mostra a curva analítica do sensor, observa-se uma faixa linear de resposta entre $9,9 \times 10^{-6} - 9,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com uma sensibilidade de $3,1 \times 10^4 (\pm 10^3) \mu\text{A L mol}^{-1}$ e limite de detecção de $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.¹²⁴

Figura 77 – Curva analítica de thiram em diferentes concentrações (A) e seu respectivo VOQ (B). Medidas realizadas empregando $f = 10 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).



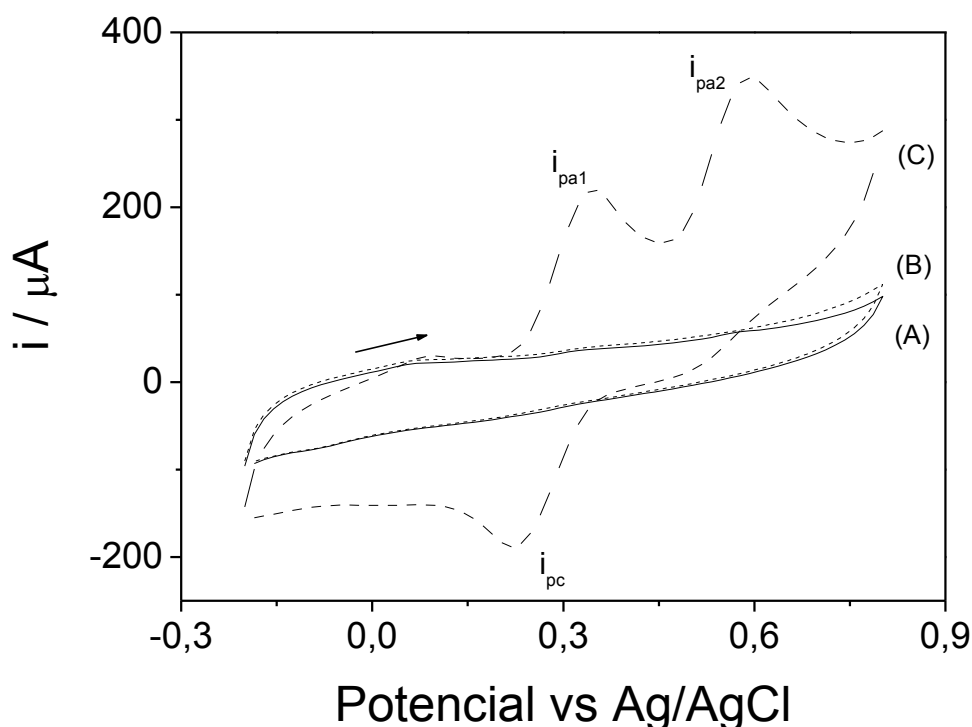
Pode-se observar que a utilização do sensor impresso em VOQ permitiu obter maior sensibilidade, com limites de detecção e quantificação menores dos que obtidos em amperometria.

4.6 DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE DICLOFENACO

4.6.1 Caracterização eletroquímica de diclofenaco em eletrodo de carbono vítreo

O comportamento eletroquímico do sensor modificado com 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29*H*,31*H*-ftalocianina de cobre para detecção de diclofenaco foi realizado em voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -0,2 a 0,8 V. A Figura 78 apresenta um perfil voltamétrico para eletrodo não modificado, na ausência (A) e presença de diclofenaco (B). No voltamograma (C) é apresentada a resposta eletroquímica do sensor biomimético na presença de diclofenaco.

Figura 78 - Caracterização eletroquímica de diclofenaco em eletrodo de carbono vítreo modificado com 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29*H*,31*H*-ftalocianina de cobre (II). Condições de análise: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5), $\nu = 50\text{mVs}^{-1}$, [Diclofenaco] = 10⁻³ mol L⁻¹.



A voltametria cíclica do sensor biomimético modificado com MWCNT-COOH exibe uma oxidação anódica irreversível do diclofenaco no potencial de 600 mV. A

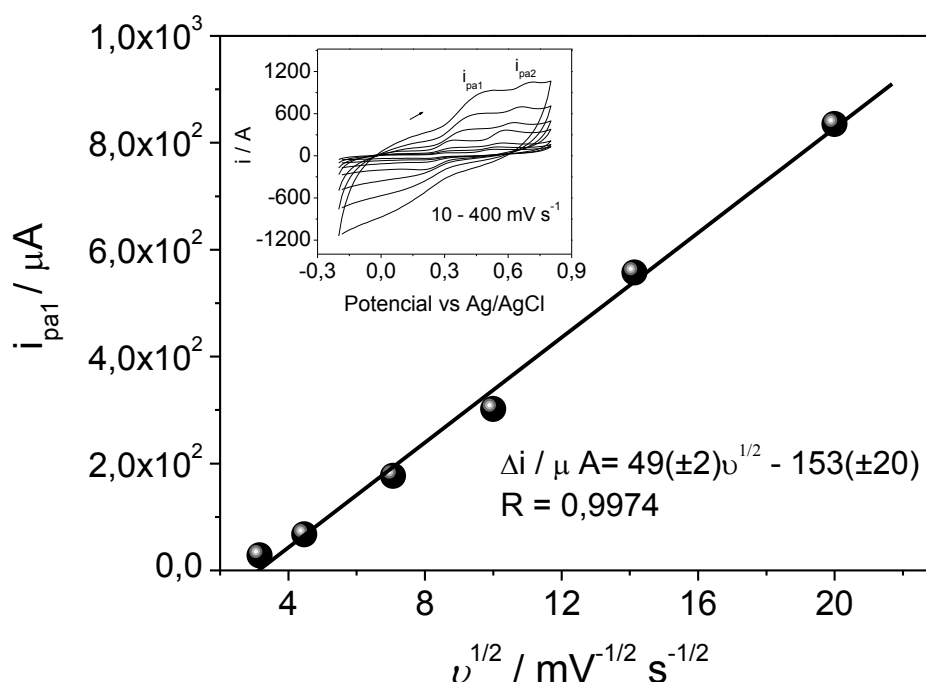
varredura foi iniciada no sentido positivo (-0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat})). Quando a varredura reversa ocorreu, foi observado um pico catódico em 220 mV e um pico anódico em 320 mV caracterizando um sistema reversível. A explicação relativa destes picos pode ser considerado como um resultado da forte adsorção dos produtos da reação de diclofenaco sobre a superfície do eletrodo, que foi fortemente favorecida com o uso de MWCNT.¹⁴⁷

Estes picos são bem visualizados quando comparado com o sinal eletroquímico do eletrólito. O potencial escolhido para análise do diclofenaco foi 320 mV vs Ag/AgCl (KCl_{Sat}) por apresentar maior reprodutibilidade, estabilidade e sensibilidade.

4.6.2 Estudo da velocidade de varredura

A Figura 79 mostra o estudo da influência da velocidade de varredura em 0,1 mol L⁻¹ fosfato pH 7,5, utilizando o sensor biomimético na presença de diclofenaco. Pode-se observar que as correntes de pico (anódica e catódica) aumentavam conforme se aumenta a velocidade de varredura (10 – 400 mVs⁻¹).

Figura 79 - Estudo de velocidade de varredura com o sensor proposto a partir da voltametria cíclica, (gráfico inserido), Corrente de pico anódica (Δi) vs $\nu^{1/2}$ do sensor biomimético. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de diclofenaco.



Foi visualizado um deslocamento de potencial dos picos (i_{pa1} e i_{pa2}) o qual diminuiu a reversibilidade do sistema que foi proporcionada pelo uso do modificador presente na superfície do eletrodo. Pode-se observar que o aumento da velocidade de varredura provoca aumento da corrente faradaica, mas também faz aumentar a corrente capacitiva. Com isso, as análises do diclofenaco são melhores em potenciais de varredura mais baixos, onde o pico de corrente apresenta-se mais definido, com menor influência da corrente capacitiva.

Na Figura 79 (inserido) é observada a dependência linear entre a corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na faixa entre 10 e 400 mV s^{-1} , indicando que a oxidação do diclofenaco na superfície do sensor biomimético seja controlada por difusão.

A área eletroativa de eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado foi realizada em 0,1 mol L^{-1} de KCl na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de acordo com a Randles -Sevick equation.¹⁴⁶

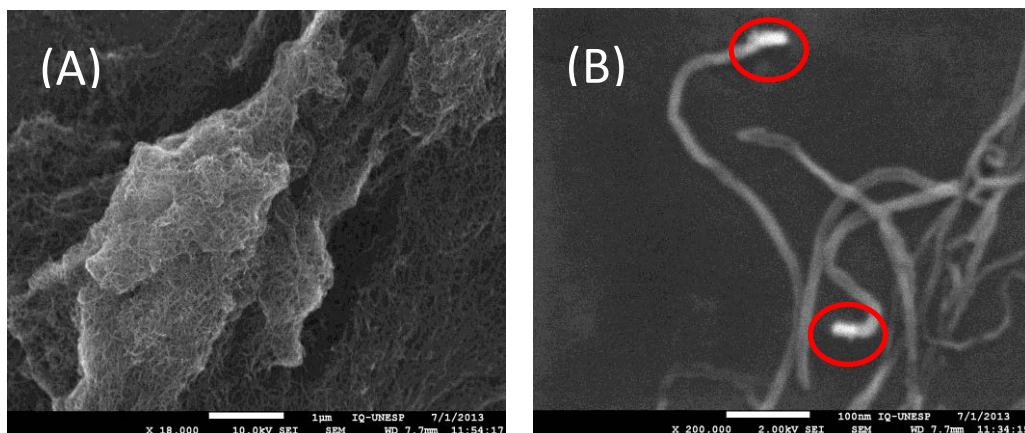
$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 9}$$

Onde: C_s é a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução, D é o coeficiente de difusão ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e A é a área electroativa (cm^2).

Os valores obtidos para a area eletroativa do ECV modificado e ECV não modificado foram de 0,9 cm^2 e 0,3 cm^2 , respectivamente. Pode ser visualizado que a modificação da superfície de eléctrodo com MWCNT-COOH promoveu um aumento de três vezes na área quando comparado com o eletrodo não modificado.

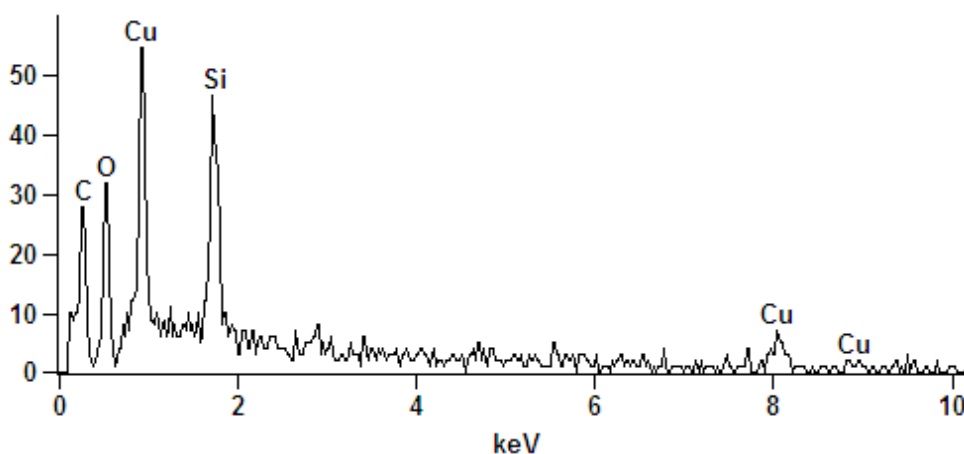
A análise da morfologia da superfície do sensor biomimético modificado com MWCNT-COOH foi registrado usando um microscópio eletrônico de varredura, modelo (JEOL JSM 7500F). A Figura 80A mostra uma imagem MEV, 29H, 31H-ftalocianina, 1,4,8,11,15,18,22,25 octabutoxi cobre (II) e MWCNT-COOH e a Figura 80B mostra a funcionalização de nanotubos com grupo carboxílico que está presente nas extremidades deste material (destacado em vermelho).

Figura 80 - Imagem MEV do MWCNT-COOH e do complexo de cobre (II) sobre a superfície do eléctrodo de carbono vítreo (A) e MWCNT-COOH (B).



Átomos de cobre (Cu), que constituem a molécula complexa foram observados na análise de EDX (energia dispersiva X-RAY). O C e O pertencem ao MWCNT-COOH e Si pertence ao substrato (Figura 81).

Figura 81 – Espectro EDS do complexo de cobre e MWCNT-COOH.

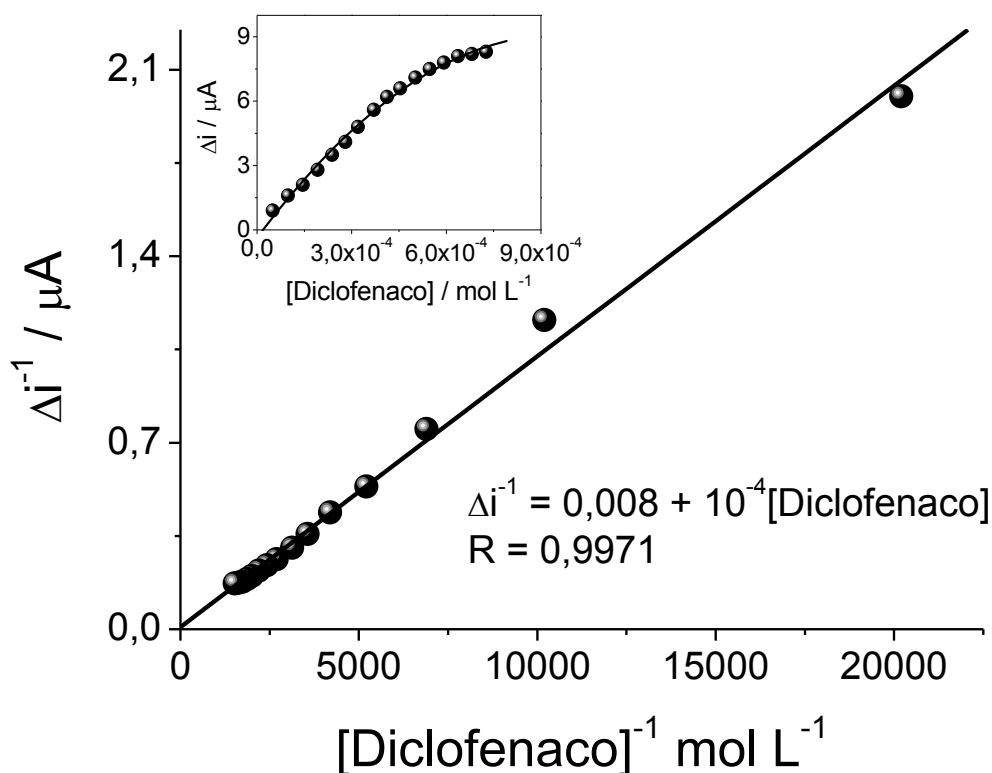


4.6.3 Verificação do caráter biomimético

O caráter biomimético do sensor proposto foi avaliado considerando que este sensor deveria apresentar características similares à de um biossensor enzimático, desempenhando a função biomimética de uma enzima P450. Através de um

amperograma que se baseia em um gráfico de corrente vs tempo, foi obtido inicialmente um sinal de corrente que aumentou linearmente conforme o aumento da concentração do substrato (diclofenaco). O sinal de corrente alcançou um valor máximo, obtendo-se assim um perfil hiperbólico, que é característico de sistemas enzimáticos. Através do perfil hiperbólico obtido, o gráfico de *Lineweaver-Burk* (Figura 82) pode-se determinar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}).¹²⁵⁻¹²⁸ O valor de $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ indica o grau de afinidade entre o catalisador (complexo de cobre) e o analito. Este valor (K_{MM}^{app}) é mais elevado quando comparado com o K_m da enzima P450 (CYP 2D6), o qual foi de $4,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Estes valores indicam a afinidade da enzima com diclofenaco é maior em relação à afinidade do complexo biomimético e diclofenaco. Deve-se ressaltar que mesmo com essa comparação com outros trabalhos, o modificador utilizado propiciou a detecção sensível e seletiva de diclofenaco em baixo potencial redox.

Figura 82 - Perfil hiperbólico e o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-burk obtido a partir do sensor à base de 29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi de cobrel (II). Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $[\text{diclofenaco}] = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



4.6.4 Estudo da resposta eletroquímica de diclofenaco em voltametria de onda quadrada

Visando obter melhor desempenho analítico, os parâmetros da VOQ (frequência, amplitude e o incremento de potencial) foram otimizados, levando em conta o maior valor de corrente de pico anódico em potencial 320 mV vs Ag/AgCl (KCl_{Sat}). A otimização dos parâmetros de VOQ podem ser encontrados Tabela 26.

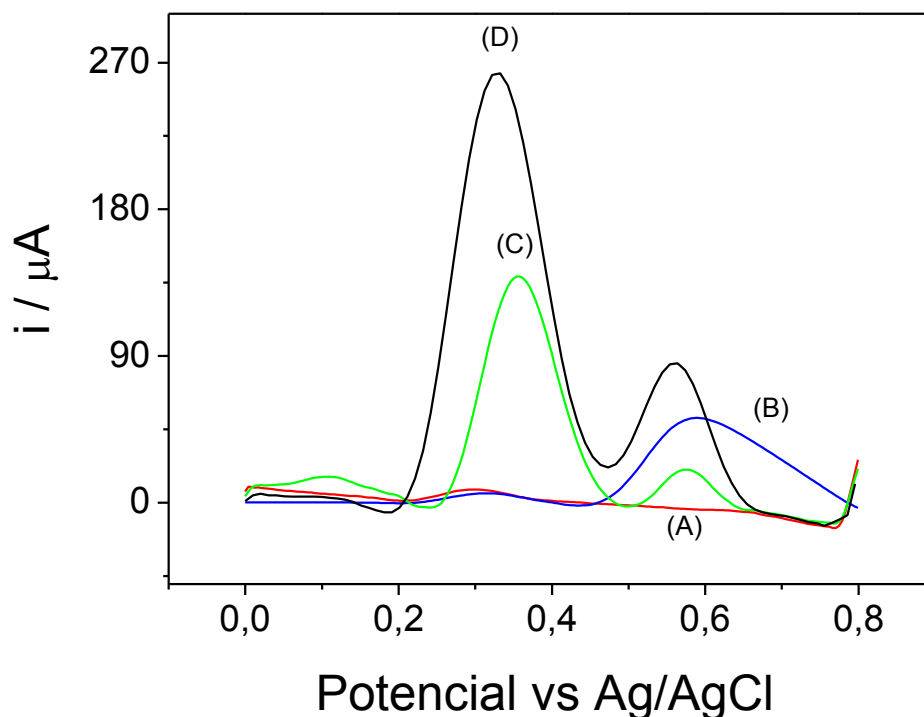
Tabela 26 - Parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada (SVW)

Frequência (mV)	i_{pa} (μA)	Amplitude (mV)	i_{pa} (μA)	Incremento (mV)	i_{pa} (μA)
10	212*	25	42	2	184
20	137	50	75	4	220*
40	77	100	132*	6	200
60	16	150	200	10	180

*Valor otimizado

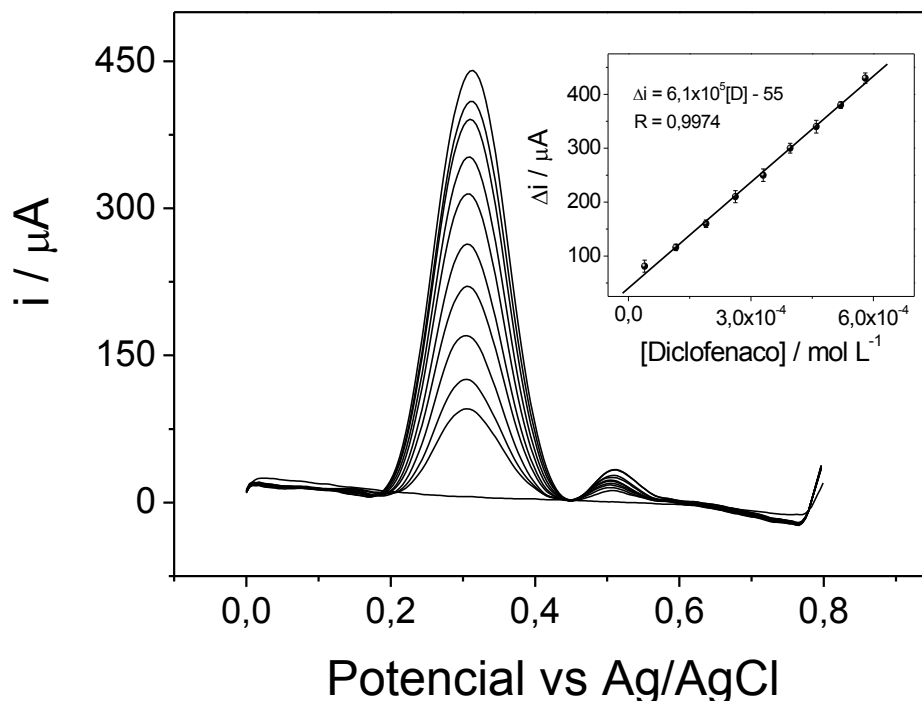
Para verificar o perfil de respostas do eletrodo modificado e não modificado, um estudo em voltametria de onda quadrada foi realizado. Na Figura 83, observa-se a corrente de pico anódica do diclofenaco no eletrodo modificado com MWCNT-COOH em potencial 340 mV, sendo a resposta com o eletrodo modificado com MWCNT-COOH e 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina de cobre (II) em potencial 0,32 V. A modificação do eletrodo promoveu uma eletrocatalise, diminuindo o potencial redox e aumentando a resposta eletroquímica, contribuindo portanto com a melhora da seletividade e sensibilidade do sensor biomimético proposto.

Figura 83 - Estudo da resposta eletroquímica em voltametria de onda quadrada (VOQ) do eletrodo não modificado, na ausência (A) e na presença (B) de diclofenaco, o sensor modificado com MWCNT-COOH (C) e do sensor biomimético com MWCNT-COOH na presença de diclofenaco (D). Condições análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 150 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) [diclofenaco] = $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) foi empregada na ordem de obter melhores limites de detecção e quantificação. A Figura 84 mostra a VOQ obtida com o sensor biomimético para diferentes concentrações de diclofenaco. Usando VOQ, o sensor mostrou uma resposta linear para concentrações de diclofenaco entre $4,0 \times 10^{-5}$ e $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e uma sensibilidade de $6,1 \times 10^5 (\pm 1,5 \times 10^4) \mu\text{AL mol}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram de $1,3 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.¹²⁴

Figura 84 - Perfil de resposta em VOQ para o diclofenaco em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) (A) e a curva analítica nas condições otimizadas (B). Condições análise: f = 10 Hz, a = 100 mV, ΔE= 4 mV.



Na Tabela 27 mostra diferentes tipos de sensores eletroquímicos que tem sido empregado para determinação de diclofenaco. Comparando a faixa de resposta obtida com este sensor proposto com trabalhos reportados na literatura pode-se verificar uma faixa de resposta muito similar. As vantagens deste sensor provém no seu baixo potencial de análise o qual confere maior seletividade, alta reprodutibilidade e estabilidade, a realização de inúmeras análises e a possibilidade de análise em tempo real através de análises no sistema FIA.

Tabela 27 - Sensores eletroquímicos usados para detecção de diclofenaco.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

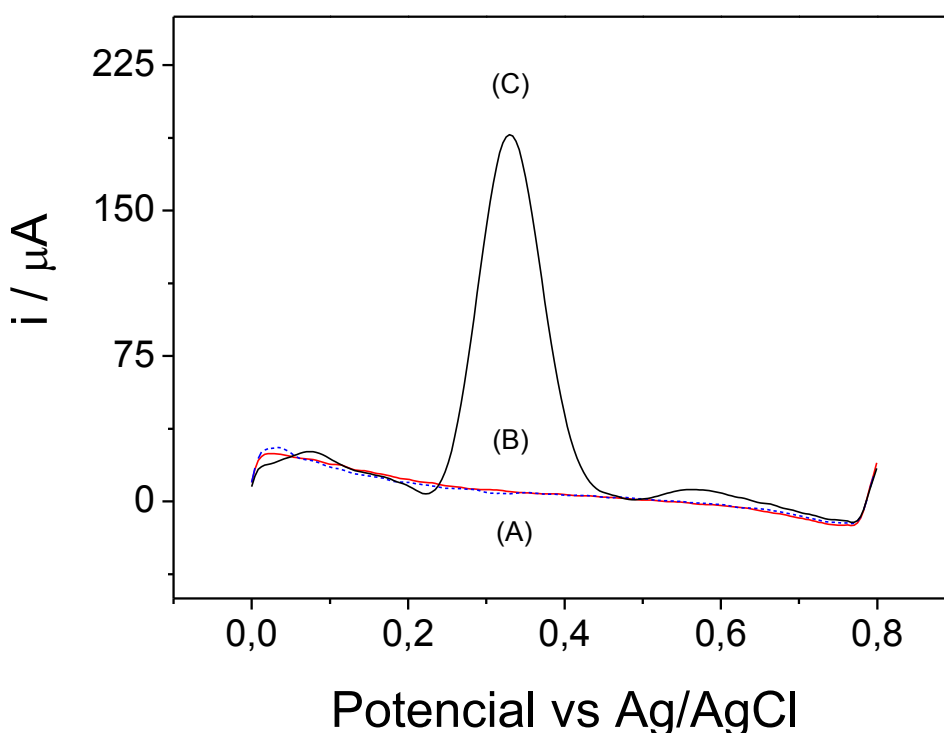
Eletrodo		Faixa de resposta	Limite de detecção	i_p / mV
MIP		$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$	--	--
aptamero		$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-7}$	--
LI		$5,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	650
MWCNT		$5,0 \times 10^{-6} - 6,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-8}$	400
MWCNT/CuPc	Batelada	$4,0 \times 10^{-5} - 6,7 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-5}$	320
	FIA	$5,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-5}$	500

MIP: Polímero molecularmente impresso; LI: (líquido iônico); MWCNT: nanotubos de carbono de parede múltipla; CuPc: 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina cobre (II).

4.6.5 Estudo de seletividade

No estudo de seletividade vários fármacos foram analisados em voltametria de onda quadrada (VOQ) e no intervalo de potencial estudado, somente o diclofenaco apresentou um pico de corrente anódico (i_{pa}) em potencial de 320 mV. Os fármacos estudados foram: secnidazol, piroxicam, ranitidina, fluconazol galena, efedrina cloridrato. Estes resultados mostram claramente que o sensor proposto, é altamente sensível e seletivo, tal como esperado para um sensor biomimético (Figura 85).

Figura 85 - Estudo de seletividade realizado em voltametria de onda quadrada (VOQ), (A) eletrólitos, (B) secnidazol, piroxicam, ranitidina, ciplofloxacina, lidocaína e tetraciclina, (C) [diclofenaco]. Todos os analitos foram adicionados na concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Condições análise: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$.



4.6.6 Aplicação do sensor biomimético em amostras de soro biológico

O sensor amperométrico proposto foi avaliado utilizando análises de amostras enriquecidas de soro biológico. As medidas foram analisadas por voltametria de

onda quadrada (VOQ). Os resultados obtidos foram próximo ao valor de referência, o que indica que o sistema de análise não mostrou efeito de matriz (Tabela 28). O método utilizado para a determinação do diclofenaco nas matrizes analisadas foi à adição de um padrão. Nestas análises é adicionadas alíquotas da solução padrão na cela electroquímica, e a corrente obtida em VOQ é extrapolado na curva analítica, obtendo-se a respectiva concentração de diclofenaco na amostra (Figura 86).

Figura 86 - Resultado obtido em experimentos de recuperação realizados para a amostra de soro biológico n ° 1 utilizando método de adição de padrão.

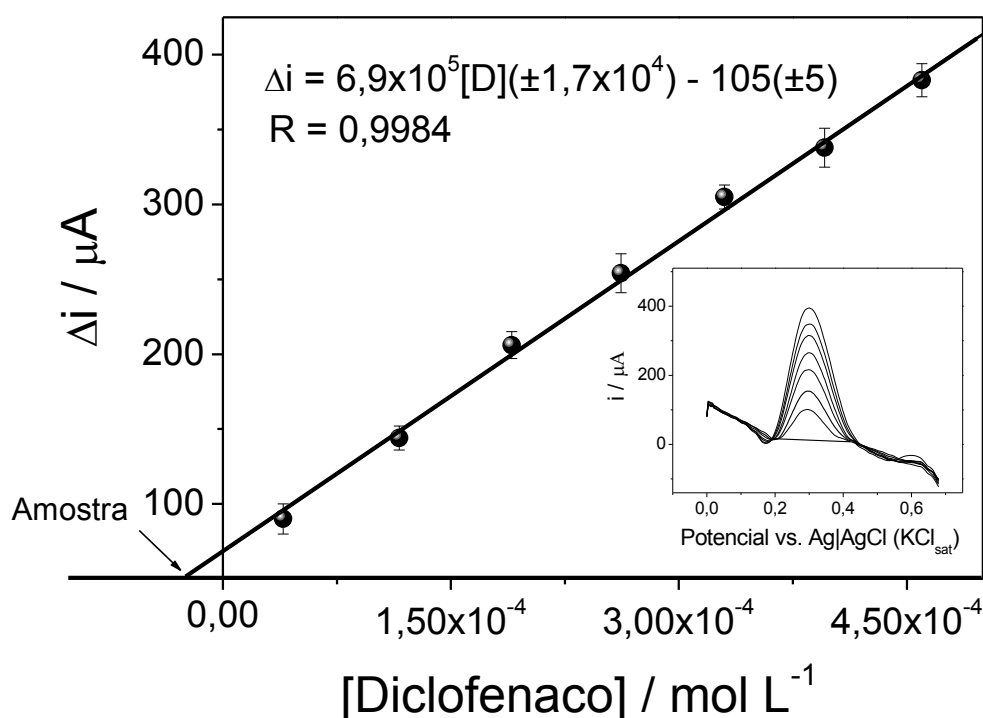


Tabela 28 - Resultados obtidos em análises de amostras de soro biológico em sistema batelada.

Amostras de soro biológico	[Diclofenaco] / mol L ⁻¹			Erro % (Sensor/CLAE)
	Adicionado	Medido (método comparativo - CLAE)	Medido (sensor proposto)	
1	1,50 x 10 ⁻⁴	1,50x10 ⁻⁴ (±2,0x10 ⁻⁶)	1,51x10 ⁻⁴ (±2,5x10 ⁻⁵)	1,0
2	1,50 x 10 ⁻⁴	1,52x10 ⁻⁴ (±2,2x10 ⁻⁶)	1,44x10 ⁻⁴ (±1,9x10 ⁻⁶)	0,9

4.6.7 ANÁLISE DO SENSOR BIOMIMÉTICO EM SISTEMA FIA

O pH e o potencial aplicado à célula eletroquímica wall-jet foi variado, e alta sensibilidade foi obtida em pH 7,5 e potencial de 500 mV vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Este potencial foi usado em medidas em FIA (Figura 87).

Figura 87 - Influência dos parâmetros do sistema FIA: (a) Efeito do pH sobre a resposta de diclofenaco utilizando uma taxa de fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, (b) Efeito de potencial sobre a resposta do diclofenaco, usando uma V_i de $100 \mu\text{L}$. Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $E_{\text{apl}} = 500 \text{ mV vs. Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$.

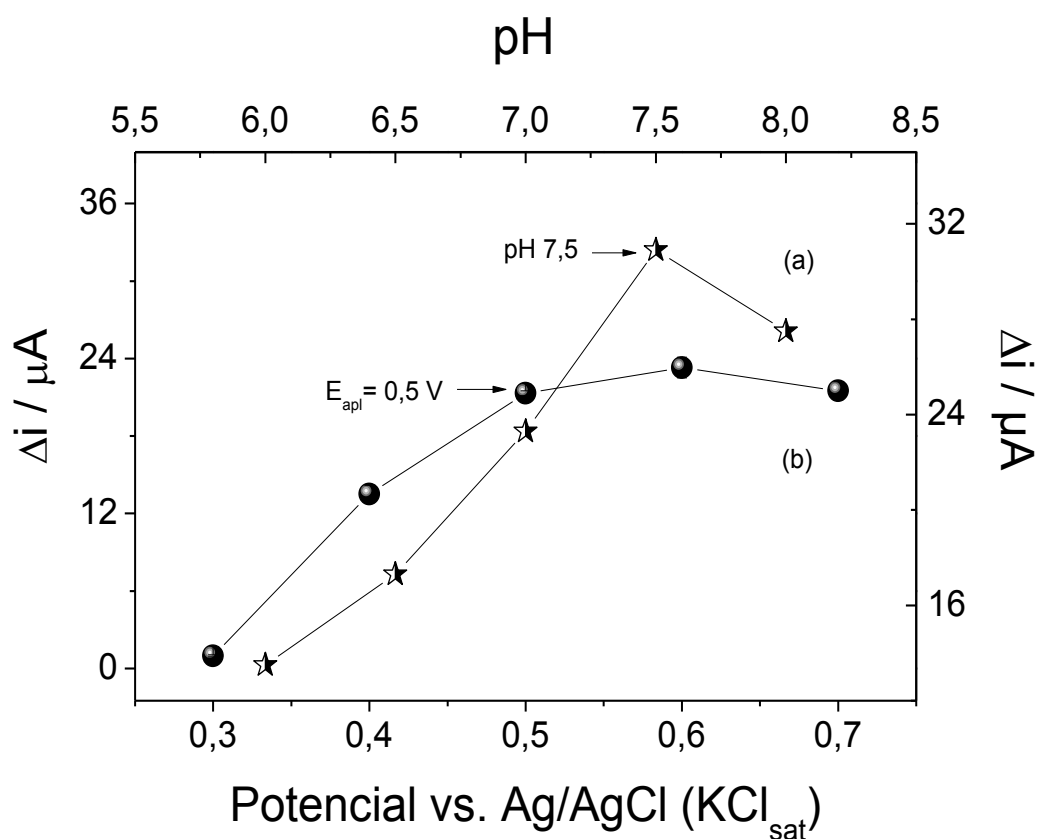
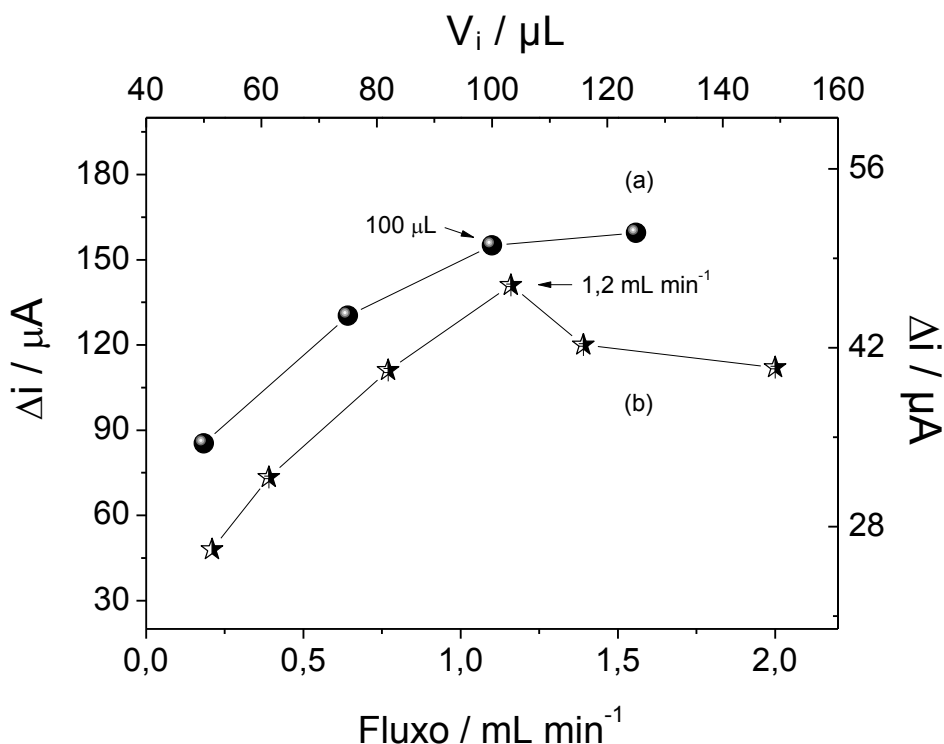


Figura 88 mostra a otimização do fluxo e volume de amostra injetada. As taxas de fluxo testadas foram entre $0,2$ e $2,3 \text{ mL min}^{-1}$, sendo escolhido o fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de amostra injetado (V_i) foi investigado através de volumes da alça de 50 , 75 , 100 e $125 \mu\text{L}$. O sinal aumenta com o aumento V_i , atingindo a saturação em $100 \mu\text{L}$. O volume de $100 \mu\text{L}$ foi escolhido, uma vez que este proporcionou um bom sinal de corrente sem afetar a frequência de amostragem.

Figura 88 - Influência dos parâmetros do sistema proposto FIA: (a) Efeito do volume de amostra injectada (V_i) na resposta ao diclofenaco utilizando uma taxa de fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, (b) Efeito da vazão na resposta ao diclofenaco, usando uma V_i de $100 \mu\text{L}$. Condições de análise: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), $E_{\text{apl}} = 500 \text{ mV vs. Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$.



4.6.8 Características analíticas do sistema FIA

Uma vez que os parâmetros FIA foram otimizados (Tabela 29), uma curva de calibração foi plotada usando os dados apresentados da Figura 89A. Pode ser visto que o sensor não exibiram quaisquer efeitos de memória.

Tabela 29 - Parâmetros otimizados e características analíticas do sensor biomimético no sistema FIA.

Parametro	Valor
Potencial vs. Ag/AgCl (KCl _{Sat})	0,5
Fluxo (mL min ⁻¹)	1,2
V _i (μL)	100
Faixa linear (mol L ⁻¹)	5,0 x 10 ⁻⁵ – 5,0 x 10 ⁻³
Sensibilidade (μA L μmol ⁻¹)	1,6 x 10 ⁴ ± 3,0 x 10 ²
Limite de quantificação (μmol L ⁻¹)	48,0
Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	16,6
Medidas de repetibilidade (RSD, n = 14); [Diclofenaco] = 10 ⁻³ mol L ⁻¹	3 %
Frequência analítica	45 amostras h ⁻¹

As curvas analíticas (Figura 89B) mostraram faixa de resposta linear tanto no sentido crescente e decrescente de concentrações de diclofenaco, como descrito pelas equações 1 e 2, respectivamente:

$$\Delta i / \mu A = 1,3(\pm 0,7) + 1,6 \times 10^4 (\pm 3,0 \times 10^2) [Diclofenaco] / mol L^{-1} \quad (1)$$

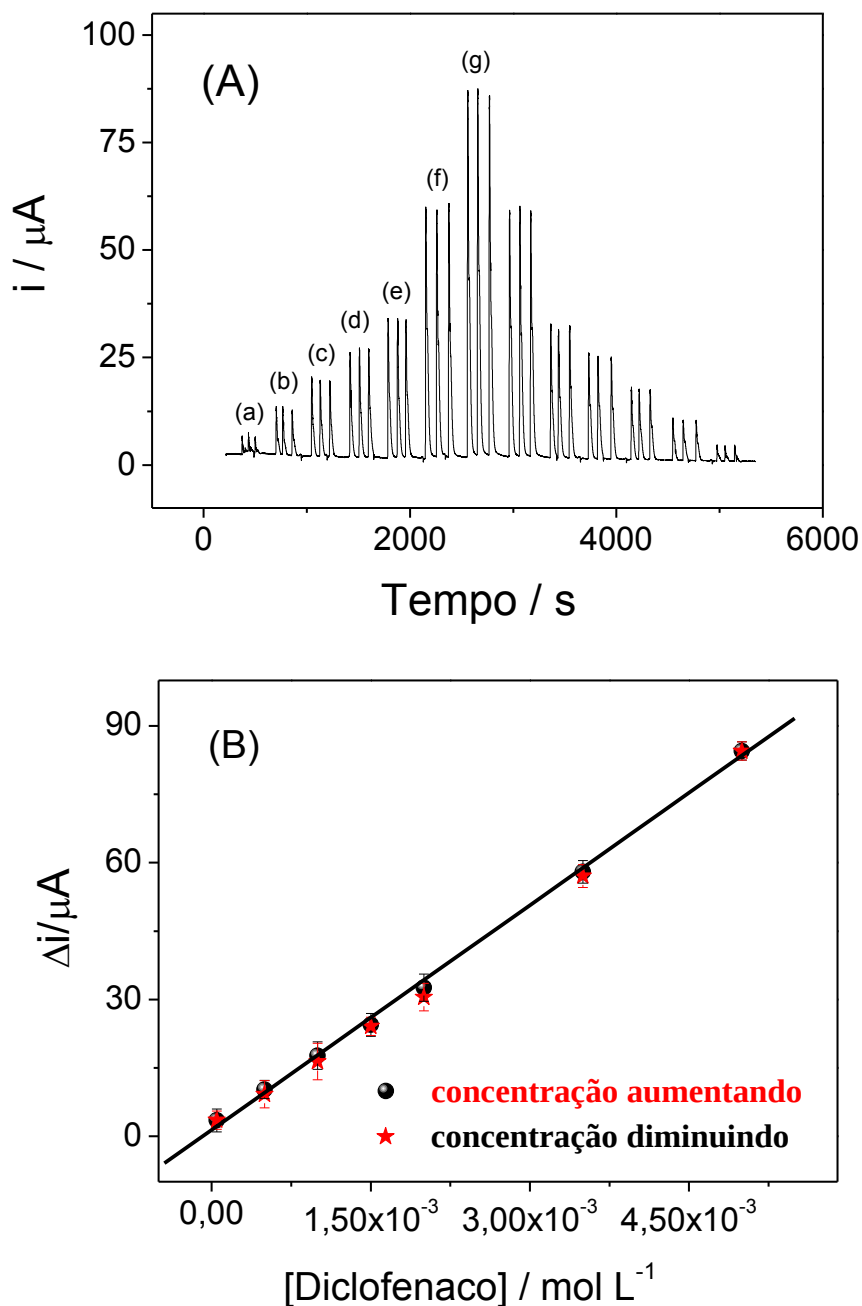
$$R = 0,9991 \text{ (n = 7);}$$

$$\Delta i / \mu A = (0,4 \pm 1,0 \times 10^{-2}) + 1,6 \times 10^4 (\pm 4,5 \times 10^2) [Diclofenaco] / mol L^{-1} \quad (2)$$

$$R = 0,9981 \text{ (n = 7).}$$

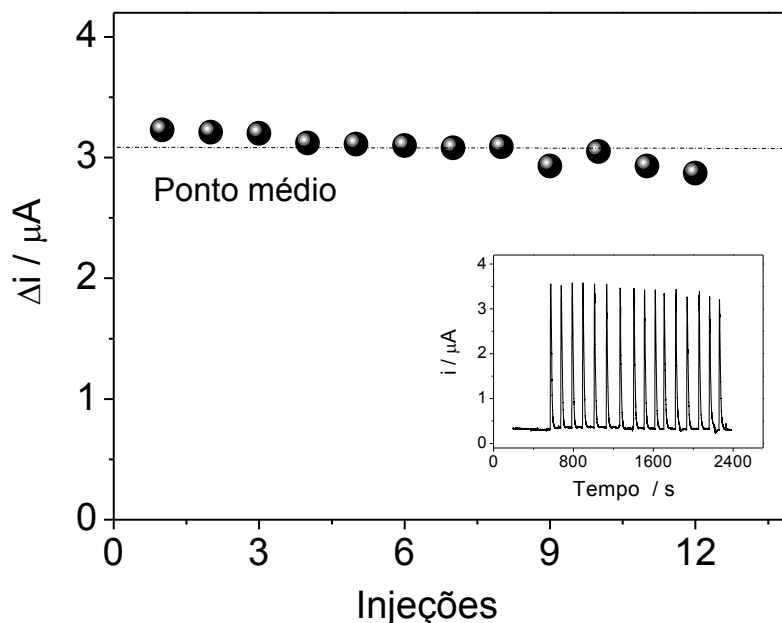
Os limites de detecção e quantificação encontrados a partir 7 concentrações em triplicata de diclofenaco foram de 1,7 x 10⁻⁵ e 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectivamente.¹²⁴

Figura 89 - Sinal FIA obtido com o sensor biomimético para diferentes concentrações de diclofenaco (mol L^{-1}): (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $5,0 \times 10^{-4}$; (c) $1,0 \times 10^{-3}$; (d) $1,5 \times 10^{-3}$; (e) $2,0 \times 10^{-3}$; (f) $3,5 \times 10^{-3}$; (g) $5,0 \times 10^{-3}$ (A). Curva analítica típica no sentido crescente e decrescente (B).



A repetibilidade do sensor foi investigada usando injeções sucessivas de solução de diclofenaco na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Baseando-se nas medidas realizadas foi encontrado um desvio padrão relativo (RSD) de 3,5% ($n = 12$) (Figura 90).

Figura 90 - Perfil de repetibilidade em FIA para 12 injeções consecutivas de solução de diclofenaco na concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



4.6.9 Aplicação do sensor de biomimético em formulações farmacêuticas

Aplicação do sensor biomimético em formulações farmacêuticas comerciais foi realizada no sistema FIA. O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação da concentração de diclofenaco nas amostras. Os resultados obtidos foram comparados com o método comparativo (CLAE). A tabela 30 apresenta os resultados obtidos:

Tabela 30 - Resultados obtidos com o sensor proposto e com método comparativo (CLAE) na análise de diclofenaco em formulações farmacêuticas.

Formulações farmacêuticas	Valor obtido ($\text{mg comprimido}^{-1}$)		
	Valor nominal	Método comparativo (CLAE)	Sistema FIA
nº 1	50	49,7(± 0.2)	49,0(± 3.5)
nº 2	100	98,4(± 0.1)	98,0(± 1.0)

Após a avaliação dos resultados, os dois métodos apresentaram resultados similares, demonstrando assim que a metodologia proposta é uma alternativa eficiente e rápida para a determinação de diclofenaco em preparações farmacêuticas.

4.6.10 Sensores eletroquímicos modificado com protoporfirina IX

Com a finalidade de comprovar que o centro metálico dos complexos de porfirinas e ftalocianinas realizam reações redox com os analitos deste trabalho, análises com eletrodo de pasta de carbono e carbono vítreo modificado com protoporfirina IX sem “metal” foram realizadas com as respectivas técnicas eletroquímicas usadas em cada trabalho. A modificação com protoporfirina IX não promoveu a resposta eletroquímica encontrada nos trabalhos desenvolvidos. Sendo assim, pode-se afirmar que o centro metálico dos complexos utilizados é responsável pela atividade eletroquímica quando em contato com uma determinada concentração de analito em um potencial característico.

4.7 DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPs)

4.7.1 Simulação computacional

A simulação computacional foi uma ferramenta de análise muito importante na escolha dos monômeros utilizados para síntese dos polímeros molecularmente impressos. Na avaliação da interação de cada monômero com o template, o critério de avaliação adotado foi à afinidade estrutural e funcional (interação de grupos funcionais do template e do monômero), não sendo analisados parâmetros físico-químicos como a interação a nível molecular ou eletrônico do template e do monômero.

Os gráficos da simulação computacional podem ser interpretados como o resultado da energia liberada na aproximação entre cada monômero e o analito alvo, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, ou seja, na “teoria”, mais seletivo será o polímero resultante. Os monômeros estudados encontram-se listados na Tabela 31.

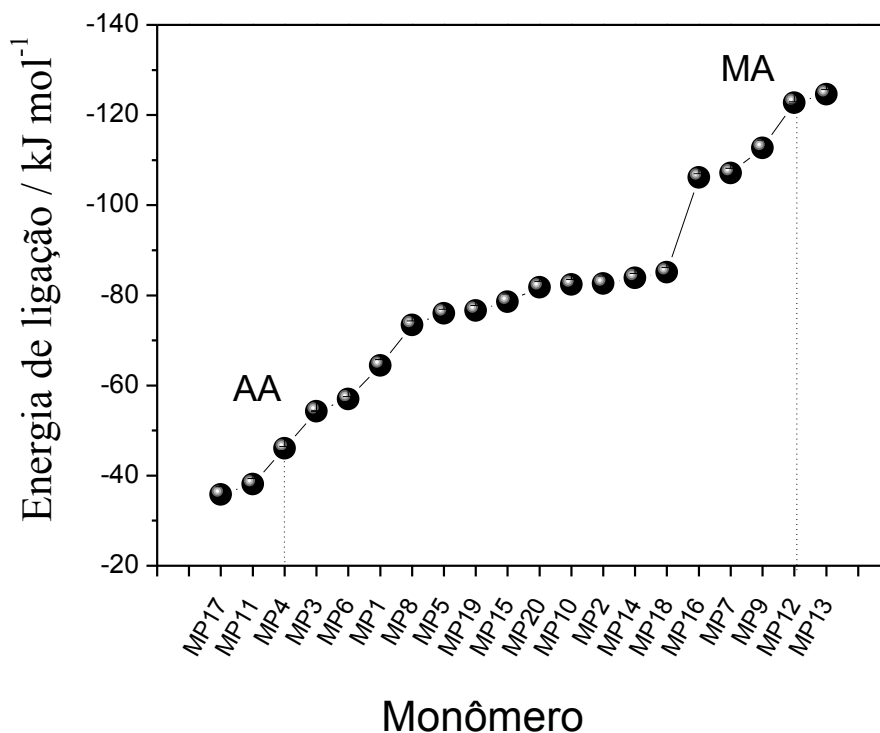
Tabela 31 - Monômeros analisados na simulação computacional.

Sigla	Monômero	
MP1	<i>bis-acrilamida de N,N-metileno</i>	MP11 <i>Ácido metilenosuccínico</i>
MP2	<i>Ácido imidazol-4-acrílico</i>	MP12 <i>Ácido metacrílico</i>
MP3	<i>Etil éster de imidazol-4-acrílico</i>	MP13 <i>3-divinilbenzeno</i>
MP4	<i>Ácido acrílico</i>	MP14 <i>4-divinilbenzeno</i>
MP5	<i>Acrilamida</i>	MP15 <i>Estireno</i>
MP6	<i>Acroleína</i>	MP16 <i>1-vinilimidazol</i>
MP7	<i>Alilamina</i>	MP17 <i>2-vinilpiridina</i>
MP8	<i>Acrilonitrila</i>	MP18 <i>4-vinilpiridina</i>
MP9	<i>Etileno glicol dimetacrilato</i>	MP19 <i>Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico</i>
MP10	<i>2-(cianoetilamino)etilmetacrilato</i>	MP20 <i>2-hidroxietil metacrilato</i>

Na figura 91 é visualizada a afinidade dos 20 monômeros com o template. É possível observar claramente que os melhores monômeros para síntese dos MIPs foram o MP9, MP12 e MP13. Nesse trabalho de doutorado foram escolhidos dois monômeros que foram amplamente utilizados. A escolha baseou-se em um monômero de alta afinidade (ácido metacrílico) e outro com baixa afinidade pelo

template (ácido acrílico). Os monômeros escolhidos apresentam caráter ácido e o template caráter básico através do grupo NH_2 presente na molécula de diuron.

Figura 91 - Resultado da simulação computacional para o herbicida diuron.

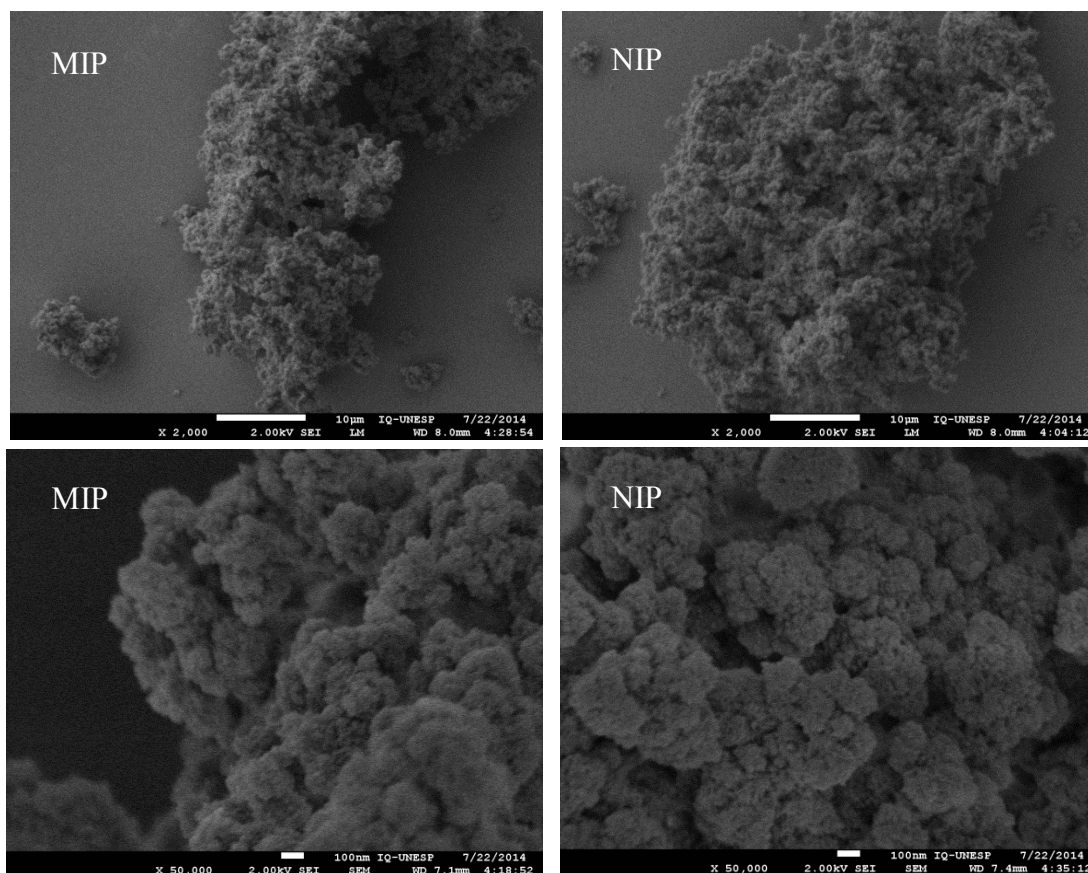


4.7.2 Caracterização dos polímeros molecularmente impressos

4.7.2.1 Medidas de superfície realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Micrográfias das superfícies de MIP e NIPs são mostradas na Figura 92, temos as microscopias do MIP para diuron e seu correspondente NIP, que utilizou ácido metacrílico na síntese dos polímeros. Foi possível visualizar que as micrografias realizadas em magnitudes de 2.000 e 50.000 do MIP e NIP foram muito semelhantes, não podendo nesse caso afirmar nenhuma diferença morfológica significativa.

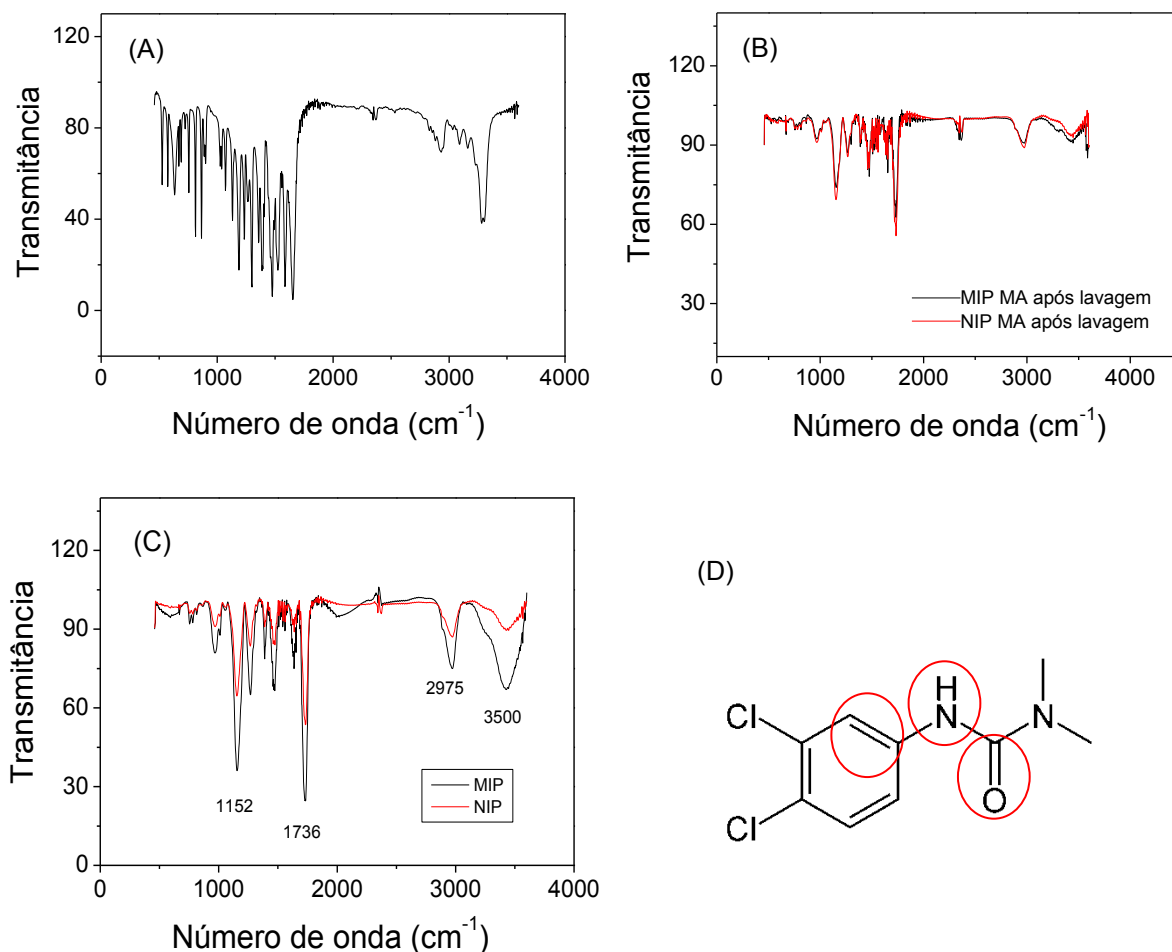
Figura 92- Micrografias eletrônicas de varredura do polímero impresso (MIP) e do polímero não impresso (NIP) preparados com o monômero ácido metacrílico.



4.7.2.2 Espectroscopia do infravermelho (Transformada de Fourier)

Análises dos polímeros com impressão molecular (MIP) e polímero de controle (NIP) foram realizadas em técnica FTIR com a finalidade de avaliar a extração do template no MIP. Na Figura 93 B é visualizado que o FTIR de MIP e NIP é muito similar, demonstrando que MIP e NIP são formados pelos mesmos reagentes. Também foi possível afirmar que todo template foi removido do MIP durante a lavagem no sistema soxhlet, uma vez que os FTIR obtidos foram semelhantes. Figura 93C temos o FTIR que avaliou a religação de MIP e NIP com 50 ppm de diuron após 3 horas de ensaio. Constatou-se que os picos em 1152 (-C=C-), 1736 (-C=O-), 2975 (-CH-) e 3500 (-NH-) se apresentaram maiores para MIP em relação ao NIP.¹³⁰ Esse estudo permitiu demonstrar a eficácia na religação de diuron no MIP, na qual se deve aos sítios de ligação complementares ao diuron.

Figura 93- Imagem em FTIR do template (A), do MIP e NIP após lavagem em sistema soxhlet (B), do MIP e NIP após ensaio de 3 horas na presença do template (C) e estrutura de diuron (D).



4.7.2.3 Método BET (Bunauer-Emmett-Teller)

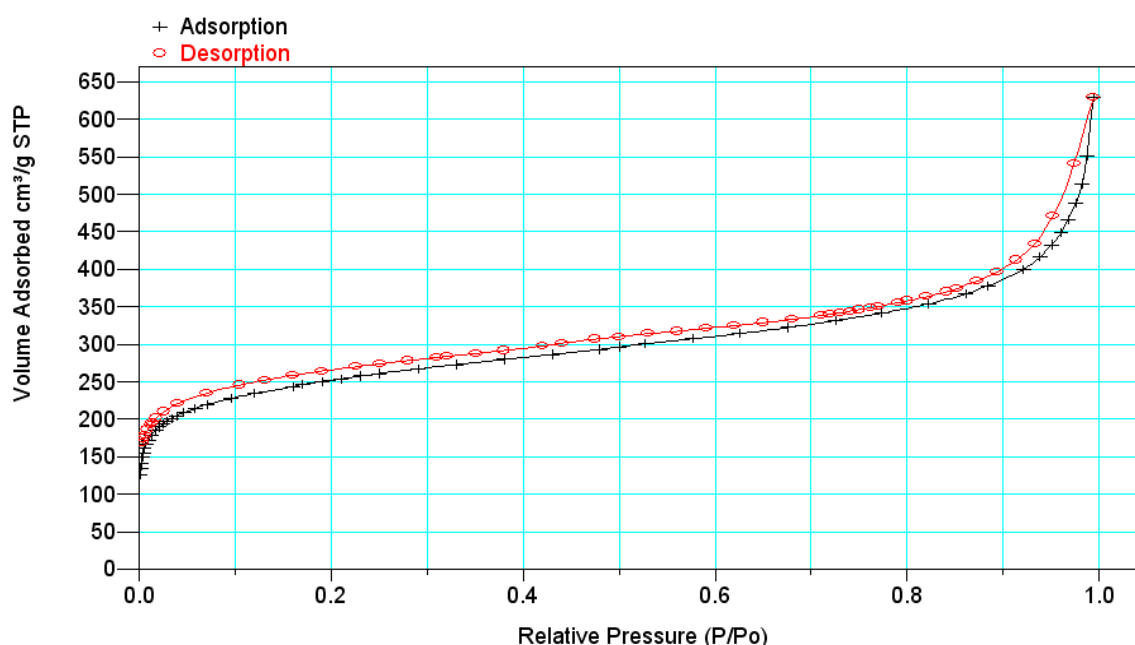
Na Tabela 32, são apresentados os valores de áreas superficiais obtidas pelo método BET. Pode ser observado que o MIP_{MA} e NIP_{MA} que foram sintetizados com TRIM possuem alta área superficial e com valores similares. Quando comparado $\text{MIP}_{\text{MA-TRIM}}$ com MIP e NIP sintetizados com EGDMA pode-se verificar uma diminuição de 26 vezes em área superficial em relação ao $\text{MIP}_{\text{MA-EGDMA}}$ e 31 vezes em relação do $\text{NIP}_{\text{MA-EGDMA}}$. Vale ressaltar que MIPs sintetizados com o agente de ligação cruzada (TRIM) apresentaram maior área superficial e consequentemente maior porosidade que MIPs e NIPs sintetizados com EGDMA. Avaliando a porosidade encontrada para $\text{MIP}_{\text{MA-TRIM}}$ e $\text{NIP}_{\text{MA-TRIM}}$ pode-se afirmar que em estudos

de religação, o MIP apresentou maior adsorção de diuron que NIP, devido a maior porosidade do MIP, que foi de 0,67 cm³ e 0,31 cm³ para NIP. Nesse caso o valor de porosidade encontrado de MIP_{MA-TRIM} foi equivalente à estrutura do template, e o tamanho do poro no NIP_{MA-TRIM} além de irregular apresentou-se incompatível com a estrutura do template. Na Figura 94 é apresentada isoterma BET de MIP_{MA}, onde pode ser verificada a adsorção e dessorção de nitrogênio. Vale ressaltar que nesse estudo a área superficial não foi um critério que garantiu a seletividade. Os parâmetros que contribuíram para justificar os resultados obtidos com o MIP e NIP foram o volume e o diâmetro do poro.^{152,153}

Tabela 32 - Estudo de área superficial e porosidade dos MIPs estudados

Amostras	Polímero	Agente de reticulação	Area superficial-BET (cm ² /g)	Volume do poro (cm ³ /g)	Diâmetro do poro (nm)
1	MIP _{MA}	TRIM	861	0,67	6,3
2	NIP _{MA}		834	0,31	4,3
3	MIP _{AA}		275	0,10	5,2
4	NIP _{AA}		250	0,06	3,7
5	MIP _{MA}	EGDMA	33	0,005	2,0
6	NIP _{MA}		28	0,004	2,0
7	MIP _{AA}		15	0,002	1,9
8	NIP _{AA}		12	0,001	5,5

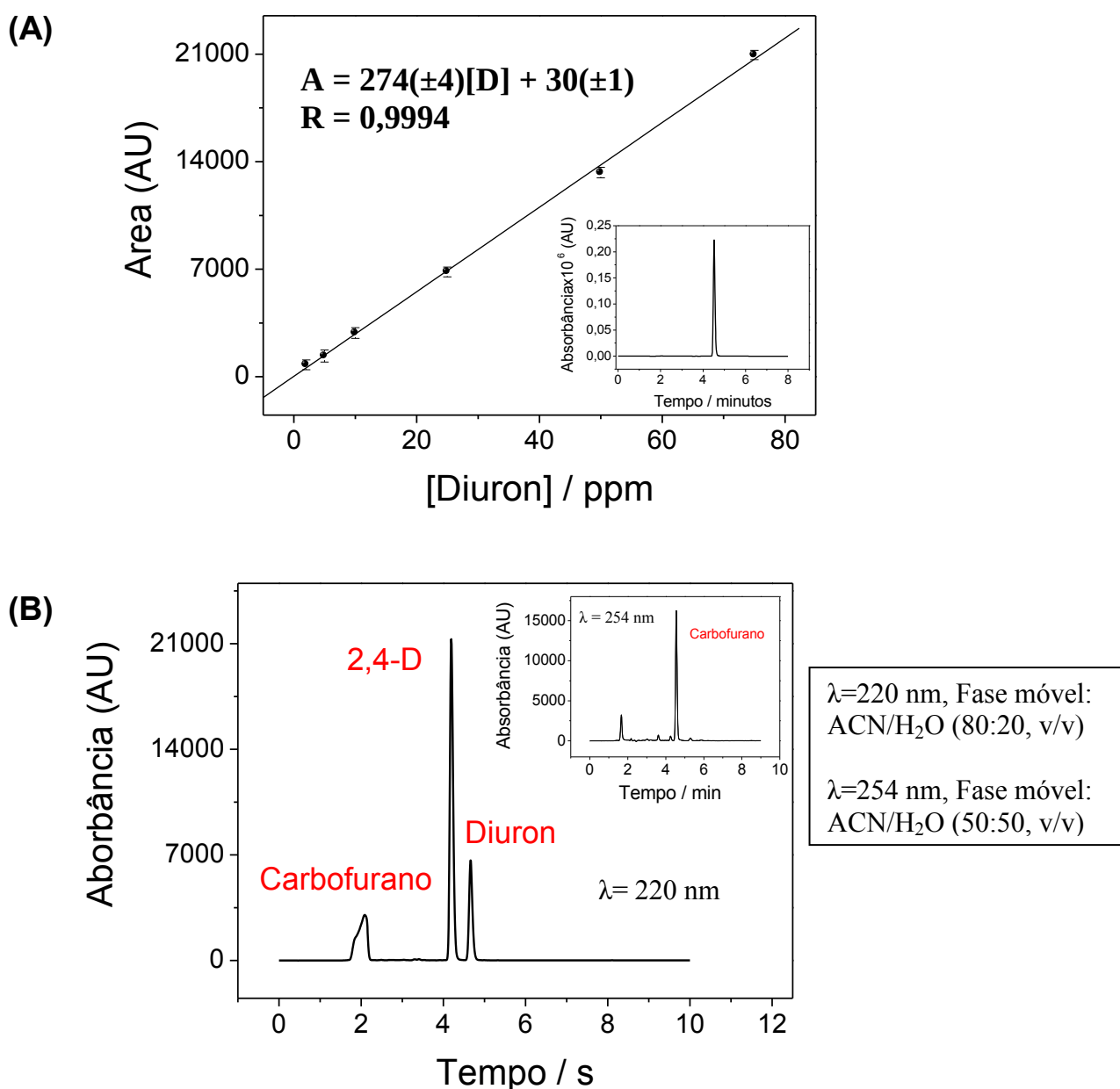
Figura 94: Isotherma BET para MIP_{MA}



4.7.3 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nesse trabalho o CLAE foi imprescindível para determinação analítica dos analitos propostos, sendo usado para validar os resultados dos sensores eletroquímicos ou determinação de diuron em ensaios de adsorção (MIP). As análises foram realizadas sempre em triplicadas e as condições de análises de cada analito encontram-se na sessão experimental. Na Figura 95, mostram-se exemplos do uso da CLAE neste trabalho.

Figura 95 – Determinação de diuron em CLAE-UV, (A) Curva de calibração, (B) Teste de seletividade de MIP_{MA-TRIM}.

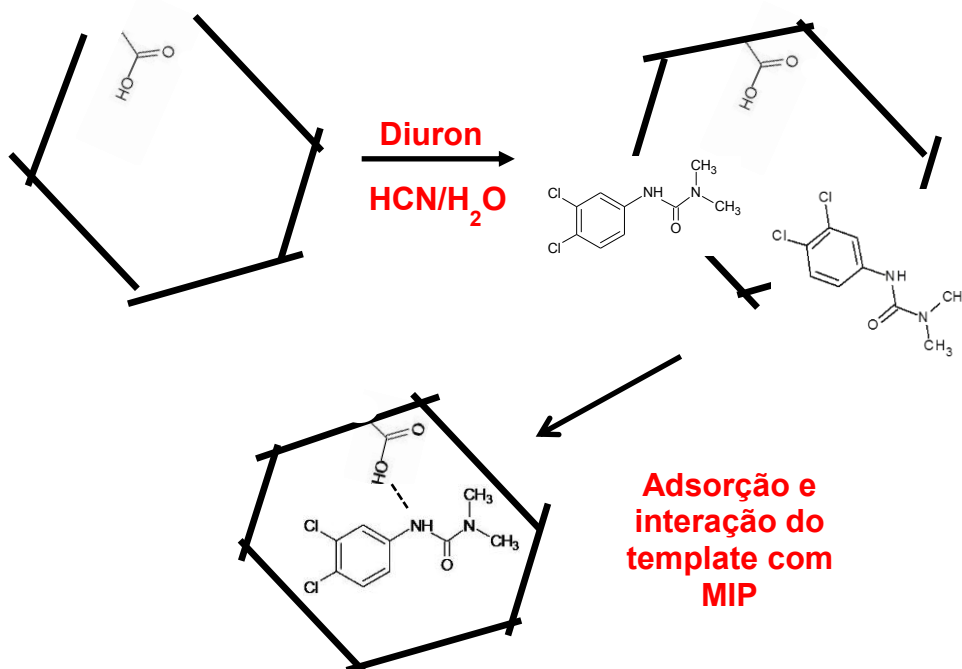


A Figura 95A apresenta uma curva analítica e um cromatograma (inserido) que foi usado para determinação de diuron em MIPs e Figura 95B apresenta picos cromatográficos referentes aos analitos estudados no teste de seletividade. Pode ser visualizado nesse estudo que foi possível monitorar 2,4-D e diuron em $\lambda = 220$ nm em proporção 75:25 de ACN/H₂O e carbofurano em $\lambda = 254$ nm em proporção de 50:50 de ACN/H₂O.

4.7.4 Mecanismo de interação sugerido entre o monômero e template

O mecanismo de reação proposto entre monômero e template baseou-se na interação eletrostática dos grupos funcionais destas moléculas, sendo nesse caso o grupo amina do template interagindo com o grupo carboxila do monômero. A Figura 96 apresenta um esquema ilustrativo do processo de adsorção do template pelo MIP e consequente interação do tipo não-covalente entre o grupo amina e o hidrogênio do grupo carboxila. Lembrando que para este tipo de interação deve-se ter uma quantidade otimizada de monômero e agente reticulante maior que o template, geralmente seguindo uma proporção de 1:4:20 de template: monômero:agente reticulante.¹⁵⁴

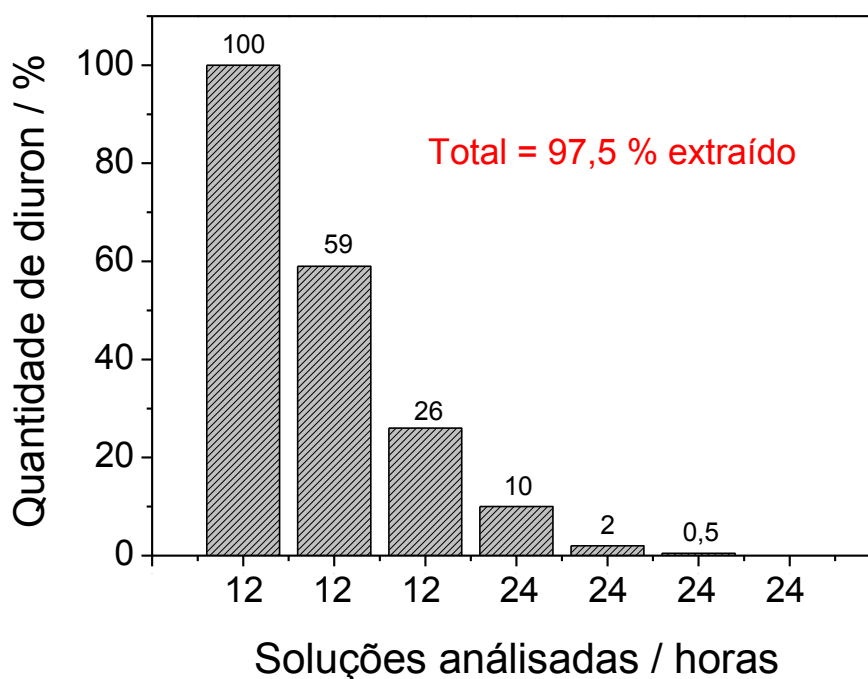
Figura 96 - Esquema de interação de MIP e template na presença de solvente (fosfato/acetonitrila (1:2, v/v)).



4.7.5 Estudo da remoção do template no MIP

No estudo de remoção do template no MIP (Figura 97), a extração de diuron foi realizada durante 4 dias em sistema sohxlet usando uma mistura de metanol e ácido acético (9:1, v/v). As amostras foram recolhidas a cada 12 horas de lavagem durante os dois primeiros dias, e a cada 24 horas nos demais dias. As primeiras amostras recolhidas foram armazenadas no freezer e ao final do 4º dia as amostras foram filtradas com filtros 0,45 µm e analisadas em CLAE onde se pode determinar a quantidade de diuron extraído em cada amostra recolhida. Na etapa final desse procedimento foi realizada lavagem com metanol a cada 3 horas por um período de 9 horas com a finalidade de retirar o excesso de acidez do MIP. A percentagem próxima de 97,5% indica que a extração do template foi eficiente e os 2,5% restantes deve-se provavelmente a degradação de diuron ou perdas que ocorreram durante o processo.

Figura 97 - Estudo de remoção de diuron em MIP_{MA-TRIM}



4.7.6 Otimização dos parâmetros de adsorção

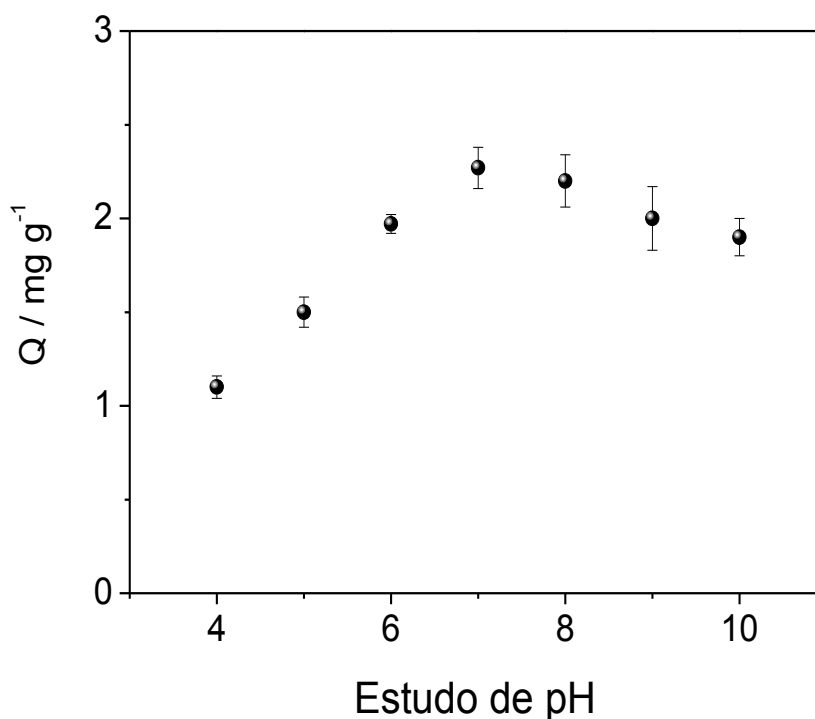
Com o objetivo de encontrar as melhores condições para as análises de religação do template-MIP foram realizados diversos estudos de afinidade na qual foram avaliados: quantidade de polímero usado nos ensaios, pH e solvente (Tabela

33). Na Figura 98 pode ser visto claramente que dentre os pHs estudados, o pH 7,0 foi o que apresentou maior adsorção e consequentemente maior afinidade pelo MIP. Os valores otimizados encontram-se destacados.

Tabela 33 - Otimização dos parâmetros de análise dos MIPs

pH	4	5	6	7	8	9
massa (g)	10	15	20	25	30	35
Solventes	H ₂ O	MeOH:Fosfato	Fosfato:ACN	ACN	MeOH	MeOH: ACN:Fosfato
Proporção (v/v)	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	Puro

Figura 98 - Estudo de pH para os polímeros molecularmente impressos



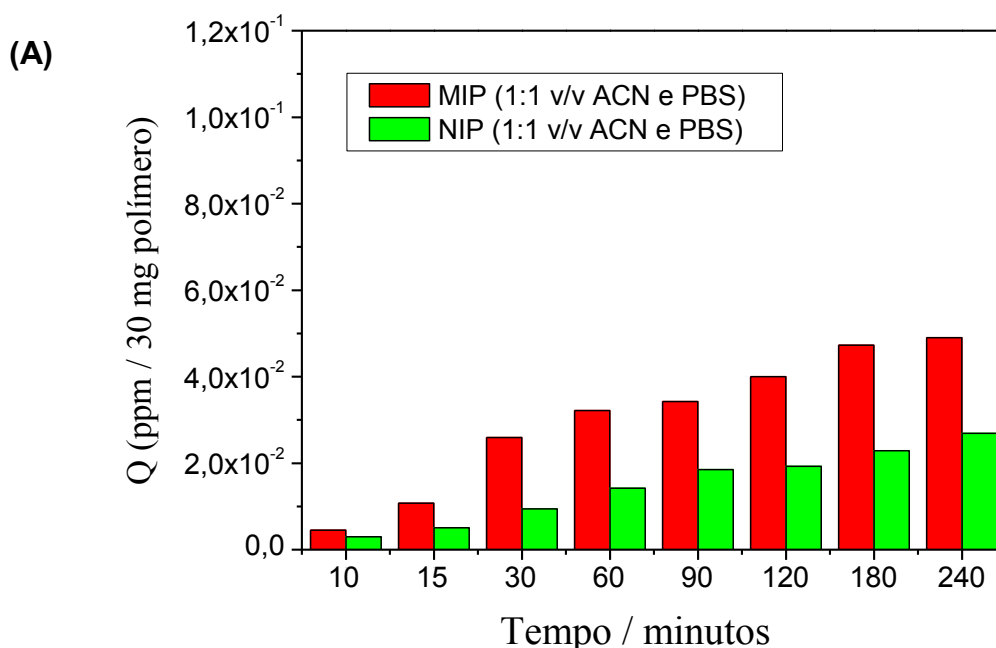
Na otimização da quantidade de polímero foi observado que a adsorção de diuron aumentava conforme ocorria o aumento de massa de MIP, chegando a uma saturação em 30 mg na qual foi utilizada como valor ótimo para as análises de religação.

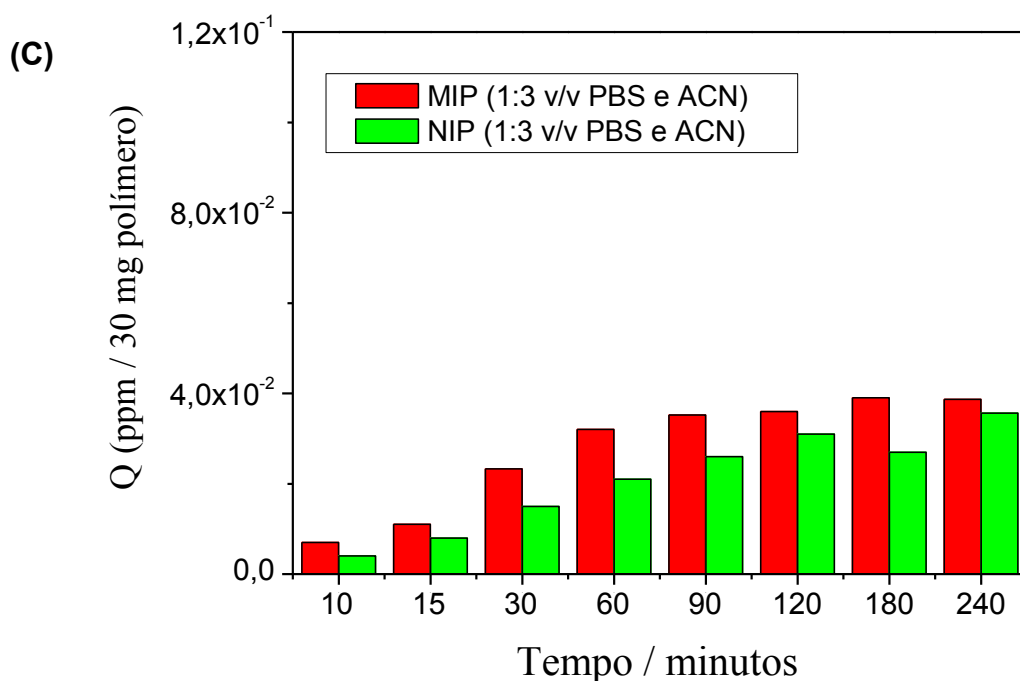
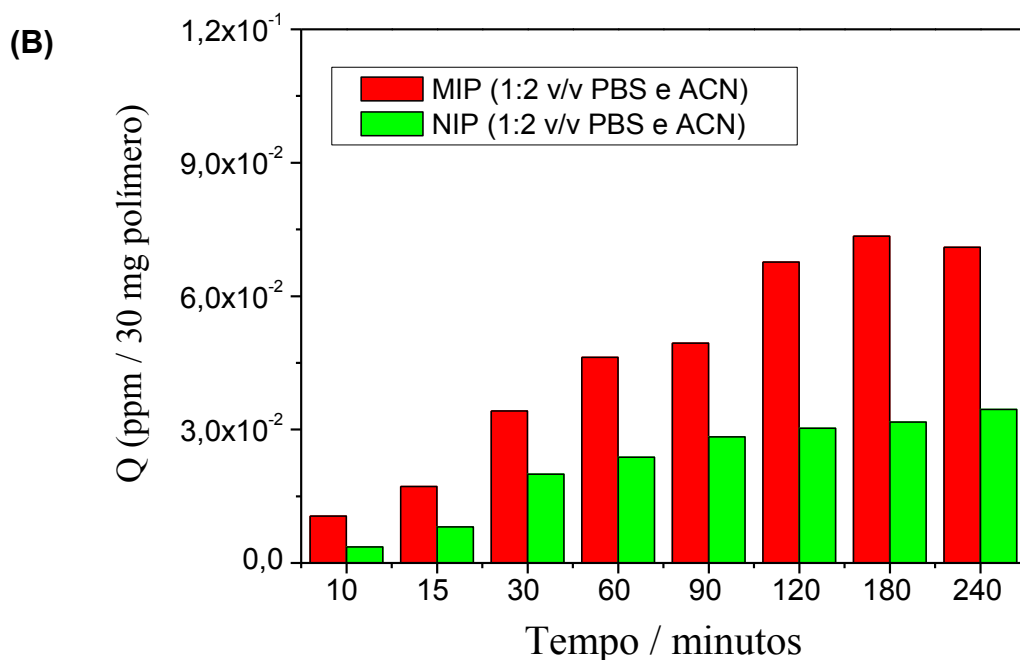
Assim, podemos através dos resultados apresentados, as melhores condições encontradas para análise de MIP foram: tampão 0,05 mol L⁻¹ de tampão fosfato/acetonitrila (1:2, v/v) pH 7,0, 30 mg de polímero e tempo de ensaio de 180 minutos.

4.7.7 Estudos cinéticos de diuron em polímero de impressão molecular

Nesse estudo verificou-se que a quantidade de substrato adsorvido pelo MIP foi sempre maior que o NIP em todos os intervalos de tempo medidos, principalmente nos ensaios onde foi usado fosfato/acetonitrila (1:2, v/v). Esse estudo baseou-se inicialmente em encontrar o melhor meio de análise, e para isto foram testados solventes mistos com constantes dielétricas distintas, como por exemplo, acetonitrila que possui uma constante dielétrica de 37,5 e água que possui constante dielétrica de 80. Sabe-se que quanto maior a constante dielétrica maior o caráter polar do solvente. Dentre as proporções (v/v) estudadas, destacaram-se a 1:1, 1:2 e 1:3, v/v por apresentar uma religação do template sempre maior no MIP em relação ao NIP (Figura 99 B). As análises basearam-se na utilização de um tempo inicial de 10 minutos até 240 minutos de adsorção, na qual sempre uma quantidade maior do template foi adsorvida pelo MIP em relação ao NIP. No tempo de 180 minutos ocorreu o máximo de adsorção do template, sendo assim escolhido como tempo ideal para as análises de religação. Assim, a utilização desse tempo é crucial para que ocorra maior adsorção de MIP em relação ao NIP, já que o NIP apresenta uma taxa de adsorção em torno de 30% de diuron.

Figura 99 - Estudo cinético de diuron em MIP e NIP, usando o monômero ácido metacrílico em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato/acetonitrila (1:2, v/v) pH 7,0 em diversas proporções v/v: (A) 1/1, (B) 1/2 e (C) 1/3.

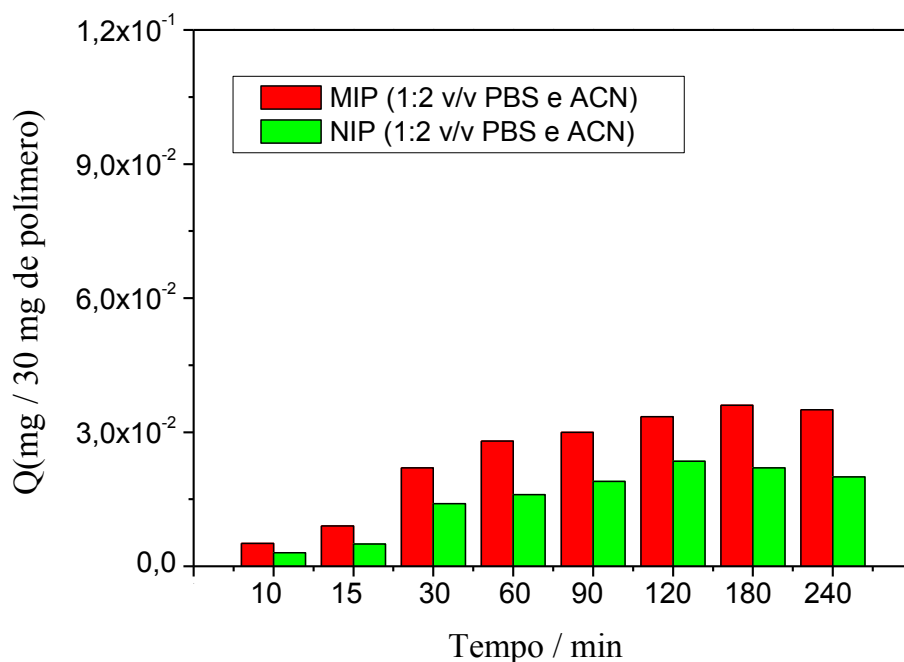




Esse mesmo procedimento de análise foi realizado com o monômero de menor interação com o substrato, ácido acrílico (AA) (Figura 100). Nesse estudo foi usada a melhor proporção de solvente e observou-se que a adsorção do template pelo MIP foi maior em relação ao NIP, mas com uma adsorção menor quando comparado com a adsorção do MIP sintetizado com ácido metacrílico (Figura 99 B). Os resultados obtidos deve-se provavelmente a baixa afinidade do analito pelo monômero, ocasionada pela formação de sítio de ligação não tão específicos. Deve-

se enfatizar que os resultados obtidos nas análises de adsorção estão de acordo com os resultados obtidos nas simulações computacionais, na qual previa maior adsorção do MIP sintetizado com ácido metacrílico.

Figura 100 - Estudo cinético de diuron em MIP e NIP usando ácido acrílico como monômero.

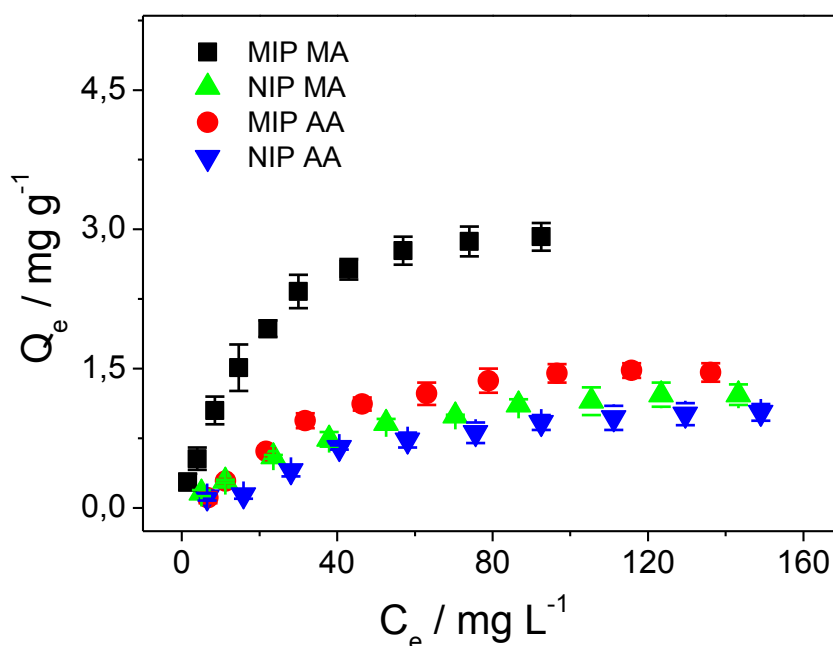


4.7.8 Estudos de afinidade para avaliar a eficiência do MIP para diuron

Este estudo consistiu na construção de isotermas de adsorção, obtidas de análises em cromatografia, que permitiram avaliar a quantidade máxima de substrato adsorvido pelo MIP e NIP. As condições usadas foram o tempo de adsorção de 3 horas e a proporção de solvente, 0,05 mol L⁻¹ de tampão fosfato/acetonitrila (1:2, v/v) pH 7,0, que foi usada no preparo da solução de diuron. O intervalo de concentração usado neste estudo variou de 10 a 180 ppm. Na Figura 101 é apresentada a isoterma de adsorção dos polímeros avaliados em um gráfico que expressa a quantidade de diuron adsorvido por miligrama de polímero (Q_e (mg/g)) vs a quantidade de diuron livre na solução (C_e (mg/L)).¹⁰⁵ Verificou-se que a adsorção de diuron no MIP foi sempre maior que o NIP para os dois monômeros

empregados, e em todos os intervalos de concentração medidos. A adsorção do MIP_{MA} apresentou maior adsorção do template que o MIP_{AA}.

Figura 101 - Isotermas de adsorção dos MIP e NIP usando ácido metacrílico (MA) e ácido acrílico (AA).



Utilizando os modelos de isoterma de adsorção de Langmuir e Freundlich foi possível calcular os valores das constantes de ligação para cada polímero.

Equação de Langmuir linearizada:

A equação de Langmuir linearizada foi aplicada para cada isoterma, obtendo curvas analíticas com 7 pontos e com coeficiente de correlação próximo a 1. Assim, podemos afirmar que a adsorção do MIP_{MA} segue a adsorção de Langmuir (Figura 102).¹⁰⁵

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \left(\frac{\alpha_L}{K_L} \right) C_e \quad \text{Equação 10}$$

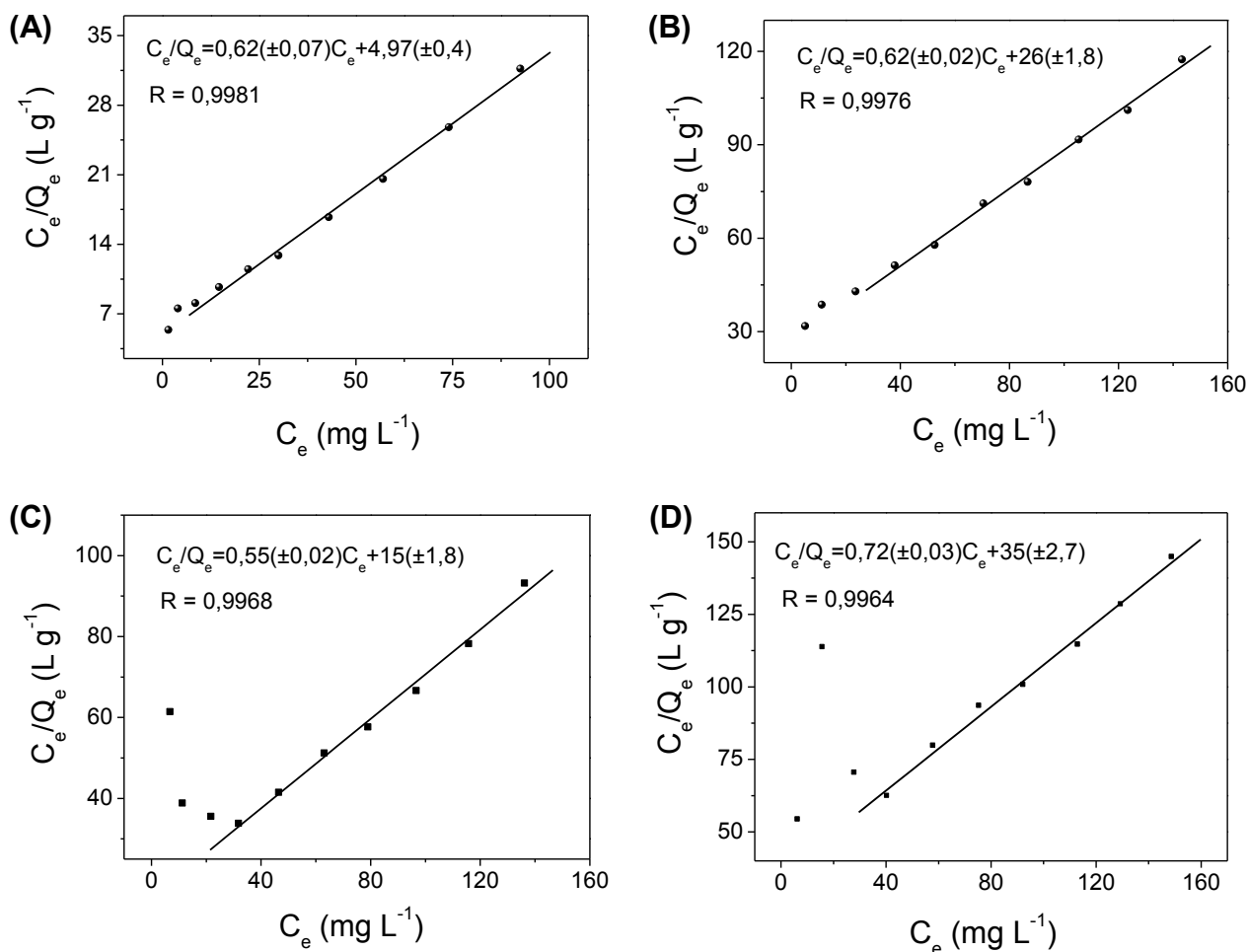
Onde: C_e = concentração de equilíbrio (mg L⁻¹) de diuron na fase líquida.
q_e = concentração de equilíbrio (mg g⁻¹) de diuron na fase sólida
α_L = constante de Langmuir (L mg⁻¹)
K_L = constante de ligação de Langmuir (L g⁻¹)

Os valores das constantes de ligação obtidas com a equação de Langmuir linearizada mostra que o MIP_{MA} adsorveu uma maior quantidade de diuron em relação ao NIP_{MA} (5,5 vezes mais) e ao MIP_{AA} (3,2 vezes a mais) e NIP_{AA} (7,2 vezes a mais) (Tabela 34).

Tabela 34 - Valores das constantes de ligação (K_L) obtida a partir da equação de Langmuir.

Isoterma de Langmuir				
Constante (K_L)	Ácido metacrílico	Coeficiente de correlação (R)	Ácido acrílico	Coeficiente de correlação (R)
MIP	0,21	0,9981	0,066	0,9976
NIP	0,038	0,9968	0,029	0,9964

Figura 102 - Determinação da constante de ligação do polímero-diuron (K_L) através da isoterma de Langmuir linearizada: (A) MIP_{MA}, (B) NIP_{MA} (C) MIP_{AA} e (D) NIP_{AA}



Equação de Freundlich linearizada:

O modelo de isoterma de Freundlich foi aplicado às análises usando a equação na forma linearizada, conforme Figura 103.¹⁰⁵

$$\ln q_e = \ln K_f + b_F \ln C_e \quad \text{Equação 11}$$

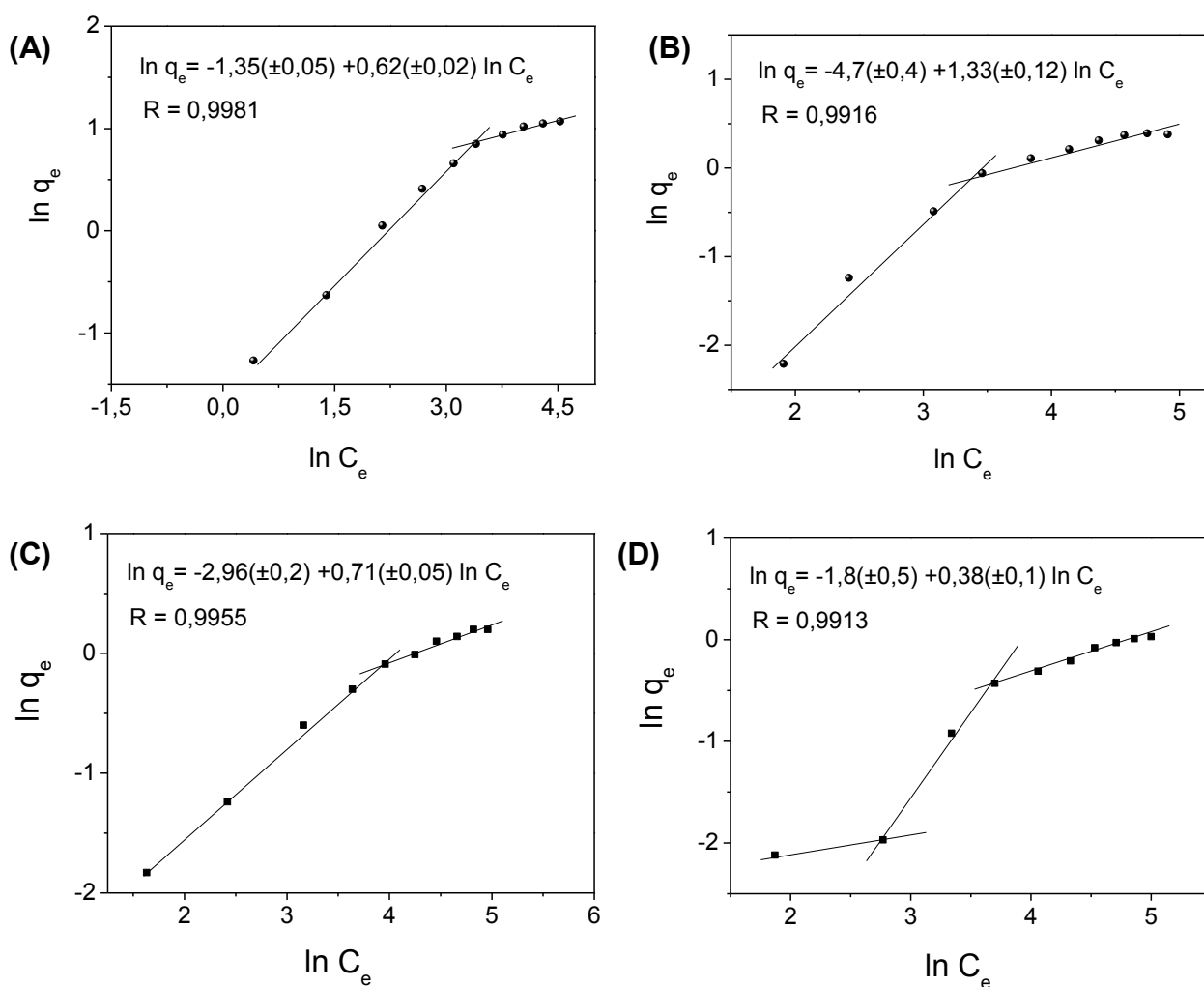
Onde:

q_e = concentração de equilíbrio (mg g⁻¹) de diuron na fase sólida,

K_f = constante de ligação de Freundlich

C_e = concentração de equilíbrio (mg L⁻¹) de diuron na fase líquida.

Figura 103 - Determinação da constante de ligação do polímero-diuron (K_L) através da isoterma de Freundlich linearizada: (A) MIP_{MA}, (B) NIP_{MA} (C) MIP_{AA} e (D) NIP_{AA}



Observando os valores das constantes obtidas aplicando a equação de Freundlich, podemos dizer que a relação das constantes dos polímeros sintetizados, segue praticamente a mesma razão obtida na isoterma de Langmuir. Observando o coeficiente de correlação e os números de pontos utilizados para construir um perfil linear, concluímos que esse tipo de isoterma não é apropriado para a adsorção dos polímeros estudados (Tabela 35).

Tabela 35 - Valores das constantes de ligação obtidas através do modelo de adsorção de Freundlich.

Isoterma de Freundlich				
Constante (K_L)	Ácido metacrílico	Coeficiente de correlação (R)	Ácido acrílico	Coeficiente de correlação (R)
MIP	0,26	0,9981	0,052	0,9955
NIP	0,0091	0,9916	0,0041	0,9913

4.7.8.1 Estudo de seletividade do MIP para detecção de diuron

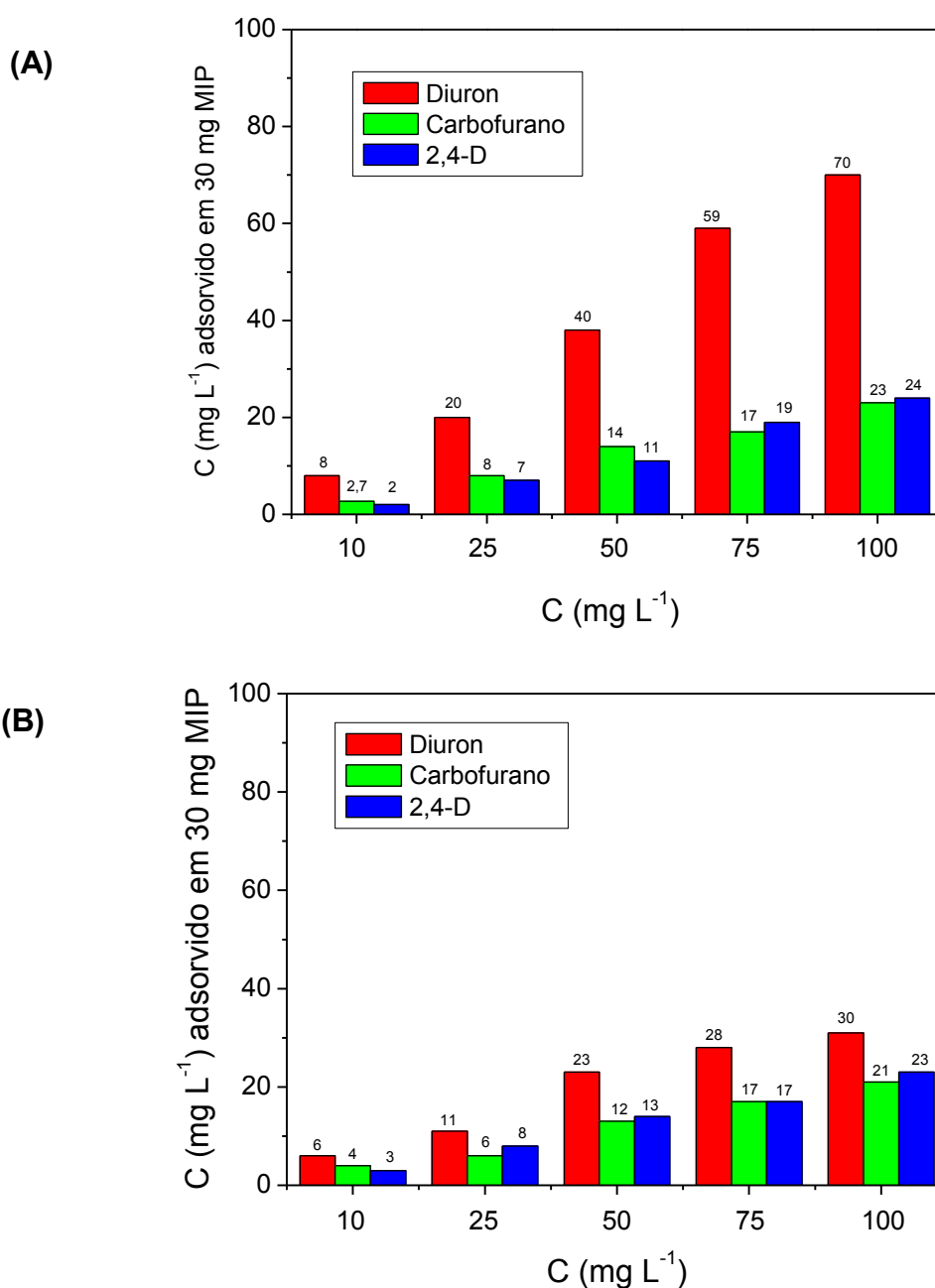
A seletividade do MIP foi realizada na presença de dois agrotóxicos que possuem estrutura química semelhante ao template. Nessas análises foram avaliados os dois monômeros escolhidos para a pesquisa, ácido metacrílico (MA) e ácido acrílico (AA).

A partir dos gráficos da Figura 104, constatou-se que o MIP sintetizado com ácido metacrílico (MA) apresentou maior eficiência na adsorção que o ácido acrílico (AA). Também foi possível observar que as quantidades de diuron adsorvidas pelo MIP foram sempre maiores em todas as concentrações, em relação aos interferentes analisados (2,4-D e carbofurano). No intervalo de concentração de 100 ppm é visualizado que o MIP_{MA} apresentou uma adsorção de 70 ppm de diuron, 23 ppm de carbofurano e 24 ppm de 2,4-D, enquanto para o MIP_{AA} a adsorção foi de 30 ppm de diuron, 21 ppm de carbofurano e 23 ppm de 2,4-D. Esses resultados mostram que o MIP_{MA} foi muito mais seletivo que o MIP_{AA}, pois adsorveu quase 3,5 vezes mais diuron que se encontrava em solução. Esse perfil analítico foi também observado nas outras concentrações analisadas.

Essa maior afinidade da molécula de diuron pelo MIP_{MA} pode ser explicada provavelmente devido às cavidades complementares e seletivas da molécula de diuron formadas no MIP, na qual foi mais efetiva no MIP_{MA} em relação ao MIP_{AA}.

A seletividade de diuron frente à carbofurano e 2,4-D foi realizada através da avaliação da constante de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (CS) e coeficiente de seletividade relativo (CSR).^{155,156}

Figura 104 - Gráficos representando a seletividade do MIP usando monômeros MA (A) e AA (B) em diferentes concentrações de diuron, carbofurano e 2,4-D



Constante de distribuição (K_d)

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \cdot \frac{V \text{ (mL)}}{m \text{ (g)}}$$

Equação 12**Coeficiente de seletividade (CS)**

$$K = \frac{K_{d(\text{analito})}}{K_{d(\text{interferente})}}$$

Equação 13**Coeficiente de seletividade relativo (CSR)**

$$K' = \frac{K_{MIP}}{K_{NIP}}, \text{ também chamado de fator de impressão.}$$

Equação 14

Onde: C_i , C_f , V_s e m (g) representam, respectivamente, a concentração inicial, final, volume da solução e massa de polímero.

Na Tabela 36 e 37 é apresentada a concentração em solução de cada agrotóxico e os valores dos parâmetros encontrados na qual permitiram a comparação do MIP e NIP na adsorção de diuron e outras espécies interferentes. Avaliando os resultados pode-se visualizar que o coeficiente de distribuição de diuron foi muito superior em relação à carbofurano e 2,4-D, principalmente em baixas concentrações onde maior parte de diuron é absorvido pelo MIP. O fator de impressão foi calculado e permitiu avaliar a seletividade do MIP através do coeficiente de seletividade relativo, cujos valores foram 2,8 vezes em relação à carbofurano e 3,7 vezes em relação ao 2,4-D. Os valores obtidos indicam a alta seletividade do MIP pelo diuron, uma vez que os valores encontrados nesse estudo foram superiores a 1 (valor que indica falta de seletividade).^{155,156}

Tabela 36 – Concentração (C) de cada agrotóxico obtido no teste de seletividade

Agrotóxicos C_{adicionada} = 10 ppm	Diuron C_{sobrenadante}	Carbofurano C_{sobrenadante}	2,4-D C_{sobrenadante}
MIP _{MA}	2,0	7,3	6,9
NIP _{MA}	5,1	7,9	7,5

Tabela 37 - Avaliação da seletividade do MIP_{MA} para diuron e possíveis interferentes

Polímero	K_d			CS		CSR	
	Diuron	Carbofurano	2,4-D	Carbofurano	2,4-D	Carbofurano	2,4-D
MIP	666	62	75	11	8,9	2,8	3,7
NIP	160	44	56				

Dessa forma, pode-se observar que os resultados indicam que o MIP_{MA} apresentou maior capacidade de adsorção de diuron, como consequência da existência de nanocavidades de tamanho e forma equivalentes e tipo de interações específicas. A adsorção não específica que ocorreu no NIP foi similar para todos os compostos analisados.

4.7.8.2 Aplicação do MIP em amostras de rios

Os resultados obtidos na análise de MIP_{MA} e NIP_{MA} em amostras de rios utilizando as condições otimizadas podem ser observados na Tabela 38. Neste estudo as adsorções de diuron em MIP foram sempre maiores que NIP, mostrando que a impressão molecular neste caso foi fundamental para se alcançar altas adsorções. A percentagem de adsorção de diuron nas condições otimizadas foi entre 65,0 a 72,2% para MIP, enquanto para NIP a percentagem encontrada foi de 20,5 a 24,5% quando adicionado 100 ppm nas amostras de rios.

Tabela 38 - Estudo de MIP em amostras ambientais (rios)

Amostra de águas de rios	Adicionado / mg L^{-1}	MIP		NIP	
		Encontrado em solução / mg L^{-1}	Adsorvido pelo MIP / mg L^{-1}	Encontrado em solução / mg L^{-1}	Adsorvido pelo NIP / mg L^{-1}
nº 1	50	40,0%	60,0%	78,0%	22,0%
nº 2	50	25,0%	75,0%	80,0%	20,0%
nº 3	50	30,0%	70,0%	75,0%	25,0%
nº 1	100	35,0%	65,0%	79,5%	20,5%
nº 2	100	27,8%	72,2%	76,5%	23,5%
nº 3	100	30,5%	69,5%	75,5%	24,5%

4.7.9 Análise em extração em fase sólida usando MIP (MISPE)

Análises em extração em fase sólida foram realizadas com MIPs como material adsorvente em cartucho C18 utilizando as melhores condições de análise. Em princípio, os MIP/NIP foram condicionados com soluções de passagem, primeiramente água deionizada e água deionizada / acetonitrila. Em seguida foi percolada por estes cartuchos uma solução de 100 mL de 0,1 mol L^{-1} fosfato/acetonitrila (1:2, v/v) em pH 7,0 com uma concentração de 10 ppm de diuron em cartucho C18 a uma vazão de 1 ml por minuto. Os resultados obtidos nessas análises constataram maior quantidade de diuron na solução que foi percolada no NIP_{AA}. E ao eluir uma solução contendo 10 mL de acetonitrila pode-se verificar por um fator x 10 a quantidade exata de diuron adsorvido pelo MIP e NIP através da análise dessa solução em CLAE. Os resultados obtidos com o MIP sintetizado com o monômero ácido metacrílico (MA) apresentou um desempenho satisfatório na pré-concentração de soluções contendo 10 mg L^{-1} (ppm), enquanto o MIP contendo o monômero ácido acrílico apresentou um fraco desempenho na adsorção do template.

Na Tabela 39, observa-se que o diuron eluído não ficou eficientemente retido nos sítios de ligação do MIP, devido ao fato de no SPE ter sido utilizado um tempo de adsorção menor que o tempo otimizado de 3 horas.

Tabela 39 - Resultado das análises da extração em fase sólida (SPE) para diuron, obtidos através do método oficial de análise (CLAE).

Monômero	Etapa 1: Passagem		Etapa 2: Eluição	
	MIP	NIP	MIP	NIP
Acido Acrílico	70%	80%	21%	13%
Acido Metacrílico	35%	70%	57%	18%

Analisando o monômero ácido metacrílico foi verificado na solução de passagem um valor de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron, o qual corresponde a 35% da concentração da solução (10 mg L^{-1}). Assim, na pré-concentração (10 vezes) era esperado ser encontrado uma concentração máxima de 65 mg L^{-1} . O valor encontrado foi de 57 mg L^{-1} de diuron, que corresponde a 57% da concentração inicial. Embora este resultado esteja um pouco abaixo do esperado, os resultados obtidos mostram que o MIP_{MA-TRIM} que possui impressão molecular apresentou melhores resultados que os outros polímeros.

4.7.9.1 Determinação de diuron em águas de rios utilizando sistema MISPE

Na etapa de aplicação foi realizada uma mudança na proporção dos solventes com a finalidade de melhorar o rendimento do MIP_{MA-TRIM} na adsorção de diuron. A proporção otimizada encontrada para este sistema foi acetonitrila/tampão fosfato 1:3, v/v.

Na amostra 1, por exemplo, foi encontrado um valor de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron na solução de passagem, o qual corresponde a 20% da concentração da solução (10 mg L^{-1}). Na etapa de pré-concentração (10 vezes) era esperado ser encontrado uma concentração máxima de 80 mg L^{-1} . O valor encontrado foi de 75 mg L^{-1} de diuron, que corresponde a 75% da concentração inicial (Tabela 40). Os resultados obtidos com as duas amostras de rios foram muito satisfatórios mostrando que a impressão molecular permite a detecção sensível de diuron nesse tipo de matriz.

Tabela 40 - Resultado das análises da extração em fase sólida (MISPE) para diuron, obtidos através do método oficial de análise (CLAE).

Amostras de águas de rios	Etapa 1: Passagem		Etapa 2: Eluição	
	MIP _{MA-TRIM}	NIP _{MA-TRIM}	MIP _{MA-TRIM}	NIP _{MA-TRIM}
Amostra nº 1	20%	62%	75%	36%
Amostra nº 2	23%	67%	73%	28%

Pode-se concluir que a mudança na proporção de solvente foi fundamental para obtenção de maiores adsorções de diuron, chegando a obter um rendimento similar ao sistema de análise que utilizou homogeneizador. Sendo assim, o MISPE pode ser satisfatoriamente empregado na análise de diuron nesse tipo de matriz, chegando a obter adsorções de até 75% de diuron.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÃO

5.1 Os sensores biomiméticos desenvolvidos como potenciais mimetizadores da enzima P450 para detecção dos agrotóxicos 2,4-D, diuron, carbofurano e do fármaco diclofenaco foram respectivamente os complexos cloro 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)-21*H*,23*H*-porfirina ferro (III); o 29*H*,31*H*-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II); a hemina e a 29*H*,31*H*-ftalocianina-1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi cobre (II).

5.1.1 As características analíticas visualizadas com os sensores propostos tanto para o sistema em batelada e em fluxo foram alta estabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, seletividade, durabilidade e aplicabilidade em amostras ambientais como amostras de rios, solo e alimentos, os quais os tornam altamente promissores frente às outras metodologias de análise, que muitas vezes não apresentam todas essas características.

5.2 A utilização de eletrodos descartáveis modificado com MWCNT-COOH permitiu realizar a determinação sensível de thiram, visto que esses eletrodos foram desenvolvidos a um custo extremamente baixo quando comparado aos eletrodos impressos comerciais. Foi verificado que a repetibilidade dos eletrodos entre as medidas eletroquímicas foi extremamente alta, aumentando assim a confiabilidade no dispositivo desenvolvido.

5.3 Nesse trabalho pode-se ver claramente que o uso de nanotubos de carbono ou óxido de grafeno incorporado na superfície dos sensores permitiu o aumento de até 14 vezes na sensibilidade dos sensores eletroquímicos desenvolvidos, demonstrando claramente a vantagem do uso desses materiais na superfície do eletrodo. Como exemplo temos o sensor biomimético para determinação de 2,4-D, que quando modificado com nanotubo de carbono permitiu um aumento de 10 vezes na sensibilidade.

5.4 Os MIPs desenvolvidos com monômero ácido metacrílico e com o agente de reticulação TRIM foi o que apresentou os melhores resultados nos estudos de religação de diuron no MIP, com adsorções de 4 a 5 vezes a mais que o polímero de

controle (NIP). É importante ressaltar que a funcionalidade da molécula molde permitiu a formação do complexo durante a pré-polimerização, permitindo assim a formação das nanocavidades seletivas para diuron.

5.4.1 Os resultados obtidos nos estudos cinéticos foram importantes para a construção das isotermas de adsorção, e para os estudos de afinidade e seletividade do MIP. Quando aplicado o MIP_{MA-TRIM} em amostras de rios, os resultados obtidos foram satisfatórios com adsorções do template pelo MIP_{MA-TRIM} de até 70%.

5.4.2 A utilização do MIP em extração em fase sólida (MISPE) e em estudos de adsorção (utilizando homogeneizador) mostrou que o MIP sintetizado neste trabalho é um material eficiente para ser utilizado com sucesso em amostras ambientais. Obtendo-se, no caso do MISPE valores de recuperação de diuron em águas de rios de 75% para o MIP_{MA-TRIM}. Deve-se enfatizar que o MIP_{MA-TRIM} desenvolvido é altamente vantajoso, visto que na literatura ainda não foi relatada nenhuma metodologia desse tipo na qual permita a determinação sensível e seletiva de diuron.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

- 1 DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419, 2011.
- 2 WARREN, N.; ALLAN, I. J.; CARTER, J. E.; HOUSE, W. A.; PARKER, A. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments-a review. **Applied Geochemistry**, v. 18, n. 2, p. 159-194, 2003.
- 3 ALBANIS, T. A.; HELA, D. G.; SAKELLARIDES, T. M.; KONSTANTINOU, I. K. Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solidphase extraction disks and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1/2, p. 59-71, 1998.
- 4 KAZEMIL, M.; TAHMASBIL, A. M.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. A.; SONI, A. Organophosphate pesticides: a general review. **Agricultural Science Research Journals**, v. 2, n. 9, p. 512-522, 2012.
- 5 IYANIWURA, T. T. Prevention and management of human toxicosis resulting from pesticide use-a survey. **International Journal of Environmental Studies**, v. 38, n. 2/3, p. 115-121, 1991.
- 6 SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T.M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.
- 7 JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global-um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.
- 8 GUIMARÃES, C.G. **Resíduos de agrotóxicos estão presentes em 29% dos alimentos, revela pesquisa**. Disponível em: <<http://www.ecodesenvolvimento.org/posts/2013/outubro/residuos-de-agrotoxicos-estao-presentes-em-29-dos?tag=vida-e-saude>>. Acesso em: 26 jul. 2014.
- 9 RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.
- 10 HAMILTON, D. J.; AMBRUS, A.; DIETERLE, R. M.; FELSOT, A. S.; HARRIS, C. A.; HOLLAND, P. T.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; LINDERS, J.; UNSWORTH, J.; WONG, S.-S. Regulatory limits for pesticide residues in water. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1123-1155, 2003.
- 11 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

- 12 SHALINI, K.; ANWER, Z.; SHARMA, P. K.; GARG, V. K.; KUMAR, N. A review on pharma pollution. **International Journal of ChemTech research**, v. 2, n. 4, p. 2265-2270, 2010.
- 13 STACKELBERG, P. E.; FURLONG, E. T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S. D.; HENDERSON, A. K.; REISSMAN, D. B. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-watertreatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 329, n. 1/3, p. 99-113, 2004.
- 14 CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, 1257-1274, 2009.
- 15 TAMBOSI, J. L.; YAMANAKA, L. Y.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F. P. M. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 411-420, 2010.
- 16 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- 17 CULLINGTON, J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 677-686, 1999.
- 18 PRICHARD, T.; TROIANO, J.; MARADE, J.; GUO, F.; CANEVARI, M. Movement of diuron and hexazinona in clay soil and infiltrated pond water. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, n. 6, p. 2005-2017, 2005.
- 19 GIACOMAZZI, S.; COCHET, N., Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1021-1032, 2004.
- 20 BOIVIN, A.; AMELLAL, S.; SCHIAVON, M.; GENUCHTEN, M. T. V. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 92-99, 2005.
- 21 TEIXEIRA, M. C.; DUQUE, P.; SÁ-CORREIA, I. Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 363-370, 2007.
- 22 HAN, D.; JIA, W.; LIANG, H. Selective removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from water by molecularly-imprinted amino-functionalized silica gel sorbent. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 2, p. 237-241, 2010.

- 23 OTIENO, P. O.; LALAH, J. O.; VIRANI, M.; JONDIKO, I. O.; SCHRAMM, K.-W. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 536-544, 2010.
- 24 SUN, X.; DU, S.; WANG, X.; ZHAO, W.; LI, Q. Label-free electrochemical immunosensor for carbofuran detection based on a sol-gel entrapped antibody. **Sensors**, v. 11, n. 10, p. 9520-9531, 2011.
- 25 POHANKA, M.; FUSEK, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. Carbofuran assay using gelatin based biosensor with acetylcholinesterase as a recognition element. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 1, p. 71-79, 2013.
- 26 GUPTA, B.; RANI, M.; KUMAR, R. Degradation of thiram in water, soil and plants: a study by high performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 1, p. 69-75, 2012.
- 27 SINGH, B.; SHARMA, D. K.; GUPTA, A. In vitro release dynamics of thiram fungicide from starch and poly (methacrylic acid)-based hydrogels. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1/3, p. 278-286, 2008.
- 28 BORG, K.; TJAELVE, H. Effect of thiram and dithiocarbamate pesticides on the gastrointestinal absorption and distribution of nickel in mice. **Toxicology Letters**, v. 42, n. 1, p. 87-98, 1988.
- 29 XU, M.; CHEN, L.; SONG, J. Polarographic behaviors of diclofenac sodium in the presence of dissolved oxygen and its analytical application. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 21-27, 2004.
- 30 HOEGER, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; HITZFELD, B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). **Aquatic Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 53-64, 2005.
- 31 STULTEN, D.; ZUHLKE, S.; LAMSHOFT, M.; SPITELLER, M. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. **Science of the Total Environment**, v. 405, n. 1/3, p. 310-316, 2008.
- 32 SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
- 33 FARGHALY, O. A.; HAMEED, R. S. A.; ABU-NAWWAS, A.-A. H. Analytical application using modern electrochemical techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 3287-3318, 2014.
- 34 YOGESWARAN, U.; CHEN, S-M. A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. **Sensors**, v. 8, n. 1, p. 290-311, 2008.

- 35 STRADIOTTO, N. R.; YANAMAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.
- 36 FATIBELO FILHO, O.; DOCKAL, E. R.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; TEIXEIRA, M. F. S. Electrochemical modified electrodes based on metal-salen complexes. **Analytical Letters**, v. 40, n. 10, p. 1825-1852, 2007.
- 37 BARENDRECHT, E. Chemically and physically modified electrodes: some new developments. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 20, n. 2, p. 175-185, 1990.
- 38 DURST, R. A.; BAUMNER, A. J.; MURRAY, R. W.; BUCK, R. P.; ANDRIEUX, C. P. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1317-1323, 1997.
- 39 ZEN, J.-M.; KUMAR, A. S.; TSAI, D.-M. Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 15, n. 13, p. 1073-1087, 2003.
- 40 KALCHER, K. Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. **Electroanalysis**, v. 2, n. 6, p. 419-433, 1990.
- 41 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.
- 42 BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípio, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1997. 82 p.
- 43 KUTNER, W.; WANG, J.; LHER, M.; BUCK, R. P. Analytical aspects of chemically modified electrodes: classification, critical evaluation and recommendations. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 1301-1318, 1998.
- 44 WRING, S. A.; HART, J. P. Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. **Analyst**, v. 117, p. 1215-1229, 1992.
- 45 WRING, S. A.; HART, J. P.; BIRCH, B. J. Voltammetric behaviour of screen-printed carbon electrodes, chemically modified with selected mediators, and their application as sensors for the determination of reduced glutathione. **Analyst**, v. 116, n. 2, p. 123-129, 1991.
- 46 COATES, M.; NYOKONG, T. Characterization of glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and iron phthalocyanine through grafting and click chemistry. **Electrochimica Acta**, v. 91, n. 1, p. 158-165, 2013.
- 47 BHATTACHARYYA, D.; SINGH, S.; SATNALIKA, N.; KHANDELWAL, A.; JEON, S.-H. Nanotechnology, big things from a tiny world: a review. **International Journal of u- and e- Service, Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 29-38, 2009.

- 48 DORIA, G.; CONDE, J.; VEIGAS, B.; GIESTAS, L.; ALMEIDA, C.; ASSUNÇÃO, M.; ROSA, J.; BAPTITA, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1657-1686, 2012.
- 49 TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, 2006.
- 50 GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, p. 183-191, 2007.
- 51 GOODING, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: a review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 15, p. 3049-3060, 2005.
- 52 BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering: B**, v. 119, n. 2, p. 105-118, 2005.
- 53 ZAIDI, S. A. Graphene: a comprehensive review on its utilization in carbon paste electrodes for improved sensor performances. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 9, p. 11337-11355, 2013.
- 54 YANG, Z.; GAO, R.; HU, N.; CHAI, J.; CHENG, Y.; ZHANG, L.; WEI, H.; KONG, E. S.-W.; ZHANG, Y. The prospective two-dimensional graphene nanosheets: preparation, functionalization, and applications. **Nano-Micro Letters**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2012.
- 55 SHAO, Y.; WANG, J.; WU, H.; LIU, J.; AKSAY, I. A.; LINA, Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1027-1036, 2012.
- 56 KANGA, X.; WANG, J.; WUA, H.; LIUA, J.; AKSAY, I. A.; LINA, Y. A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 754-759, 2010.
- 57 WINNISCHOFER, H.; LIMA, S. S. L.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Electrocatalytic activity of a new nanostructured polymeric tetra-ruthenated porphyrin film for nitrite detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 1, p. 97-107, 2003.
- 58 LEVER, A. B. P.; HEMPSTEAD, M. R.; LEZNOFF, C. C.; LLU, W.; MELNIK, M.; NEVLN, W. A.; SEYMOUR, P. Recent studies in phthalocyanine chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 1467-1476, 1986.
- 59 BIESAGA, M.; PYRZNSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. **Talanta**, v. 51, n. 2, p. 209-224, 2000.
- 60 WANG, C.; YUAN, R.; CHAI, Y.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; HU, F.; ZHANG, M. Non-covalent iron(III)-porphyrin functionalized multi-walled carbon nanotubes for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Electrochimica Acta**, v. 62, n. 1, p. 109-115, 2012.

- 61 VYTRAS, K.; SVANCARA, I.; METELKA, R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n. 10, p. 1021-1033, 2009.
- 62 SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANGD, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 21, n. 1, p. 7-28, 2009.
- 63 OLIVERIA, A. C.; MASCARO, L. H. Evaluation of carbon nanotube paste electrode modified with copper microparticles and its application to determination of quercetin. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 3, p. 804-818, 2011.
- 64 HARRIS, P. J. F. Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. **Philosophical Magazine**, v. 84, n. 29, p. 3159-3167, 2004.
- 65 WANG, Y.; WEI, W.; ZENG, J.; LIU, X.; ZENG, X. Fabrication of a copper nanoparticle/chitosan/carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 1/2, p. 253-260, 2008.
- 66 NASCIMENTO, V. B. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Química Nova**, v.1, n. 5, p. 614-628, 1998.
- 67 WRING, S. A.; HART, J. P. Chemically modified. Screen-printed carbon electrodes. **Analyst**, v. 117, n. 8, p. 1281-1286, 1992.
- 68 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors**. Stevenson Ronchi: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195-209.
- 69 MOREIRA, F. T. C.; GUERREIRO, J. R. L.; AZEVEDO, V. L.; KAMEL, A. H., SALES, M. G. F. New biomimetic sensors for the determination of tetracycline in biological samples: batch and flow mode operations. **Analytical Methods**, v. 2, p. 2039-2045, 2010.
- 70 CARVALHO, M. L.; SANTHIAGO, M.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. **Talanta**, v. 77, n. 1, p. 394-399, 2008.
- 71 DUA, D.; CAI, X. H.; CAI, J.; ZHANG, A. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 2, p. 285-289, 2007.
- 72 PERIASAMY, A. P.; TING, W. W.; CHEN, S.-M. Amperometric an immobilized at ruthenium oxide nanoparticles modified electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 2688-2709, 2011.

- 73 SONGA, E. A.; AROTIBA, O. A.; OWINO, J. H.O .; JAHED, N.; BAKER, P. G. L.; IWUOHA, E. I. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. **Bioelectrochemistry**, v. 75, n. 2, p. 117-123, 2009.
- 74 SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2841-2887, 1996.
- 75 KUMAR, D.; SASTRY, G. N.; VISSER, S. P. Axial ligand effect on the rate constant of aromatic hydroxylation by iron(iv) oxo complexes mimicking cytochrome p450 enzymes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 718-730, 2012.
- 76 FER, M.; CORCOS, L.; DREANO, Y.; PLEE-GAUTIER, E.; SALAUN, J.-P.; BERTHOU, F.; AMET, Y. Cytochromes P450 from family 4 are the main omega hydroxylating enzymes in humans: CYP4F3B is the prominent player in PUFA metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 11, p. 2379-2389, 2008.
- 77 HLAVICA, P. Models and mechanisms of O-O bond activation by cytochrome P450: a critical assessment of the potential role of multiple active intermediates in oxidative catalysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 22, p. 4335-4360, 2004.
- 78 GUENGERICH F. P. Cytochrome P450s, drugs, and diseases. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 4, p. 194-204, 2004.
- 79 HIRAO, H.; KUMAR, D.; SHAIK, S. On the identity and reactivity patterns of the “second oxidant” of the T252A mutant of cytochrome P450cam in the oxidation of 5-methylenenylcamphor. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 12, p. 2054-2068, 2006.
- 80 DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561-597, 2002.
- 81 DOBSON, D. J.; SAINI, S. Porphyrin-modified electrodes as biomimetic sensors for the determination of organohalide pollutants in aqueous samples. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 17, p. 3532-3538, 1997.
- 82 FRIEDERMANN, G. R. **Estudo de porfirinas base livre e seus derivados de manganês por eletroquímica e espectro-eletroquímica de RPE e UV-Vis**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- 83 WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development and application of a highly selective biomimetic sensor for detection of captopril, an important ally in hypertension control. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 8, p. 666-674, 2012.

- 84 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.
- 85 SANTOS, W. J. R.; SOUSA, A. L.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DAMOS, F. S.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A. Manganese phthalocyanine as a biomimetic electrocatalyst for phenols in the development of an amperometric sensor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1180-1187, 2009.
- 86 CAMPANELLA, L.; PYRZNSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Chemical speciation by flow-injection analysis. A review. **Talanta**, v. 43, n. 6, p. 825-38, 1996.
- 87 CASTRO, M. D. L.; CASES, M. V. Simultaneous determinations in flow injection analysis a review. **Analyst**, v. 109, p. 413-419, 1984.
- 88 RUZICKA, J.; HANSEN, E. R. **Flow injection analysis**. New York: John Wiley, 1988, 69 p.
- 89 MALE, K. B.; LUONG, J. H. Improvement of the selectivity of an FIA amperometric biosensor system for glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 8, n. 5, p. 239-247, 1993.
- 90 PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643-2657, 1940.
- 91 ALIZADEH, T. Comparison of different methodologies for integration of molecularly imprinted polymer and electrochemical transducer in order to develop a paraoxon voltammetric sensor. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 31, p. 6099-6106, 2010.
- 92 SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1779-1794, 2005.
- 93 FIGUEIREDO, E. C.; DIA, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.
- 94 CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.
- 95 SPIVAK, D. A.; CAMPBELL, J. Systematic study of steric and spatial contributions to molecular recognition by non-covalent imprinted polymers. **Analyst**, v. 126, n. 6, p. 793-797, 2001.
- 96 PEREIRA, L. A. **Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para a determinação de fenitrotona em tomate**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Campinas, Unicamp, Campinas, 2008.

- 97 SELLERGREN, B. Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. **Makromolekulare Chemie**, v. 190, n. 11, p. 2703-2711, 1989.
- 98 SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R.; KUBOTA, L. T. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 820-825, 2009.
- 99 WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. Imprinted polymers. **Advanced Materials**, v. 13, n. 7, p. 468-478, 2001.
- 100 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Biomimetic polymers in analytical chemistry. Part 2: applications of MIP (Molecularly Imprinted Polymers) in the development of chemical sensors. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087-1101, 2005.
- 101 YAN, M.; RAMSTRÖM, O. **Molecularly imprinted materials-science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005.
- 102 MOSBACH, E. Y.; MOSBACH, K.; HAUPT, K. Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. **Analytical Communications**, v. 36, n. 5, p. 167-170, 1999.
- 103 SELLERGREN, B. **Molecularly imprinted polymers**: man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Amsterdam; New York: Elsevier, 2001. 23-26 p.
- 104 GIMBERT, F.; MORIN-CRINI, N.; RENAULT, F.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Adsorption isotherm models for dye removal by cationized starch-based material in a single component system: Error analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, p. 34-46, 2008.
- 105 ALLEN, S. J.; MCKAY, G.; PORTER, J. F. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 280, n. 2, p. 322-333, 2004.
- 106 QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K. H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, v. 64, n. 11/12, p. 625-634, 2006.
- 107 WEI, H.; SUN, J. J.; WANG, Y. M.; LI, X.; CHEN, G. N. Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbofuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode. **Analyst**, v. 133, p. 1619-1624, 2008.
- 108 WONG, A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Biomimetic sensor based on 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphyrin iron (III) chloride and MWCNT for selective detection of 2,4-D. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 332-339, 2013.

- 109 GOBATTO, D. F.; WONG A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v. 3, p. 98-107, 2010.
- 110 HAN, H.; LI, J.-Z.; PANG, X.-Z. Electrochemical sensor using glassy carbon electrode modified with hpmafp/ppy/gce composite film for determination of ofloxacin. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 9060-9070, 2013.
- 111 MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A. Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. **Electroanalysis**, v. 22, n. 14, p. 1586-1591, 2010.
- 112 SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, v. 117, p. 431-437, 2013.
- 113 WONG, A.; MARESTONI, L.D. SOTOMAYOR, M. D. P. T. Monitoring of diclofenac with biomimetic sensor in batch and fia systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, 1283-1291, 2014.
- 114 CHMIELEWSKA, A.; KONIECZNA, L.; PLENIS, A.; LAMPARCZYK, H. Sensitive quantification of chosen drugs by reversed-phase chromatography with electrochemical detection at a glassy carbon electrode. **Journal of Chromatography B**, v. 839, n. 1/2, p. 102-111, 2006.
- 115 NICHOLLS, I.A.; ANDERSSON, H.S.; CHARLTON, C.; HENSCHER, H.; KARLSSON, B.C.G.; KARLSSON, J.G.; MAHONY, J.O.; ROSENGREN, A.M.; ROSENGREN, K.J.; WIKMAN, S. Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 543-552, 2009.
- 116 HUNG, C.-Y.; HUANG, Y.-T. Synthesis and molecular recognition of molecularly imprinted polymer with ibuprofen as template. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, n. 5, p. 1173-1180, 2006.
- 117 SONG, X.; WANG, J.; ZHU, J. Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin. **Materials Research**, v. 12, n. 3, p. 299-304, 2009.
- 118 SUBRAMANYAM, B.; DAS, A. Linearized and non-linearized isotherm models comparative study on adsorption of aqueous phenol solution in soil. **International Journal of Environmental Science**, v. 6, n. 4, p. 633-640, 2009.
- 119 CAO, H.; XIAO, J. B.; XU, M. Evaluation of new selective molecularly imprinted polymers for the extraction of resveratrol from polygonum cuspidatum. **Macromolecular Research**, v. 14, n. 3, p 324-330, 2006.

- 120 JIANMING, P.; LONGCHENG, X.; JIANGDONG, D.; XIUXIU, L.; HUI, H.; PENGWEI, H.; CHUNXIANG, L.; YONGSHENG, Y. Magnetic molecularly imprinted polymers based on attapulgite/Fe₃O₄ particles for the selective recognition of 2,4-dichlorophenol. **Chemical Engineering Journal**, v. 174, n. 1, p. 68-75, 2011.
- 121 MARTÍN-ESTEBAN, A.; TURIEL, E.; STEVENSON, D. Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides. **Chromatographia**, v. 53, n. 1, p. 434-437, 2001.
- 122 APREA, C.; SCIARRA, G.; BOZZI, N. Analytical methods for the determination of urinary 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in occupationally exposed subjects and in the general population. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 262-267, 1997.
- 123 OGAWA, S.; BRITO, N. M.; SILVA, M. R. S.; RIBEIRO, M. L. Determination of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran residues in coconut water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UVdetection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 12, p. 1833-1841, 2006.
- 124 AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. Resolução-RE n. 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 21 ago. 2014.
- 125 WANG, K.; LI, H.-N.; WU, J.; JU, C.; YAN, J.-J.; LIU, Q.; QIU, B. TiO₂-decorated graphene nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. **Analyst**, v. 136, p. 3349-3354, 2009.
- 126 ZHIGUOA, G.; SHUPINGA, Y.; ZAIJUNA, L.; XIULANB, S.; GUANGLIA, W.; YINJUNC, F.; JUNKANGA, L. An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe-CdS core-shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene-gold nanocomposite and gold nanoparticle. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 25, p. 9162-9167, 2011.
- 127 INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 5, n. 1, p. 6-13, 2005.
- 128 SADEGHI, S. J.; FERREP. S.; NARDO, G.; GILARDI, G. Drug-drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. **Bioelectrochemistry**, v. 86, p. 87-91, 2012.
- 129 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Espectroscopia no infravermelho. 4. ed. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 15-99.

- 130 BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 47 p.
- 131 ANH, T. M.; DZYADEVYCH, S. V.; VAN, M. C.; RENAULT, N. J.; DUC, C. N.; CHOVELON, J.-M. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. **Talanta**, v. 63, n. 2, p. 365-370, 2004.
- 132 MUWANDA, T.; NYOKONG, T. Facile electrocatalytic oxidation of diuron on polymerized nickel hydroxo tetraamino-phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 81, n. 4/5, p. 1373-1379, 2010.
- 133 AI, S.; GAO, M.; YANG, Y.; LI, J.; JIN, L. Electrocatalytic sensor for the determination of chemical oxygen demand using a lead dioxide modified electrode. **Electroanalysis**, v. 16, n. 5, 404-409, 2004.
- 134 BARD, A. J.; FAULKNER, R. D. **Electrochemical methods-fundamental and applications**. NewYork: Wiley, 2001. 102 p.
- 135 WANG, M. Y.; HUANG, J.; WANG, M.; ZHANG, D.; CHEN, J. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 151, p. 191-197, 2014.
- 136 SAMPHAO, A.; SUEBSANO, P.; WONGSA, Y.; PEKEC, B.; JITCHAREON, J.; KALCHER, K. Alkaline phosphatase inhibition-based amperometric biosensor for the detection of carbofuran. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 3254-3264, 2013.
- 137 JEYAPRAGASAM, T.; SARASWATHI, R. Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide-chitosannanocomposite. **Sensors and Actuators B**, v. 191, p. 681- 687, 2014.
- 138 WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H,31H-phthalocyanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 83-88, 2013.
- 139 SHAMSIPUR, M.; NAJAFIA, M.; HOSSEINI, M.-R. M. Highly improved electrooxidation of glucose at a nickel (II) oxide/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 120-124, 2010.
- 140 SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods: guide to experiments and applications**. Greifswald: Springer, 2009. 88 p.
- 141 MOLINA, A.; MORALES, I. Comparison between derivative and differential pulse voltammetric curves of EC, CE and catalytic processes at spherical electrodes and microelectrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 386-405, 2007.

- 142 ZHENG, N.; ZENG, Y.; OSBORNE, P. G.; LI, Y.; CHANG, W.; WANG, Z. Electrocatalytic reduction of dioxygen on hemin based carbon paste electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 32, n. 2, p. 129-133, 2002.
- 143 LA-SCALEA, M. A; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 371-383, 2007.
- 144 GAO, Y.; CHEN, J. Electrocatalysis of carbon dioxide with hemin and hemin-coated latex. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 583, n. 2, p. 286-291, 2005.
- 145 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 93, n. 2, p. 163-168, 1978.
- 146 TSIERKEZOS, N. G. Cyclic voltammetric studies of ferrocene in nonaqueous solvents in the temperature range from 248.15 to 298.15 K. **Journal of Solution Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 289-302, 2007.
- 147 ARVAND, M.; GHOLIZADEH, T. M.; ZANJANCHIM M. A. MWCNTs/Cu(OH)₂ nanoparticles/IL nanocomposite modified glassy carbon electrode as a voltammetric sensor for determination of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1682-1689, 2012.
- 148 BLANCO-LOPEZ, M. C.; LOBO-CASTANON, M.-J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUNON-BLANCO, P. Voltammetric response of diclofenac-molecularly imprinted film modified carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 2, p. 257-261, 2003.
- 149 KASHEFI-KHEYRABADI, L.; MEHRGARDI, M. A. Design and construction of a label free aptasensor for electrochemical detection of sodium diclofenac. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 184-189, 2012.
- 150 RAZMI, H.; SARHANG-ZADEH, K.; MOHAMMAD-REZAEI, R. Electrochemical behavior and voltammetric determination of diclofenac at a multi-walled carbon nanotube-ionic liquid composite modified carbon ceramic electrode. **Analytical Letters**, v. 46, n. 12, p. 1885-1896, 2013.
- 151 MOKHTAR, A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; BEITOLLAHI, H. Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples. **Sensors Actuators, B**, v. 169, p. 96-105, 2012.
- 152 TEIXEIRA, G. T. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v.24, n. 6, p. 808-818, 2001.

153 ALEXANDER, C.; ANDERSSON, H. S.; ANDERSSON, L.; ANSELL, R. J.; KIRSCH, N.; NICHOLLS, I. A. A.; MAHONY, J.; WHITCOMBE, J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, p. 106-180, 2003.

154 SEECHMNATURAKIT, V.; SUEDEE, R. The synthesis and characterisation of retinol-molecularly imprinted polymers as a selective sorbent in solid-phase extraction. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 2, n. 7, p. 81-93, 2012.

155 MARESTONI, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. T.; SEGATELLI, M. G.; SARTORI, L. R.; TARLEY, C. R. T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194-1207, 2013.

156 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. 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. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.