

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

Estudo e desenvolvimento de sensores biomiméticos baseados
em materiais carbonáceos modificados com ftalocianinacobalto
(II) para detecção amperométrica de metribuzin

EDUARDO CARNEIRO FIGUEIRA

Dissertação de Mestrado
2012

EDUARDO CARNEIRO FIGUEIRA

Estudo e desenvolvimento de sensores biomiméticos baseados em materiais carbonáceos modificados com ftalocianinacobalto (II) para detecção amperométrica de metribuzin

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

F475e	Figueira, Eduardo Carneiro Estudo e desenvolvimento de sensores biomiméticos baseados em materiais carbonáceos modificados com ftalocianinacobalto (II) para detecção amperométrica de metribuzin / Eduardo Carneiro Figueira. – Araraquara : [s.n], 2012 91 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor 1. Química analítica. 2. Sensores biomiméticos. 3. Eletrodos modificados. I. Título.
-------	--

EDUARDO CARNEIRO FIGUEIRA

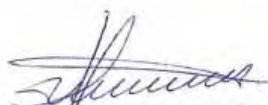
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 25 de abril de 2012.

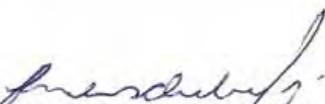
BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Iara Lucia Tescarollo Dias
Faculdade de Americana – FA, Americana



Prof. Dr. Emerson Schwingel Ribeiro
Instituto de Química – UFRJ, Rio de Janeiro

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Eduardo Carneiro Figueira

Nascimento: 01/02/1983

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Araraquara-SP

Estado Civil: Casado

Filiação: Felisberto Dias Figueira e Maria Aparecida Carneiro Figueira

Endereço: Avenida José Nogueira Neves, 375, Bairro Vila Melhado, CEP: 14807-034, Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação: Licenciatura em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 03/2005 a 12/2009

2.2 Pós-graduação: Mestrado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 03/2010 a 03/2012

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Figueira, E. C.; Wong, A.; 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 a detecção de metribuzin. 16ª Encontro Nacional de Química Analítica, Campo de Jordão, outubro de 2011. Apresentação oral.

- Figueira, E. C.; Sotomayor, M. D. P. T.; “Desenvolvimento de Sistemas Biomiméticos para Análise do Agrotóxico Metribuzim”. XVIII – Simpósio Brasileiro de eletroquímica e eletroanalítica, Bento Gonçalves, Agosto de 2011

- Figueira, E. C.; Gomes, N.; Rocha, C. V.; Damasceno, I. Z.; Schiavetto, M.G.; Maruyama, J. A. Silva DA, C. S., Oliveira, O. M. M. F., Oliveira DE, L. A. A.

Dissolução de cloreto de sódio em água: transposição do nível macroscópico para o microscópico. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, maio de 2007.

- Figueira, E. C.; Maruyama, J. A.; Silva DA, C. S.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F.; Oliveira DE, L. A. A. Centro de ciências de Araraquara: uma importante relação na formação de mediadores e na formação inicial de professores de Química. XIII Encontro Nacional de Ensino de Química, Campinas, julho de 2006.

4. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- XXXX Semana da Química, realizada no IQ/CAR, 2010.
- V Evento de Educação em Química, realizada no IQ/CAR, 2007.
- 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia/SP, maio de 2007
- XIII Encontro Nacional de Ensino de Química, Campinas/SP, 2006.
- IV Evento de Educação em Química, realizada no IQ/CAR, 2006.
- III Evento de Educação em Química, realizada no IQ/CAR, 2005.

Eu Dedico este trabalho...

*Primeiramente a Deus por me amar incondicionalmente e por
todas as bênçãos.*

*Aos meus pais, que sempre me incentivaram, apoiaram, acreditaram
e encorajaram a seguir em frente.*

Ao amor da minha vida, que me tornou uma pessoa melhor.

*Aos meus irmãos, que me apoiaram e incentivaram cada um da sua
maneira.*

*Aos demais da minha família e amigos que torceram pelo meu
mestrado.*

*A minha nova família que ganhei ao casar, por todo carinho e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua fidelidade e infinita misericórdia.

A minha família, que sempre me incentivou, apoiou e acreditou em mim. Amo vocês!

A minha esposa, pela dedicação, paciência, amizade, companheirismo, assessoria, apoio e principalmente pelo amor por mim. Amo você imensamente!

A professora Maria Del Pilar, por ser uma mãe científica presente, compreensiva e amiga.

Aos amigos de laboratório André, Ademair e Maricely, pela amizade e ajuda durante o trabalho.

A professora Dra. Rosa Fireman Dutra e ao seu grupo de pesquisa, pela colaboração na confecção dos eletrodos impressos.

A CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq (470419/2009-1) e à FAPESP (2011/12296-6) pelos auxílios financeiros recebidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de eletroanalítica, pela ajuda.

A todos os funcionários do IQ.

A todos, muito obrigado.

*Eu poderia falar todas as línguas que são faladas na terra e até no céu,
mas se não tivesse amor, as minhas palavras seriam como o som de um
gongo ou como o barulho de um sino.*

*Poderia ter o dom de anunciar mensagens de Deus, ter todo o
conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que eu poderia
tirar as montanhas do seu lugar, mas, se não tivesse amor, eu nada
seria.*

*Poderia dar tudo que tenho e até mesmo entregar meu corpo para ser
queimado, mas se eu não tivesse amor, isso não me adiantaria nada.*

1 Coríntios 13,1-3

RESUMO

O presente trabalho está baseado na construção de sensores biomiméticos para monitoramento sensível e seletivo do agrotóxico metribuzin (MTZ). Para isto, eletrodos à base de pasta de carbono e nanotubos de carbono foram modificados com diversos complexos potenciais catalisadores biomiméticos das enzimas P450, que são enzimas que catalisam um grande número de reações incluindo os agrotóxicos. O complexo que apresentou perfil biomimético e melhores resultados na determinação amperométrica do metribuzin foi à ftalocianinacobalto (II) [CoPc]. Quando construídos sensores à base de pasta de carbono modificada com CoPc, os melhores resultados foram obtidos usando 15% (m/m) de complexo na preparação da pasta e realizando as medidas em tampão Britton-Robinson 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), aplicando potencial de -690 mV vs Ag|AgCl. Sob estas condições obteve-se uma faixa linear de resposta de $2,4 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com uma boa sensibilidade e LOD e LOQ de $4,3 \times 10^{-6}$ e $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. Estudos relacionados a elucidar a biomimeticidade do sensor, incluíram avaliação da influência da velocidade de varredura empregando voltametria cíclica, exploração do perfil hiperbólico da resposta do sensor e estudo de interferentes e de seletividade. A seguir, foi avaliada a influencia de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) na preparação da pasta no intuito de tentar aumentar a detectabilidade do sensor modificado com ftalocianinacobalto (II). Entretanto, os resultados obtidos não foram àqueles esperados, devido principalmente, à grande quantidade de material aglutinante (Nujol® que é isolante) necessário para a obtenção da pasta. Assim, a seguir, foi realizada a avaliação de eletrodos impressos à base de grafite, contendo MWCNT a 0,3% e CoPc a 5%, 10% e 15% (m/m). Sob as condições de análises anteriormente otimizadas para a pasta de carbono, o eletrodo impresso que proporcionou melhores resultados foi aquele preparado com 5% de CoPc, obtendo-se uma faixa linear de resposta entre $2,4 \times 10^{-5}$ a $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e LOD e LOQ de $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os sensores preparados usando pasta de carbono modificada e eletrodo impresso modificado com CoPc foram aplicados na análise de amostras de águas de rio, e os resultados obtidos mostraram boa eficiência do sensor desenvolvido na quantificação do metribuzin.

Desta forma, dos resultados aqui obtidos, pode-se concluir que os sensores construídos à base de materiais carbonáceos e CoPc, oferecem ferramentas promissoras de análise para determinação do agrotóxico metribuzin.

Palavras-chave: *Metribuzin, sensores biomiméticos, ftalocianinacobalto (II).*

ABSTRACT

This work is based on the construction of biomimetic sensors for monitoring sensitive and selective pesticide metribuzin (MTZ). For this, the base electrodes of carbon paste and carbon nanotubes have been modified with various complex catalysts potential biomimetic of P450 enzymes, which are enzymes that catalyze a large number of reactions including pesticides. The complex profile that showed better results in biomimetic and amperometric determination of metribuzin was the ftalocianinacobalto (II) [CoPc]. When constructed sensors based on a modified carbon paste CoPc with the best results were obtained using 15% (m/ m) complex in the preparation of the folder and making the measurements in Britton-Robinson buffer 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), by applying potential to -690 mV vs Ag | AgCl. Under these conditions gave a linear response range of 2.4×10^{-5} to 2.0×10^{-4} mol L⁻¹, and with good sensitivity and LOQ and LOD of $4,3 \times 10^{-6}$ and $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectively. Related studies to elucidate the biomimeticidade sensor, included evaluation of the influence of scan rate using cyclic voltammetry, exploitation of hyperbolic profile of the sensor response and the study of interferences and selectivity. Next, we evaluated the influence of carbon nanotubes multi-walled (MWCNT) in the preparation of the folder in order to try to increase the detectability of the sensor modified with ftalocianinacobalto (II). However, the results were not those expected, mainly due to the large amount of binder material (Nujol ® which is an insulator) necessary for obtaining the paste. Thus, the following evaluation was made electrodes printed based on graphite containing MWCNT CoPc 0,3% and 5%, 10% and 15% (m / m). Under the above conditions optimized for the analysis carbon paste, the printed electrode that provided the best results was that prepared with 5% CoPc, yielding a linear response range between $2,4 \times 10^{-5}$ to $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ and LOD and LOQ of $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ and $1,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectively. The sensors prepared using carbon paste electrode modified and printed modified with CoPc were applied in the analysis of samples of river water, and the results showed good efficiency of the sensor developed for quantifying the metribuzin.

Thus, the present results, it can be concluded that the sensors constructed based carbonaceous materials and CoPc offer a promising approach to analysis for determining the pesticide metribuzin.

Keywords: *metribuzin, biomimetic sensors, ftalocianinacobalto (II).*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química do metribuzin.....	25
Figura 2:	Esquema do transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese.....	26
Figura 3:	Esquema de redução do metribuzin proposta por Ludvik <i>et al.</i> ²¹	27
Figura 4:	Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de metribuzin encontradas na literatura.....	29
Figura 5:	Diferentes tipos de nanotubos de carbono ⁵⁰	35
Figura 6:	Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.....	38
Figura 7:	Estrutura química do complexo ftalocianinacobalto (II) [CoPc]..	39
Figura 8:	Fotografia de uma localidade do rio Jacaré-Guaçu que atravessa a região do município de Araraquara, e que foi usado para coleta de amostra.....	43
Figura 9:	Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor.....	44
Figura 10:	Esquema de construção do sensor impresso à base de grafite contendo MWCNT e 5% (m/m) de CoPc. Os sensores de 4 mm de diâmetro (área superficial de 0,071 cm ²) e 15 mm de comprimento ⁶⁸	46

Figura 11:	Representação do sistema de análise em batelada em (A) Esquema representativo e (B) Fotografia da aparelhagem usada.....	48
Figura 12:	Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono sem modificar. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	50
Figura 13:	Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc]. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	51
Figura 14:	Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [CoPc] em diferentes concentrações de metribuzin. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	52
Figura 15:	Voltamograma cíclico para o sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc]. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 5 mV s ⁻¹	53
Figura 16:	Voltamograma cíclico para o sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc] após borbulhar por 40 minutos nitrogênio em solução. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 5 mV s ⁻¹	54
Figura 17:	(A) Voltamograma cíclico para o sensor à base de pasta de carbono modificada com ftalocianina sem centro metálico. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . (B) Voltamograma	

	cíclico para o mesmo eletrodo em tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 5 mV s ⁻¹	55
Figura 18:	Voltamogramas cíclicos para o sensor em 4,8 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de metribuzin e em diversas velocidades de varredura.....	56
Figura 19:	Variação da corrente de pico catódico (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo [CoPc]. contendo 4,8 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de metribuzin.....	57
Figura 20:	Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ , pH 2,0 contendo 4,8 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de metribuzin.....	58
Figura 21:	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do tipo de tampão usado como eletrólito suporte nas análises amperométricas para determinação de metribuzin. Medidas realizadas em - 690 mV vs Ag AgCl (KCl _{sat}).....	59
Figura 22:	Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão BR. Medidas realizadas em - 690 mV vs Ag AgCl (KCl _{sat}).....	59
Figura 23:	Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Amperograma típico obtido para adições sucessivas de 2,4 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de metribuzin.....	61
Figura 24:	Curva analítica construída com os resultados obtidos na amperometria da Figura 23.....	62
Figura 25:	Estruturas químicas do metribuzin e dos agrotóxicos avaliados no estudo da seletividade do sensor.....	65

Figura 26:	Perfil hiperbólico do sensor à base de ftalocianinacobalto (II)....	66
Figura 27:	Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 26...	67
Figura 28:	Esquema do mecanismo proposto para a resposta do sensor...	68
Figura 29:	Variação linear do potencial de redução (E_p) vs $\log v$. Varreduras realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), contendo $4,8 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de MTZ.....	70
Figura 30:	Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com 15% [CoPc] (preto) e à base de pasta de carbono modificada com MWCNT e 15% [CoPc] (azul). Medidas realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), v : 50 mV s ⁻¹ . No gráfico inserido é mostrada uma ampliação do voltamograma em preto.....	71
Figura 31:	Amperograma típico obtido com o sensor à base de MWCNT para adições sucessivas de $2,4 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de metribuzin no potencial de -0,690 V.....	72
Figura 32:	Curva analítica obtida através do amperograma do sensor mostrado na Figura 31.....	73
Figura 33:	Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso sem modificar. Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), v : 50 mV s ⁻¹	74
Figura 34:	Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 5% (m/m). Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L ⁻¹ (pH 2,0), v : 50 mV s ⁻¹	75
Figura 35:	Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 5% (m/m). Medidas realizadas no potencial de -0,600 V.....	75

- Figura 36:** Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 10% (m/m). Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), ν : 50 mV s⁻¹..... 76
- Figura 37:** Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 10% (m/m). Medidas realizadas no potencial de -0,600 V..... 77
- Figura 38:** Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 15% (m/m). Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), ν : 50 mV s⁻¹..... 77
- Figura 39** Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 15% (m/m). Medidas realizadas no potencial de -0,600 V..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Complexos analisados em estudos preliminares.....	49
Tabela 2:	Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de metribuzin.....	60
Tabela 3:	Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.....	63
Tabela 4:	Agrotóxicos analisados no estudo da seletividade.....	64
Tabela 5 :	Comparação das sensibilidades dos eletrodos impressos modificados com MWCNT em diferentes proporções de [CoPc]...	79
Tabela 6:	Resultados obtidos com a modificação do eletrodo de pasta de carbono e eletrodo impresso.....	80
Tabela 7:	Dados obtidos na recuperação de metribuzin em amostras de águas de rios usando o sensor à base de pasta de carbono modificada com 15% (m/m) de [CoPc].....	81
Tabela 8:	Dados obtidos na recuperação de metribuzin em amostras de águas de rios usando eletrodo impresso modificado com MWCNT e 5% (m/m) [CoPc].....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BR – Britton - Robinson
- CE – Contra Eletrodo
- CG – Cromatografia Gasosa
- CL- Cromatografia Líquida
- CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- CoPc – Ftalocianinacobalto (II)
- CNT – *Carbon Nanotube*
- EC – *Electrochemical/Chemical*
- EI – Eletrodo Impresso
- EPA – *Environmental Protection Agency*
- EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono
- EQM – Eletrodo quimicamente modificado
- ER – Eletrodo de Referência
- ET – Eletrodo de Trabalho
- i_{pc} – Corrente de pico catódico
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LMR – Limite máximo de resíduos
- LOD – Limite de Detecção
- LOQ – Limite de Quantificação
- MIP - *Molecularly Imprinted Polymers*
- MTZ – Metribuzin
- MWCNT – *Multi-Walled Carbon Nanotubes*
- PARA – Programa nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
- sat – Saturado
- RSD – Desvio padrão médio relativo (*Relative standard deviation*)
- SWCNT – *Single Walled Carbon Nanotubes*
- UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
- VC – Voltametria Cíclica

Lista de Símbolos

i - corrente elétrica

V - Volts

v - velocidade de varredura

μ - micro

A – ampères

t – tempo

$^{\circ}C$ – graus Celsius

Ω - ohm

σ - desvio padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Considerações gerais	22
1.2. Agrotóxicos.....	23
1.3. Metribuzin.....	25
1.4. Métodos de determinação de metribuzin.....	28
1.5. Técnicas eletroanalíticas.....	30
1.5.1. Voltametria Cíclica (VC).....	30
1.5.2. Cronoamperometria.....	30
1.6. Eletrodos quimicamente modificados.....	31
1.6.1. Eletrodo de pasta de carbono (EPC).....	32
1.6.2. Eletrodos impressos (EI).....	33
1.6.3. Nanotubos de carbono.....	34
1.7. Sensores eletroquímicos.....	36
1.7.1. Sensores amperométricos.....	37
1.7.1.1. Sensores biomiméticos.....	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1. Instrumentação básica.....	41
3.2. Reagentes e soluções.....	41
3.2.1. Preparo das soluções utilizadas.....	42
3.3. Construção dos sensores.....	43
3.3.1. Sensor biomimético de pasta de carbono modificada.....	43
3.3.2. Sensor biomimético modificado com nanotubo e ftalocianinacobalto (II).....	45
3.3.3. Sensor biomimético impresso.....	45
3.4. Medidas eletroquímicas.....	47
3.4.1. Sistema de análise em batelada para determinação de metribuzin.....	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Sensor à base de pasta de carbono modificada [CoPc].....	49
4.1.1. Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos voltamétricos.....	49
4.1.2. Otimização da resposta do sensor.....	58
4.1.3. Perfil de resposta do sensor.....	61
4.1.4. Estudo da seletividade.....	64
4.1.5. Verificação do caráter biomimético do sensor.....	66
4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor.....	67
4.2. Sensor à base de pasta de carbono modificada com nanotubo de carbono e [CoPc].....	70
4.3. Sensor impresso de grafite modificado com MWCNT e [CoPc].....	74
4.4. Comparação de três sensores contruídos.....	79
4.5. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras ambientais (rios).....	81
5. CONCLUSÕES	83
6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os ecossistemas naturais caracterizam-se pela alta diversidade de espécies vegetais e por uma grande variabilidade genética dentro de cada espécie, porém têm sido alterados seguidamente pelo homem, pois este vem usufruindo os recursos naturais sem levar em consideração todo o cuidado necessário com sua reposição ou preservação e, com isso, muitos recursos hídricos se encontram em situação precária, seja pela atividade agrícola ou por outras atividades antrópicas.

Diversos exemplos poderiam ser citados, mas talvez o mais evidente seja o processo de produção de alimentos. A cada dia é necessário produzir-se mais para alimentar mais pessoas. O crescimento contínuo da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas cada vez mais eficientes. Neste sentido, o uso de agrotóxicos para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita tornou-se uma ferramenta essencial para garantir o crescimento e a qualidade da produção agrícola¹⁻⁴.

A utilização de agrotóxicos na agricultura vem obtendo cada vez mais destaque no cenário mundial. Atualmente existem mais de 800 compostos, pertencentes à cerca de 100 classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos de produtos comercializados como agrotóxicos no mundo todo⁴⁻⁷.

Contudo, a busca incessante da produtividade tem levado o homem a cometer alguns erros e exageros no manejo das culturas e a causar impactos ambientais, muitas vezes irreversíveis. De fato, na agricultura, a irrigação e o controle de pragas e doenças são práticas imprescindíveis para se obter uma produção rentável e de boa qualidade. Entretanto, o uso dessas técnicas pelos agricultores, muitas vezes de forma indiscriminada, vem provocando danos ambientais diversos, gastos desnecessários de grandes volumes de água, insucesso no controle de inimigos das culturas e comprometimento da qualidade ambiental e dos alimentos. Para a agricultura, agrotóxicos são e continuarão a ser ferramentas valiosas no controle de pragas e doenças das plantas cultivadas, porém o seu uso deve estar associado a uma análise de custo benefício social e ambiental mais

preciso e realístico, para que se possam minimizar os riscos e maximizar os benefícios dessa estratégia de controle de pragas, tanto para a sociedade quanto para o meio ambiente^{2,8-10}.

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos^{11,12}. No Brasil, que é detentor de um grande potencial agrícola e o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo¹³, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)¹¹⁻¹⁴ determinando assim que o limite máximo de resíduos (LMR) permitido para o analito alvo do trabalho é de 0,1 ppm.

O programa PARA tem como objetivos principais, avaliar a segurança para o consumo do alimento tratado; detectar resíduos devido ao uso impróprio do agrotóxico ou de agrotóxicos de uso não autorizado para determinada cultura; proteger a credibilidade de exportadores perante seus clientes e melhorar ações contra o uso impróprio destes produtos¹⁴.

1.2. AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos estão dentre os compostos prioritários mais investigados nos produtos agrícolas, devido ao seu amplo uso e à sua toxicidade, dessa forma existem diversas definições para agrotóxicos, mas de acordo com a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), são produtos e agentes químicos ou biológicos cuja finalidade é alterar a composição da flora e da fauna a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos¹⁵.

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (grupo funcional) e com o tipo de pragas alvo, como por exemplo: *Inseticidas*, quando combatem as pragas, matando-as por contato e ingestão; *Fungicidas*, quando agem sobre os fungos impedindo a germinação, colonização ou erradicando o patógeno dos tecidos das plantas; *Herbicidas*, quando agem sobre as ervas daninhas seja pré-emergência como pós-emergência; *Acaricidas*, quando eliminam os acarinos; *Nematicidas*, quando

eliminam os nematóides do solo; *Moluscidas*, quando controlam lesmas; *Raticidas*, quando agem sobre os ratos; *Bactericidas*, quando controlam as bactérias.

Na escolha do agrotóxico mais adequado deve-se considerar¹⁵:

- a) a incidência da doença ou praga;
- b) a formulação do produto;
- c) a possibilidade de se escolher um produto menos tóxico;
- d) se o uso de agrotóxico não trará desequilíbrio na cultura;
- e) qual o intervalo mínimo entre a aplicação e a colheita;
- f) se o agrotóxico é recomendado para aquela praga, doença ou erva daninha;
- g) no caso do uso de dois produtos se estes são compatíveis.

Suas funções básicas na agricultura incluem a elevação da produção com aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e a redução do trabalho e dos gastos com energia. Sem dúvida esses objetivos foram alcançados nas últimas décadas. No entanto, o uso indiscriminado e pouco criterioso de agrotóxico trouxe e continua trazendo problemas muito sérios para o ambiente e para a saúde humana¹⁶.

Há uma enorme preocupação também com os mananciais hídricos, tanto superficiais quanto subterrâneos, que estão expostos aos agrotóxicos aplicados em áreas agrícolas e não agrícolas, pois a presença desses agrotóxicos em águas subterrâneas pode apresentar problemas com relação à qualidade da água para consumo humano, visto que a tendência é de acúmulo das concentrações desses agrotóxicos ao longo dos anos.

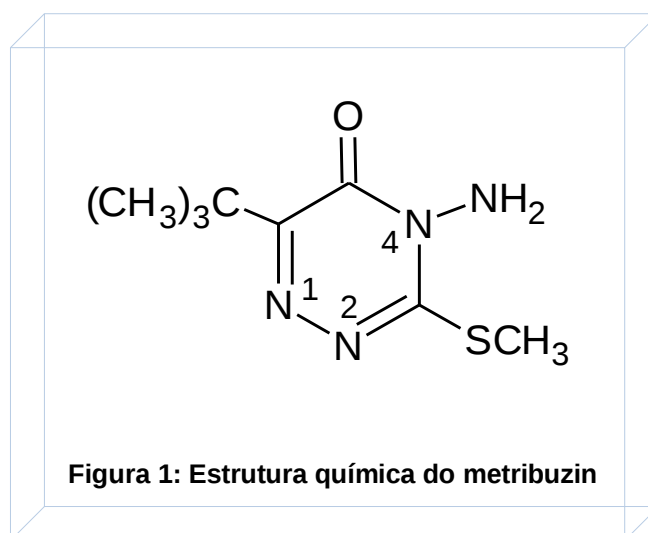
As principais vias de contaminação por agrotóxicos são: aplicação direta na água, lixiviação do solo de áreas contaminadas, contaminação de águas subterrâneas por percolação do solo, liberação de efluentes industriais, usos domésticos e despejos de materiais de descarte¹⁷.

Diante desse contexto, é inquestionável a necessidade de se desenvolver métodos analíticos eficazes e adequados para monitorar resíduos de agrotóxicos em alimentos e água, que contemplem os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelos órgãos competentes e que possam ser adaptados a medidas confiáveis e *in situ*.

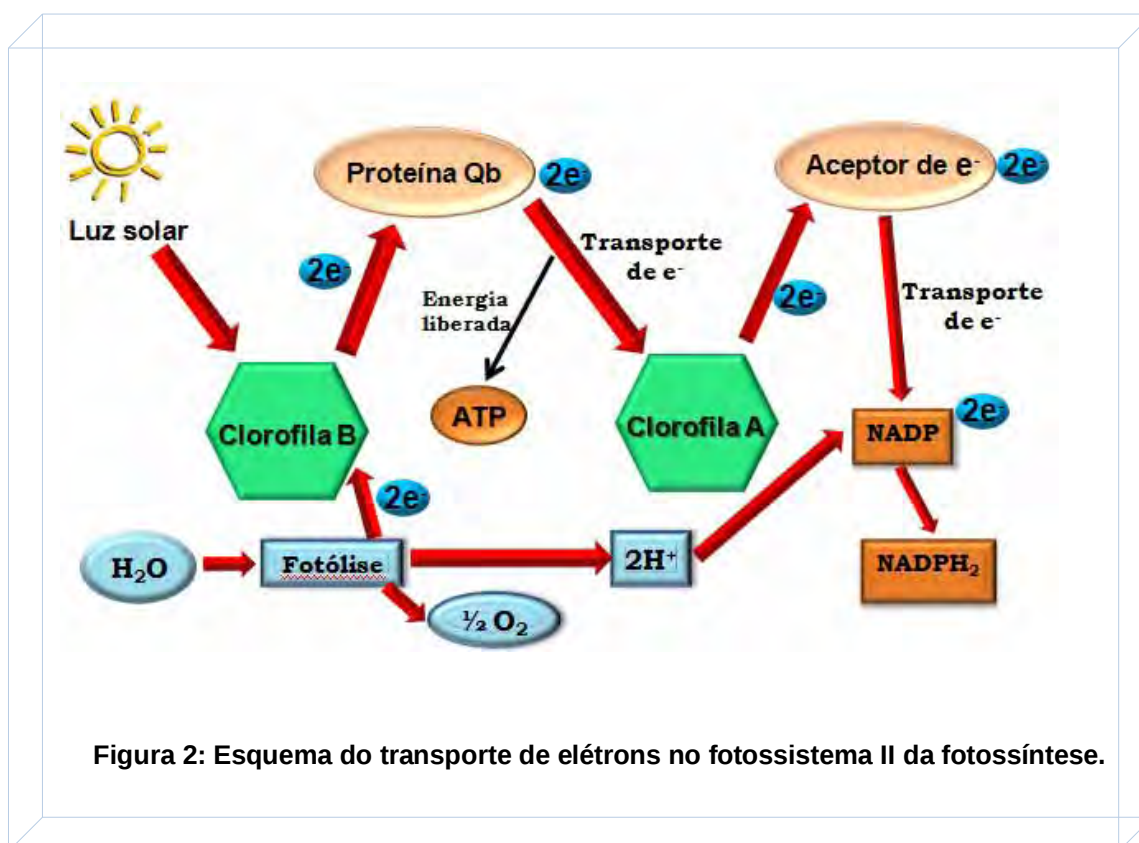
1.3. METRIBUZIN

O metribuzin, (4-amino-6-terbutil-3-metiltio-1,2,4-triazina-5(4H)-ona) cuja estrutura é mostrada na Figura 1, é um herbicida pertencente ao grupo das triazinonas e possui uma classificação toxicológica entre III e IV, dependendo da formulação utilizada, ou seja, não é muito tóxico¹⁸.

O herbicida puro é um cristal incolor com ponto de fusão 125,5 °C a 126,5 °C. A solubilidade a 20 °C é 1,05g/L na água, 820g/kg na acetona, 220g/kg no benzeno, 850g/kg no clorofórmio e 190g/kg em etanol.



Este herbicida é usado em pré e pós plantio em pré emergência, bem como no plantio direto para o controle de ervas daninhas em culturas de soja e em pós plantio nas culturas de batata, cana-de-açúcar, café, aspargo, mandioca, tomate e trigo¹⁸. Sua forma de ação é por meio da inibição do transporte de elétrons no fotossistema II, inibindo assim a produção de energia para a realização da fotossíntese (figura 2), além de causar um acúmulo de elétrons no ponto de inibição (proteína QB), que por sua vez promove uma peroxidação dos lipídeos¹⁹.



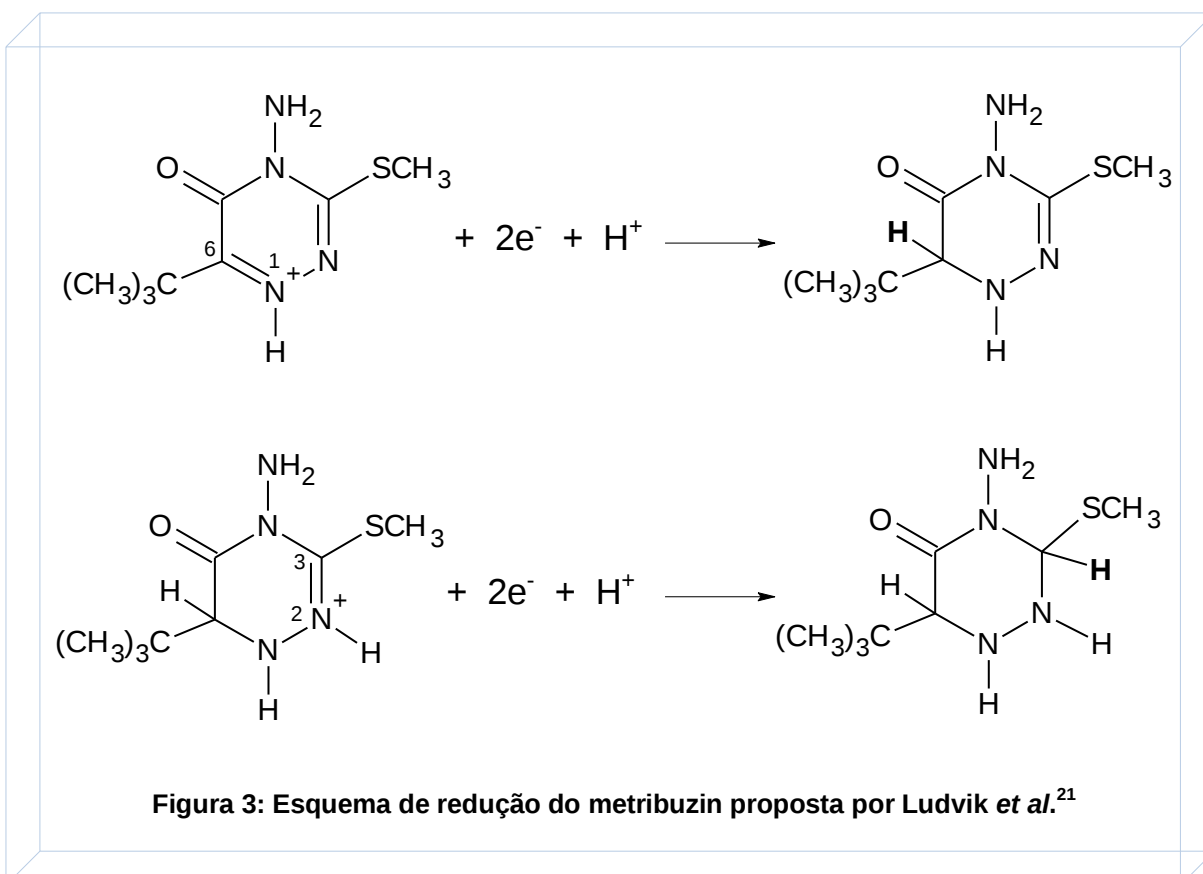
Fonte: elaborada pelo autor.

No ambiente (solo e água) o metribuzin apresenta persistência (meia-vida) de 1 a 2 meses dependendo da textura do solo e das condições climáticas. Este herbicida é moderadamente adsorvido na maioria dos solos, apresenta alta afinidade com a matéria orgânica do solo e é adsorvido com menor intensidade nas argilas. A adsorção diminui com o aumento do pH. Além disso, é lixiviável em terrenos arenosos com baixo teor de matéria orgânica, possui potencial intermediário de lixiviação em solos de textura média, e é imóvel em solos pesados (alto teor de matéria orgânica)¹⁹.

Uma explicação para os processos de redução dos pesticidas contendo o anel 1,2,4-triazina (Figura 1) é muito importante, pois tais processos estão diretamente envolvidos na degradação de pesticidas desta classe. Além disso, o melhor entendimento do processo de redução é essencial para o desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas que possibilitem a análises destes pesticidas em diversos tipos de amostras²⁰.

Neste sentido, Ludvik *et al.*²⁰, realizaram um estudo mecanístico da redução eletroquímica do herbicida metribuzin em solução 30% v/v de acetonitrila/água com

o eletrodo de gota pendente de mercúrio, utilizando a polarografia de corrente direta, a voltametria cíclica e a eletrólise a potencial controlado. Segundo os autores, o herbicida é reduzido em duas etapas envolvendo dois elétrons cada, como mostrado na Figura 3.



Na primeira etapa, a forma protonada da ligação azometina (1,6) é reduzida à amina correspondente e posteriormente, em um potencial mais negativo, a forma protonada da ligação azometina (2,3) é reduzida.

Skopalová *et al.*²¹ avaliaram também o processo redução do metribuzin em eletrodo de mercúrio, bem como o estabelecimento de um procedimento voltamétrico de análise utilizando a polarografia de corrente direta, voltametria cíclica, de pulso diferencial e coulometria a potencial controlado em soluções aquosas com pH variável. Em meio ácido, o herbicida apresentou dois picos de redução ($E_{p1} = -0,45$ V e $E_{p2} = -0,7$ V vs Ag|AgCl, KCl_{sat}) com características de processo irreversível. A primeira etapa de redução (-0,45 V) foi utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada em redissolução adsortiva

com voltametria de pulso diferencial (DPAdSV: *differential pulse adsorptive stripping voltammetry*) que ofereceu um limite de detecção de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$. A metodologia apresentou boa reprodutibilidade (2,53% para uma solução de metribuzin igual a $2 \mu\text{g L}^{-1}$) e foi empregada para a análise em amostras de águas de rio, com recuperações em torno de 97%. Contudo, nenhum estudo foi realizado para avaliar a seletividade do método proposto. Por outro lado, o emprego de eletrodo gotejante de mercúrio dificulta seu uso em relação a análises *in situ*, *on line*, ou mesmo ambientalmente seguras, uma vez que é conhecida a toxicidade deste metal.

Assim torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para determinação do metribuzin com o uso de outros tipos de eletrodos sólidos como alternativas ao mercúrio, e que adicionalmente sejam de construção simples, baixo custo, e analiticamente confiáveis.

1.4. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE METRIBUZIN

Realizou-se um levantamento bibliográfico em fonte de consulta eletrônica (*Scifinder Scholar*®) utilizando as palavras chaves: *metribuzin and determination or analysis* no qual foram encontradas 640 publicações sobre métodos analíticos para a determinação deste agrotóxico no período compreendido de 1971 a 2010. Na Figura 4, tem-se a distribuição dessas publicações.

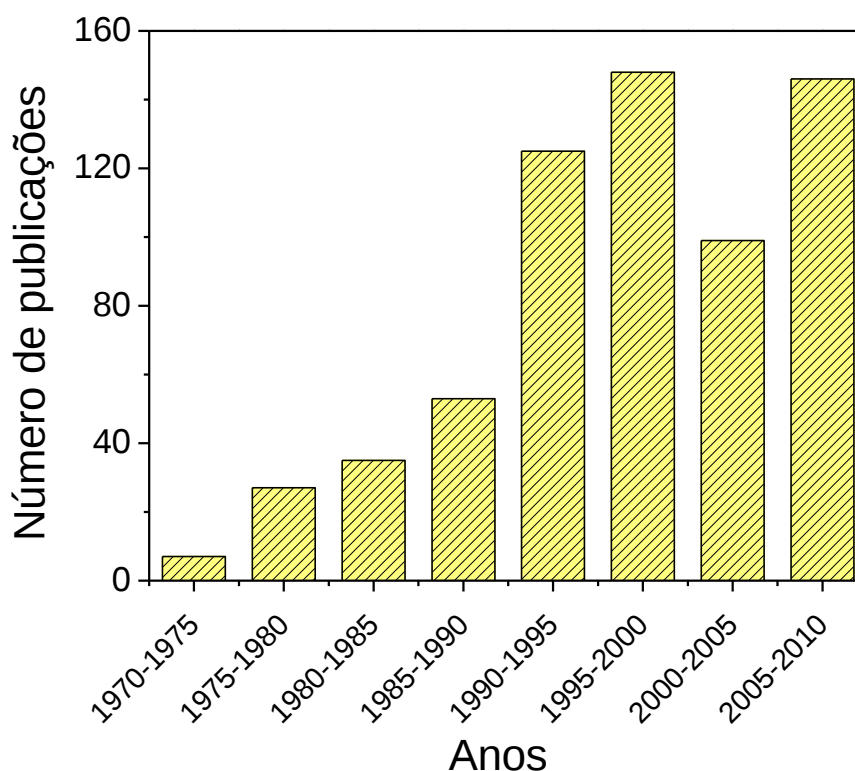


Figura 4: Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de metribuzin encontradas na literatura.

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos para determinação de metribuzin em amostras de solo e água. Os principais métodos de análise são os cromatográficos, tais como a cromatografia gasosa (CG)²²⁻²⁴, cromatografia líquida (CL)²⁵, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)²⁶, CLAE acoplada à espectrometria de massas²⁷, além da cromatografia eletrocinética micelar²⁸ e cromatografia líquida com detecção amperométrica²⁹.

Entretanto, metodologias baseadas em métodos eletroanalíticos ainda são escassas, principalmente devido à falta de estudos em relação à redução do metribuzin em diversos tipos de eletrodos, além do mercúrio.

1.5. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

1.5.1. Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta na sua habilidade de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica do processo redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. Esta técnica é frequentemente o primeiro experimento utilizado em um estudo eletroquímico, pois oferece rapidamente a localização do potencial redox da espécie eletroativa e avaliação conveniente do efeito do meio no processo redox.

A voltametria cíclica consiste na varredura linear de potencial de um eletrodo de trabalho estacionário, utilizando uma variação de potencial de forma triangular, de maneira que a varredura se inicia em valor de potencial no qual nenhuma reação ocorre, seguindo até o potencial de inversão e retornando, geralmente ao ponto inicial³⁰.

1.5.2. Amperometria

Os cronometodos são métodos eletroanalíticos nos quais a magnitude de um sinal elétrico é medida em função do tempo. Os parâmetros elétricos medidos podem ser a corrente (como no caso da amperometria) no qual o processo é iniciado por um pulso de potencial ou potencial aplicado; ou pode ser o potencial (na cronopotenciometria), no qual o processo por sua vez é iniciado pela circulação de um fluxo de corrente no eletrodo de trabalho.

A amperometria a potencial constante é a classe das medidas eletroanalíticas nas quais a corrente que flui através do eletrodo de trabalho é monitorada em função do tempo, a um potencial fixo no qual ocorre a reação redox do substrato de interesse. Em sistemas em que a espécie eletroativa encontra-se adsorvida na superfície do eletrodo, como no caso dos eletrodos quimicamente modificados, quando aplicado um potencial fixo, ocorre a redução ou a oxidação total do mediador, a corrente estabiliza eletroquimicamente a espécie (analito) a qual

se deseja determinar, observando-se uma variação de corrente devido ao processo catalítico. Se a corrente observada apresentar uma correlação linear com a concentração do analito, tal eletrodo modificado pode ser utilizado como sensor amperométrico^{31,32}. E essa é a base teórica utilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Por outro lado, métodos crono-eletroquímicos permitem o acoplamento de sensores a sistemas em fluxo, permitindo a automatização das análises, visando monitoramento *on line* e/ou em tempo real³³.

1.6. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Na década de 70, Murray e colaboradores³⁴ deram a denominação de eletrodo quimicamente modificado (EQM), àqueles eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. O principal objetivo dessa modificação é alterar a reatividade e seletividade do eletrodo base, favorecendo assim, o desenvolvimento de sensores para vários fins e aplicações, desde catálise de reações orgânicas e inorgânicas³⁵ até a transferência de elétrons em moléculas de interesse³⁶.

Para a preparação de um eletrodo quimicamente modificado (EQM), um aspecto importante é a escolha do material para o eletrodo base, sendo que este material deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Os materiais mais utilizados para a modificação na superfície do eletrodo são ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono³⁷.

No desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados, na busca por dispositivos altamente seletivos, é realizada a imobilização de um modificador químico ou biológico na superfície dos EQMs.

Existem vários métodos de imobilização de materiais solúveis e insolúveis em eletrodos à base de materiais carbonáceos como pasta de carbono, grafite ou nanotubos de carbono, dentre os quais os mais comumente usados são a adsorção, a oclusão e a ligação covalente.

Brevemente, a técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos, pois envolve a interação física do modificador e a superfície do eletrodo, sendo um processo simples e rápido, podendo ser aplicado em vários tipos de superfícies eletródicas, mas esta técnica possui a desvantagem de produzir EQM's com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que geralmente limita a faixa de resposta linear³⁷. Por outro lado, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização (conhecido como lixiviação), resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM preparado desta forma³⁷.

Na imobilização por ligação covalente, o modificador é fixado na superfície eletródica pela ligação química, oferecendo um método estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo. É um método bastante estável em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo de reação, além de ser mais difícil de executar. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado na obtenção de biossensores^{37,38}.

O método oclusão, utilizado principalmente na preparação de pastas de carbono modificadas, baseia-se na inclusão de um modificador dentro de uma matriz que servirá de suporte para a obtenção do EQM.

1.6.1. Eletrodo de pasta de carbono (EPC)

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

O primeiro EPC foi desenvolvido por Adams³⁹, com intuito de substituir o eletrodo gotejante de mercúrio. Seu objetivo era atingir potenciais mais positivos, nos quais o eletrodo de mercúrio não podia ser aplicado. Os primeiros trabalhos de

Adams visaram a caracterização do EPC, aplicando técnicas básicas em eletroquímica⁴⁰.

O emprego de sensores amperométricos à base de pasta de carbono tem demonstrado um aumento exponencial durante os últimos 40 anos, como consequência da aplicabilidade nos mais diversos meios, assim como a versatilidade na preparação da pasta, a qual pode ir desde a forma convencional pela mistura de pó de grafite e algum modificador seletivo (enzimas ou catalisadores redox), até dispositivos mais elaborados que usam polímeros molecularmente impressos (MIP)⁴¹ e nanotubos de carbono⁴².

Pastas de carbono basicamente usam uma mistura de grafite em pó, modificador(es) e um aglutinante, que pode ser parafina⁴³ ou óleo mineral⁴³, e que tem a função de tornar a pasta estável em contato com soluções aquosas (eletrólito). O material aglutinante serve também para fixar a pasta ao eletrodo e preencher as cavidades entre as partículas de grafite.

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

Deve-se ressaltar que quando construídos sensores à base de pasta de carbono, onde o modificador é imobilizado apenas por oclusão, o mesmo deverá ser insolúvel no eletrólito no qual serão realizadas as medidas eletroquímicas.

O uso de pasta de carbono continua a ser atraente porque além da versatilidade oferecida para a preparação da pasta, esses sensores demonstram ter alta estabilidade química, elevada atividade eletrocatalítica e, baixas correntes capacitivas.

1.6.2. Eletrodos impressos (EI)

A tecnologia de *screen-printing*, mais conhecida como *silk-screen*, tem sido empregada com grande sucesso na fabricação de eletrodos nesta última década. Ao mesmo tempo em que possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo

extremamente baixo, é simples e pode ser praticada em qualquer laboratório, sendo apropriada para produção de eletrodos e sensores descartáveis⁴⁴.

O processo de confecção dos Els é baseado na deposição de finos filmes condutores sobre substratos inertes. A impressão do filme é feita através de um molde em contato com o substrato, no qual o filme é depositado pela transferência do padrão do molde (Figura 10, página 46). Os substratos mais utilizados para confecção dos Els são materiais de cerâmica e à base de plástico⁴⁴.

Os Els podem ser facilmente modificados através da adição de materiais funcionais à tinta de impressão, tais como mediadores, moléculas biológicas, nanomateriais, etc., ou através da modificação direta da interface do sensor⁴⁵.

Entre as principais vantagens oferecidas pela tecnologia de Els podem ser destacadas: a flexibilidade no design do sensor, escolha do material de impressão, portabilidade, fácil integração com circuitos eletrônicos, automação no processo, produção em massa e baixo custo⁴⁶.

Eletrodos impressos modificados podem ser facilmente elaborados uma vez que os inúmeros artifícios utilizados para modificação dos eletrodos de pasta de carbono também se adequam aos Els⁴⁷, fornecendo, desta forma, ferramentas altamente versáteis e promissoras para diversos tipos de aplicação.

1.6.3. Nanotubos de carbono

Desde sua descoberta, em 1991⁴⁸, os nanotubos de carbono (CNTs) têm despertado um grande interesse de diferentes aplicações, devido às suas características próprias como propriedades eletrônicas, grande resistência mecânica e suas propriedades químicas⁴⁹.

Do ponto de vista estrutural, há dois tipos de CNTs que a maioria dos métodos de síntese produz: os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) cuja sigla deriva do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*, que podem ser considerados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico e os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT), do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*, que compreendem um conjunto de três ou mais nanotubos concêntricos enrolados sobre si, como mostrados na Figura 5.

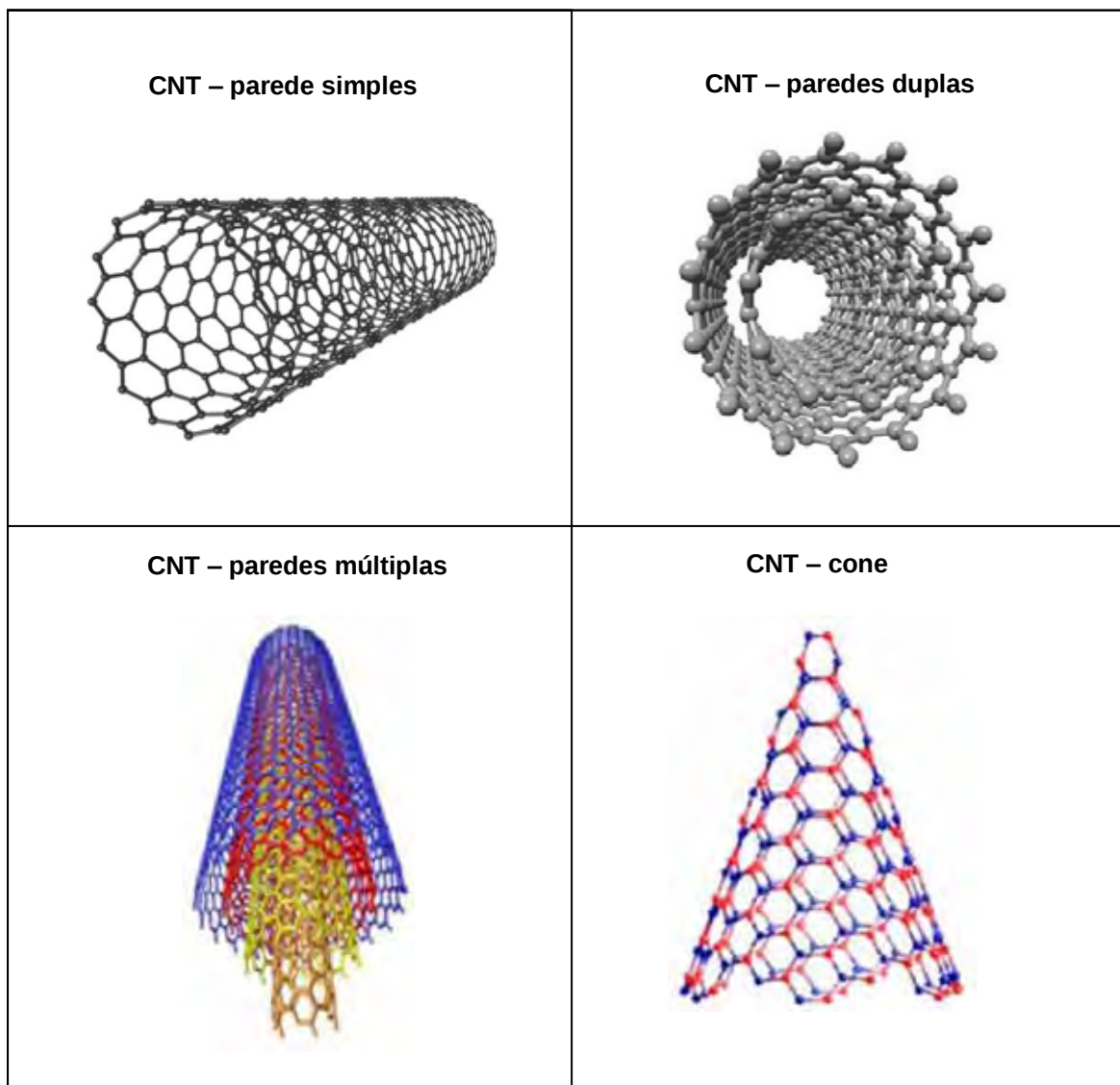


Figura 5: Diferentes tipos de nanotubos de carbono⁵⁰.

Entretanto, outros tipos de CNTs podem ser sintetizados devidos a variações das condições de síntese, esses CNTs são: nanotubos de carbono de paredes duplas, nanotubos de carbono alinhados, nanotubos de carbono em formato de cone, dentre outros⁵⁰.

Os nanotubos de carbono são usados em diferentes áreas tecnológicas, e um campo de aplicação bastante adequado é no de desenvolvimento de sensores eletroquímicos, seu uso radica principalmente no aproveitamento de suas propriedades atraentes como, grande área superficial, permitindo uma amplificação do sinal analítico; e na possibilidade de obter respostas eletrocatalíticas, a qual pode

ser atribuída ao fato dos CNTs possuírem um mecanismo de transporte de elétrons que pode variar desde o tipo de semicondutor até o tipo metálico⁵⁰.

Assim, este tipo de material se apresenta como uma alternativa adicional de modificador que pode ser aproveitada na construção de EQMs para obtenção de sensores altamente sensíveis.

1.7. SENSORES ELETROQUÍMICOS

A utilização de sensores eletroquímicos para determinação de concentrações de substâncias e de outros parâmetros de interesse tem sido bastante referida na literatura científica. Desde que começaram a ser utilizados os sensores eletroquímicos têm permitido uma melhora nas execuções de análise que antes eram realizadas por métodos analíticos convencionais, diminuindo o tempo de preparação da amostra e a utilização de reagentes dispendiosos, permitindo a utilização de instrumentos analíticos de baixo custo. O fato de serem altamente sensíveis, seletivos, portáteis, de baixo custo e de simples utilização faz com que estes sensores tenham vantagens em relação à outras metodologias analíticas.

Os sensores eletroquímicos oferecem numerosas aplicações em diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e análise alimentar, permitindo efetuar análises rápidas *in situ*, determinando diversas substâncias com propriedades diferentes em diferentes tipos de amostras⁵¹.

Um sensor químico consiste em um elemento de transdução acoplado (intimamente ligado) a uma camada de reconhecimento química ou biológica. Esta camada interage com o analito, resultando em alterações químicas ou bioquímicas que são traduzidas pelo transdutor em sinais fisicamente mensuráveis, como geração de corrente elétrica, mudança de cor, variação de massa, etc⁵². A camada de reconhecimento tem um papel importante na resposta do sensor, dado que é responsável pela sua seletividade a um determinado analito ou um grupo de analitos, evitando interferências de outras substâncias⁵³. A obtenção de informação analítica, que se pode traduzir, por exemplo, na obtenção da concentração de uma espécie ou mais, depende essencialmente da camada de reconhecimento em reconhecer a espécie de interesse, de forma seletiva.

Sensores eletroquímicos fazem parte de uma subclasse importante dos sensores químicos nos quais um eletrodo é utilizado como o elemento de transdução⁵², que dentre os vários transdutores existentes, se destaca pela sua facilidade de uso e de registro dos sinais que podem ser potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, condutométricos e impedimétricos.

Adicionalmente, deve ser considerado que as reações eletrolíticas nos sensores eletroquímicos são heterogêneas e tem lugar apenas na pequena região interfacial entre o eletrodo e a solução, região onde a distribuição de carga e concentração do analito diferem do restante da solução.

1.7.1. Sensores Amperométricos

Os sensores amperométricos constituem-se em dispositivos mantidos em potencial fixo e que propiciam sinais de corrente faradáica proporcionais à concentração do analito, em função de processos eletródicos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Adicionalmente, deve-se considerar que a corrente medida em experimentos amperométricos também possui um componente capacitivo, associado a mudanças da capacitância da dupla camada elétrica e que é função direta do potencial aplicado.

O transporte de massa neste tipo de sensores ocorre preferencialmente por difusão, sendo a migração e a convecção minimizadas através de condições experimentais favoráveis. Esses dispositivos são normalmente operados por uma limitação da difusão, sendo a corrente gerada afetada pela velocidade com a qual o analito se difunde até a superfície do eletrodo^{31,54}. Neste contexto, o uso de elementos de reconhecimento, que promovam processos catalíticos na presença do analito, permitirão a obtenção de correntes elevadas, e que ajudará a vencer a dependência da corrente obtida apenas pela quantidade de analito chegando à superfície do eletrodo através do processo difusional.

1.7.1.1. Sensores biomiméticos

Sensores biomiméticos são uma nova estratégia experimental que tem sido usada para obter sensores amperométricos mais estáveis e duradouros, porém ainda seletivos como os biossensores enzimáticos convencionais. Estes dispositivos visam vencer as limitações dos biossensores enzimáticos tais como disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas; assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox)/ substrato, uma vez que, nos sensores biomiméticos o “sítio ativo” encontra-se descoberto diferentemente do que acontece nas enzimas, onde o sítio ativo encontra-se rodeado pela densa camada de aminoácidos residuais^{55,56}.

Uma condição para mimetizar ou escolher uma enzima adequada para a construção de sensores biomiméticos é que a química da catálise da reação enzimática e a estrutura do sítio ativo da enzima sejam muito bem conhecidas, e neste sentido as enzimas P450, encaixam-se perfeitamente nestes requerimentos.

Todas as enzimas P450 contêm um sítio ativo comum que é a protoporfirina de ferro IX (Figura 6), que é o grupo prostético encontrado em todas as enzimas citocromo P450. O papel deste grupo hemino nas diferentes citocromos P450, varia em função da natureza dos ligantes próximos ao grupo prostético e do substrato que será catalisado.

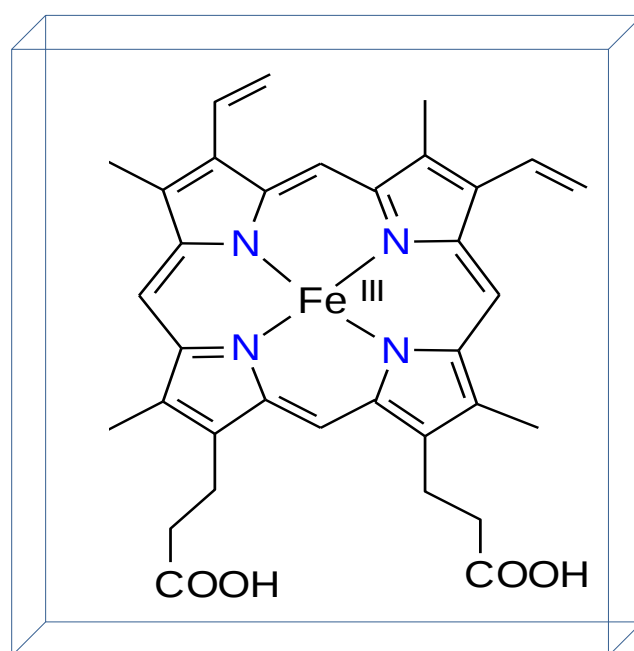


Figura 6: Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450

Compostos derivados das ftalocianinas e porfirinas de ferro, manganês e cobalto, têm sido satisfatoriamente empregados em meio aquoso na tentativa de mimetizar o sítio ativo das P450, porém somente nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa têm desenvolvido sensores biomiméticos tomando como modelo esta enzima, resultando em sistema de análise úteis e com aplicações realmente promissoras^{51,57-62}.

Dentre os complexos que podem ser avaliados como possíveis catalisadores biomiméticos da P450, devido à semelhança com a protohemina IX, encontra-se a ftalocianinacobalto (II) [CoPc] (Figura 7), e conhecendo a potencialidade biomimética deste complexo⁶², a construção de sensores usando este composto redox, se torna viável para o desenvolvimento de uma técnica sensível e seletiva para determinação de metribuzin.

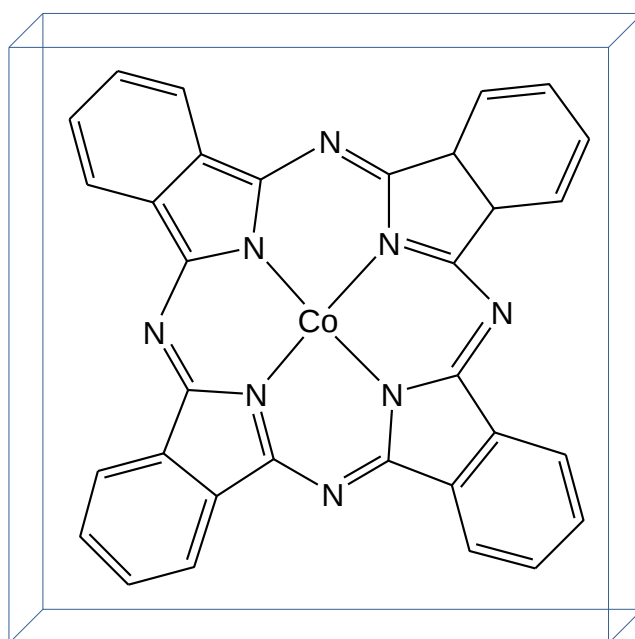


Figura 7: Estrutura química do complexo ftalocianinacobalto (II) [CoPc]

Embora seja conhecida a capacidade da CoPc para catalisar muitas reações de oxidação⁶³⁻⁶⁷, ao nosso conhecimento, nenhum trabalho tem sido descrito na literatura explorando a região da redução para a detecção sensível e seletiva de algum agrotóxico, e é neste sentido que este trabalho mostra a viabilidade de uso deste complexo para a eletrocatalise redutiva do metribuzin.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho de mestrado visa o desenvolvimento de um sensor amperométrico à base de catalisadores biomiméticos da enzima P450, na determinação do herbicida metribuzin em amostras de interesse ambiental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Otimização dos parâmetros experimentais da metodologia desenvolvida;
- 2.2.2. Determinação das principais figuras de mérito da metodologia;
- 2.2.3. Aplicação do método para a determinação do herbicida metribuzin (MTZ) em água de rio.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA

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

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

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

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

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

3.2.1 Preparo das soluções utilizadas

a) Solução estoque do herbicida metribuzin: A solução estoque do analito foi preparada pela dissolução de 11 mg de metribuzin em 500 μL de acetonitrila, transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,00 mL tendo seu volume completo com água deionizada. Obtendo uma solução de concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

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

c) Solução dos possíveis compostos interferentes: Para o estudo da seletividade, uma massa adequada de cada um dos agrotóxicos avaliados foi pesada e dissolvida em 500 μL de acetonitrila, transferindo-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL tendo seu volume completo com água deionizada, obtendo assim a concentração padrão de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

d) Obtenção e preparação das amostras ambientais (rios): As amostras de águas de três rios da região de Araraquara (Figura 8) foram coletadas e enriquecidas com metribuzin na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a seguir analisadas pelo sensor proposto em sistema em batelada, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.



Figura 8: Fotografia de uma localidade do rio Jacaré-Guaçu que atravessa a região do município de Araraquara, e que foi usado para coleta de amostra.

3.3. CONSTRUÇÃO DOS SENSORES

3.3.1 Sensor biomimético de pasta de carbono modificada

Para a construção do sensor proposto e após terem sido testadas sete ftalocianinas e porfirinas metálicas, foi usado o complexo *ftalocianinacobalto* (II) [CoPc], na modificação da pasta de carbono, pois foi aquele que apresentou os melhores resultados.

A preparação da pasta de carbono para determinação de metribuzin foi realizada misturando 85 mg de pó de grafite, 15 mg do complexo *ftalocianinacobalto* (II) e 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e a seguir deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se 60 µL do agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®) para a obtenção da pasta de carbono e esta quando era usada, era armazenada a seco.

A pasta de carbono modificada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro ($0,126 \text{ cm}^2$) e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo (Figura 9). Finalmente a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo, a fim de obter uma superfície homogênea.

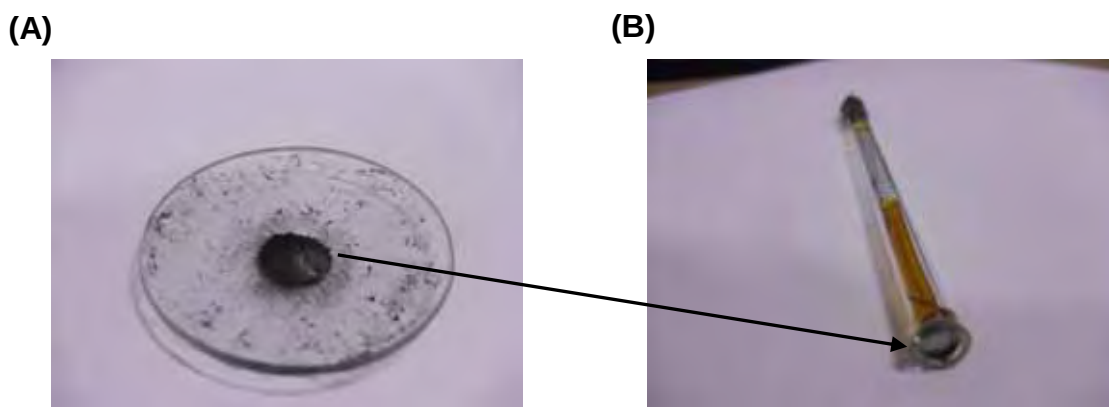


Figura 9: Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor.

Adicionalmente, pastas de carbono não modificadas foram preparadas pela mistura de 100 mg de grafite em pó e misturados com 1,00 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Após seco, foi adicionado $60 \mu\text{L}$ de Nujol[®], para obtenção da pasta de carbono não modificada. Estas pastas serviram para realizar estudos comparativos.

Cabe ressaltar que as pastas modificadas com os outros complexos metálicos foram preparadas de maneira análoga à pasta modificada com CoPc.

3.3.2 Sensor biomimético modificado com nanotubo de carbono e ftalocianinacobalto (II)

Com o intuito de melhorar a sensibilidade na detecção amperométrica do metribuzin, em relação à pasta de carbono modificada apenas com complexo, modificou-se a pasta de carbono também com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e modificador. Antes do preparo da pasta, para um melhor aproveitamento dos nanotubos de carbono, realizou-se a sua funcionalização para propiciar a abertura das pontas e defeitos na estrutura dos nanotubos, com a inserção covalente de grupos funcionais carboxilas (COOH) na superfície, aumentando a reatividade do NTC.

O método de funcionalização consistiu em misturar 100 mg de nanotubos de carbono com 250 mL de uma solução concentrada sulfonítrica (3 H₂SO₄ : 1 HNO₃). Essa mistura foi agitada por 12 h e posteriormente foi realizado o processo de lavagem dos nanotubos por filtração a vácuo, com água ultrapura e secagem na estufa a 70 °C⁵⁰.

Após funcionalizar os nanotubos de carbono, com o grupo carboxila, a preparação da pasta foi realizada misturando 70 mg de MWCNT, 15 mg de grafite em pó, 15 mg do complexo ftalocianinacobalto (II) e 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula e a seguir deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se 150 µL de agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®) para a formação da pasta de carbono. Observa-se que neste caso, devido à textura do CNT, a quantidade de agente aglutinante, que é também isolante, foi de 150% vezes maior, em relação à quantidade usada em 3.3.1.

3.3.3 Sensor biomimético impresso

Estes sensores foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa LAPED (Laboratório de Pesquisa em Diagnósticos da UFPE) coordenado pela Profa. Dra. Rosa Fireman Dutra⁶⁸ com quem se mantém uma estreita colaboração.

Os eletrodos foram preparados misturando tinta de grafite, 0,3% (m/m) de MWCNT funcionalizados com grupo carboxila, e quantidades diferentes de CoPc,

para estudos da influencia da quantidade de complexo no eletrodo. Sendo estas proporções de 5%, 10% ou 15% (m/m) de CoPc.

Um esquema de preparação dos sensores impressos com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$ e 15 mm de comprimento total estão mostrados na Figura 10 a seguir:

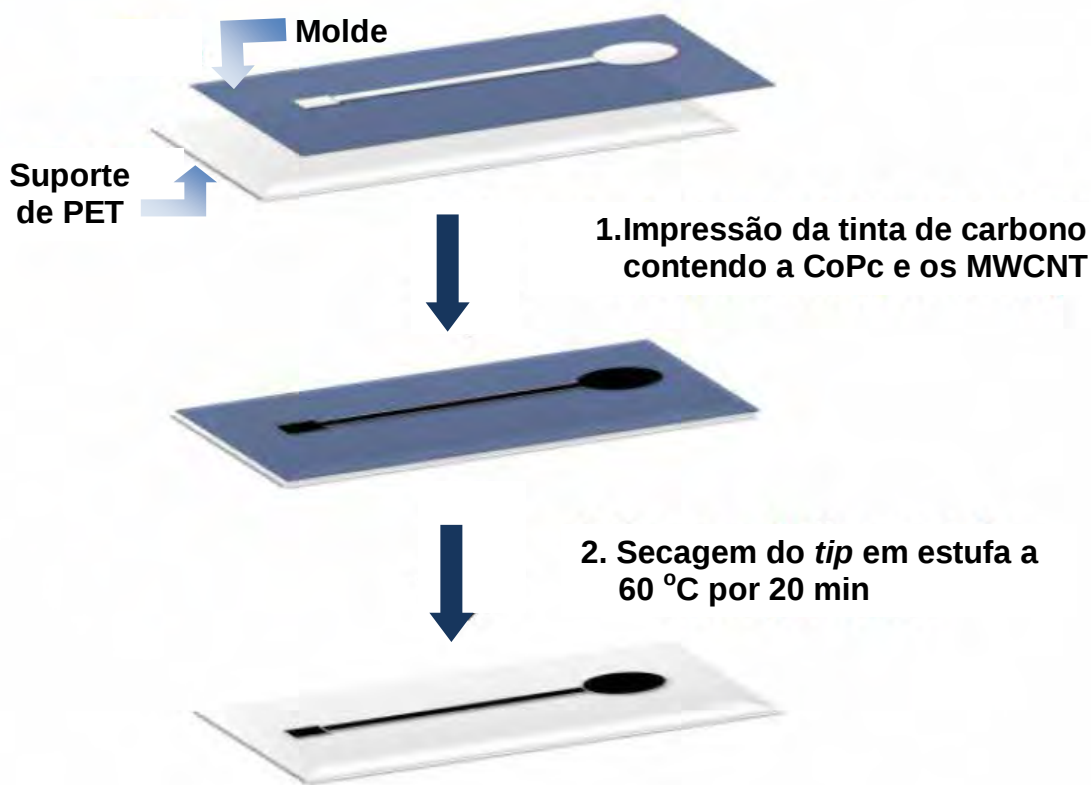


Figura 10: Esquema de construção do sensor impresso à base de grafite contendo MWCNT e 5% (m/m) de CoPc. Os sensores de 4 mm de diâmetro (área superficial de $0,071 \text{ cm}^2$) e 15 mm de comprimento. Figura adaptada da referência⁶⁸.

Antes das análises foi efetuada a limpeza do eletrodo impresso empregando a técnica de voltametria cíclica, na qual, dez varreduras foram realizadas sob as seguintes condições: eletrólito de suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; velocidade de varredura 20 mV s^{-1} ; faixa de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$.

Para fins de comparação também foram testados EIs não modificados das mesmas características geométricas dos sensores impressos.

3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Dentre as várias técnicas eletroanalíticas disponíveis, neste trabalho de mestrado utilizou-se a voltametria cíclica para caracterização do sensor proposto e a amperometria para efetuar as análises quantitativas do metribuzin.

3.4.1. Sistema de análise para determinação de metribuzin

As medidas eletroquímicas, que foram realizadas em batelada, foram realizadas em um potenciostato da Palm-Sense[®], usando uma célula eletroquímica convencional de 03 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(s) eletrodo(s) de pasta de carbono e eletrodos impressos, modificados ou não, como eletrodo(s) de trabalho.

Neste sistema de análise 10,00 mL de solução tampão (eletrólito) foram adicionados na cela eletroquímica e a seguir, volume conhecido de uma solução padrão de metribuzin, ou de amostra contendo o analito, era adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos. Sendo que a corrente de redução resultante é relacionada com a concentração de analito na célula de medida. Antes da adição do analito o potenciostato era colocado em modo de espera (*hold*), a fim de realizar a homogeneização da solução. Após a adição do analito na célula eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador. A seguir, o equipamento era colocado novamente em modo de medição (*play*) e a corrente gerada era registrada.

A Figura 11 mostra uma representação esquemática (A) e uma fotografia do sistema de medida (B), usado neste trabalho de mestrado.

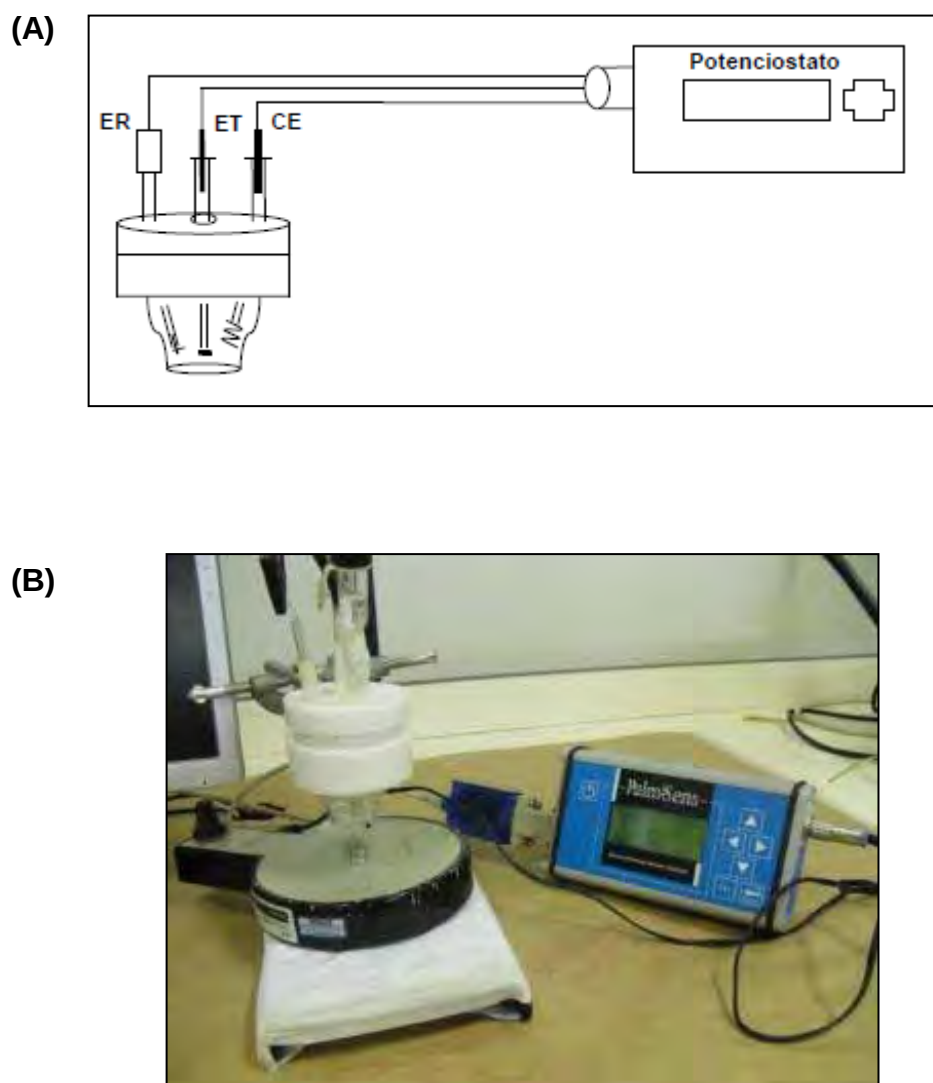


Figura 11: Representação do sistema de análise em batelada em (A) Esquema representativo e (B) Fotografia da aparelhagem usada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

4.1.1 Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos voltamétricos

Inicialmente foram testados diversos complexos a fim de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção de metribuzin. Entretanto, dos sete complexos avaliados, um sinal analítico somente foi obtido para a pasta de carbono modificada com ftalocianinacobalto (II) [CoPc] (Tabela 1), o qual já é reconhecido como catalisador biomimético da P450, em reações de eletro-oxidação^{62,63-67}.

Tabela 1: Complexos analisados em estudos preliminares

Complexo analisado	Sensibilidade ao analito
Ftalocianinacobalto (II)	SIM
Ftalocianinacobre (II)	n.d
Bis(piridil)ftalocianinaferrosa	n.d
Ftalocianinacloradaférrica	n.d
5,10,15,20-tetraquismetoxifenilporfirinacobalto (II)	n.d
5,10,15,20-tetraquispentafluorofenilporfirinaferro (III)	n.d
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H-31H-ftalocianinacobalto (II)	n.d

n.d – não detectado.

Para verificar se a modificação da pasta com o complexo ftalocianinacobalto (II) [CoPc], traria algum ganho em relação à pasta de carbono sem modificação na detecção de metribuzin, foram realizados estudos empregando a voltametria cíclica, cujos resultados são mostrados nas Figuras 12 e 13.

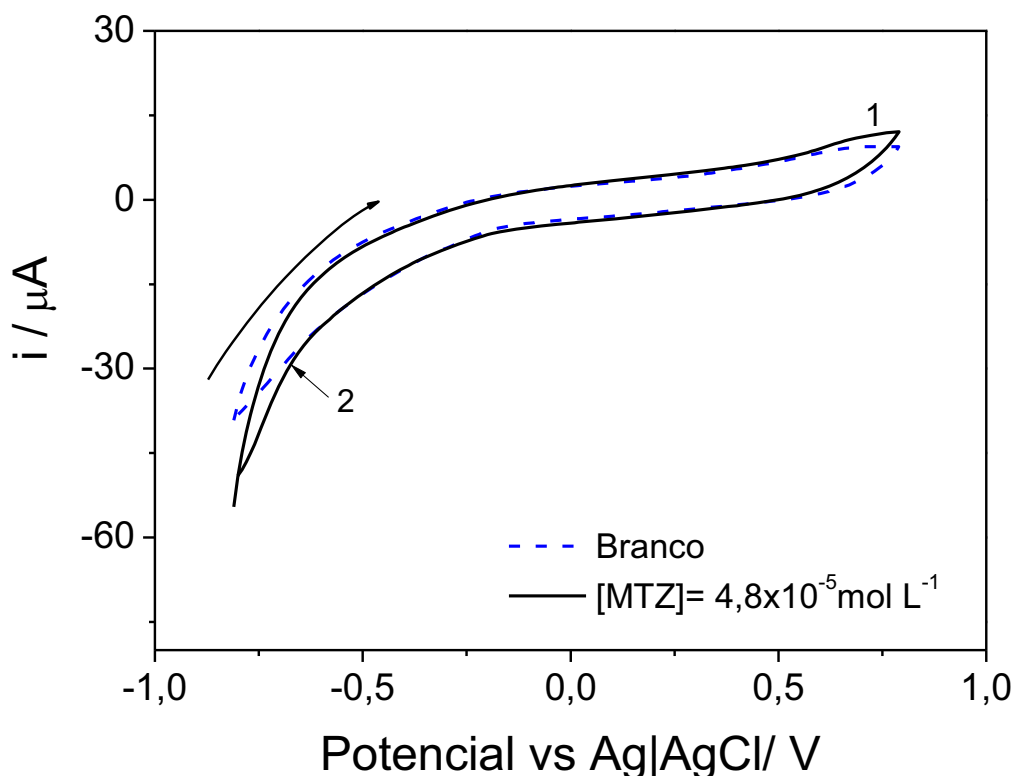


Figura 12: Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono sem modificar. Branco: Solução tampão Britton-Robinson $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Pode ser observado que na ausência do complexo (Figura 11) não há formação de nenhum pico, e que após adição do MTZ o perfil do voltamograma muda muito pouco, mostrando um pequeno aumento da corrente em potenciais a partir de +600 mV (com máximo em 720 mV, 1), no sentido da oxidação, e em potenciais negativos somente a partir de -670 mV (2), provavelmente devido ao processo redox na molécula de MTZ.

Já quando usada a [CoPc] se observa, no voltamograma (na ausência de MTZ) um pico em -270 mV vs Ag|AgCl (2') e um leve ombro em (1'), que podem corresponder à dupla $\text{CoPc}^{3+}/\text{CoPc}^{2+}$ no eletrodo.

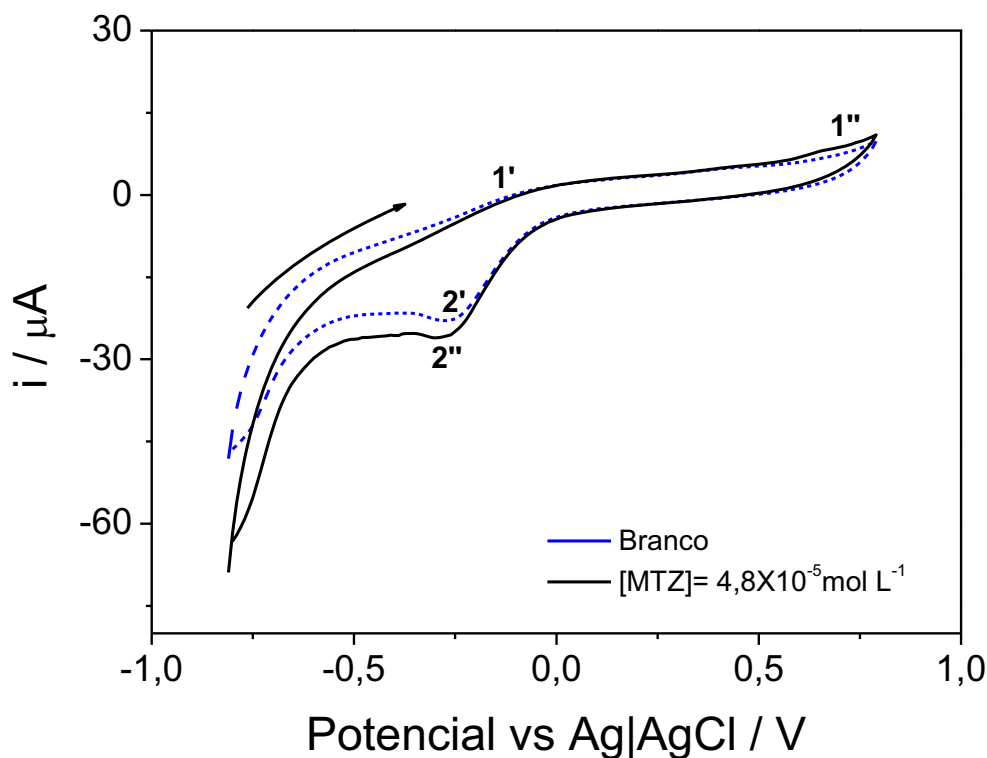


Figura 13: Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc]. Branco: Solução tampão Britton-Robinson $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Na presença de metribuzin ocorre um aumento evidente da corrente catódica a partir de $-210 \text{ mV vs Ag|AgCl}$. Analisando os pontos 1'' e 2'', quando comparados com os pontos 1 e 2 da Figura 12, observa-se uma diminuição na corrente anódica em 720 mV (para os pontos 1 e 1'', respectivamente) de aproximadamente 40%, e o aparecimento de corrente catódica a partir de -210 mV que não existia no voltamograma da Figura 12, sugerindo que no sensor à base de CoPc, possa estar ocorrendo um processo de redução eletrocatalítico.

Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente catódica, que permitisse quantificar o metribuzin, a Figura 14 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de analito.

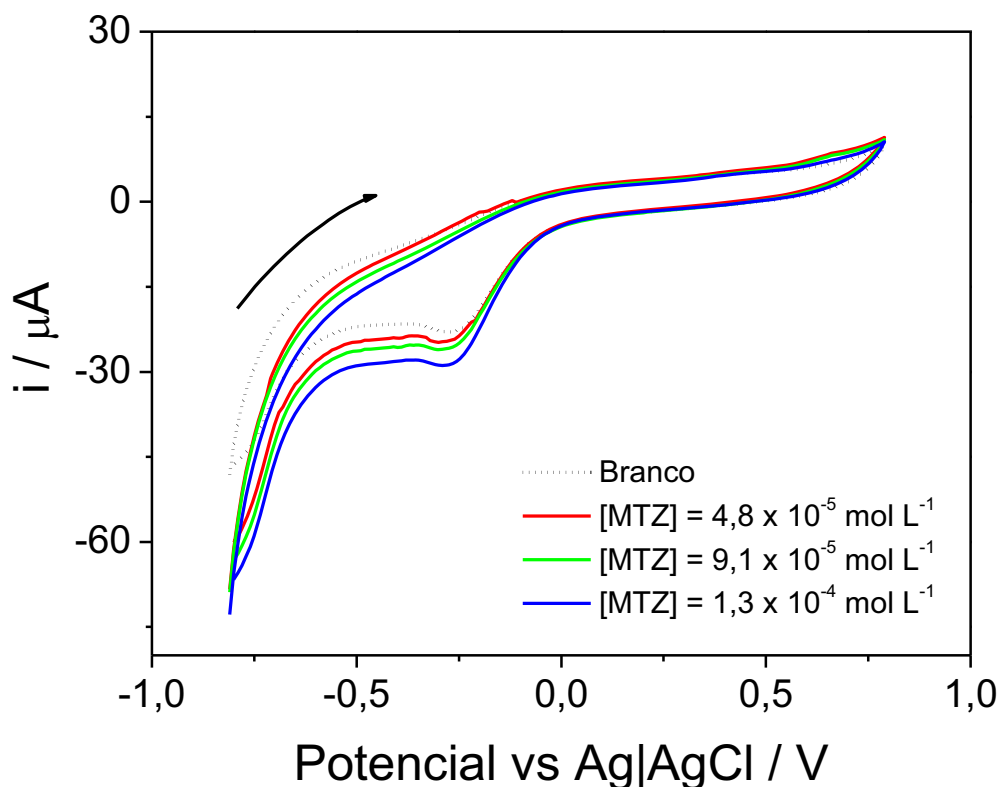


Figura 14: Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [CoPc] em diferentes concentrações de metribuzin. Branco: Solução tampão Britton-Robinson 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Conforme a Figura 14, verifica-se que há sim, uma relação crescente entre a corrente catódica e a concentração de MTZ, o que viabiliza o uso deste sensor à base de CoPc para análise quantitativa deste analito.

Visando obter informação sobre o possível mecanismo de resposta do sensor proposto, quando avaliado o processo de redução do metribuzin em diferentes velocidades de varredura, foi observado que em velocidades menores a 5 mV s⁻¹ (Figura 15) apareciam três picos de redução nos potenciais de -185 mV (1), -460 mV (2) e -710 mV (3), na presença e na ausência do analito.

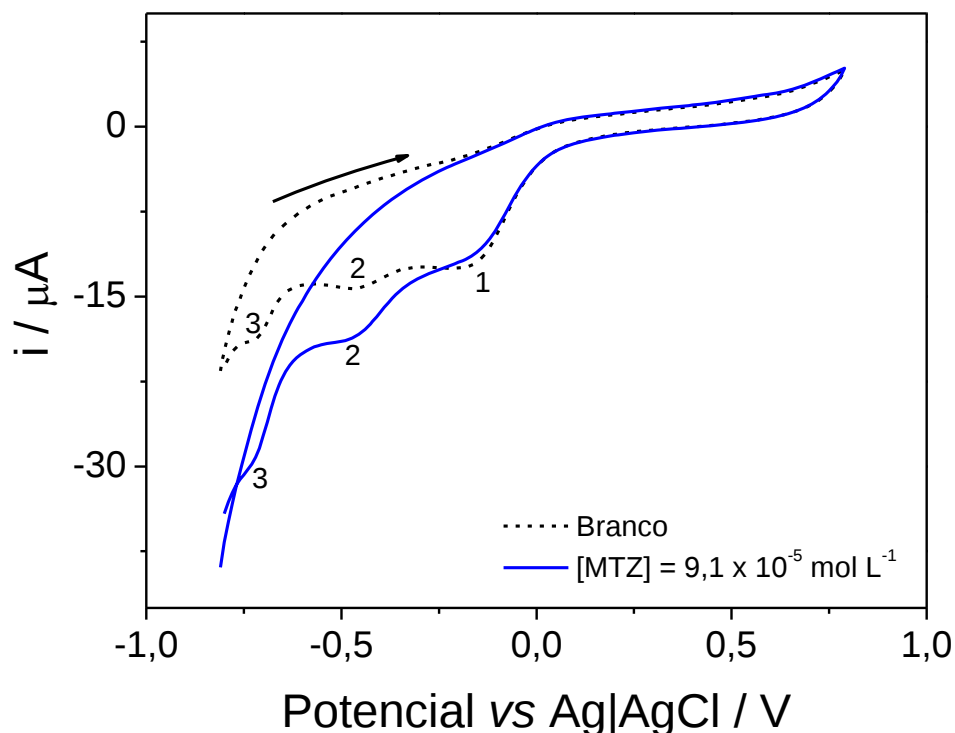


Figura 15: Voltamograma cíclico para o sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc]. Branco: Solução tampão BT 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), velocidade de varredura: 5 mV s⁻¹.

O pico 1 em -183 mV (Fig. 15), provavelmente corresponda ao pico 2' da Figura 13 a -270 mV, e se apresenta em um potencial menos negativo por ter sido registrado a uma velocidade de varredura menor ($v = 5 \text{ mV s}^{-1}$). Este pico se manteve presente em todas as velocidades de varredura e por esta razão foi usado para obtenção dos gráficos do estudo correspondente à variação de v .

Já os picos 2 e 3 poderiam ser correspondentes ao oxigênio dissolvido na solução de eletrólito, porém pelos resultados obtidos no gráfico da Figura 12 e por experimentos realizados em meio saturado com nitrogênio para o sensor modificado com [CoPc] (Figura 16) no qual os três picos novamente foram observados a $v < 5 \text{ mV s}^{-1}$, os picos 2 e 3 podem ser provavelmente explicados devido à redução dos nitrogênios disponíveis entre os anéis pirrólicos da molécula da [CoPc]. Esses grupos pirrólicos explicariam também o ganho na corrente de redução, principalmente no potencial correspondente ao último pico após adição do metribuzin, que também apresenta átomos de nitrogênio que podem ser reduzidos

nesse potencial, e que não ocorre com tanta intensidade na ausência do complexo (Figura 12), evidenciando a influência positiva da [CoPc] na pasta de carbono, para determinação de metribuzin.

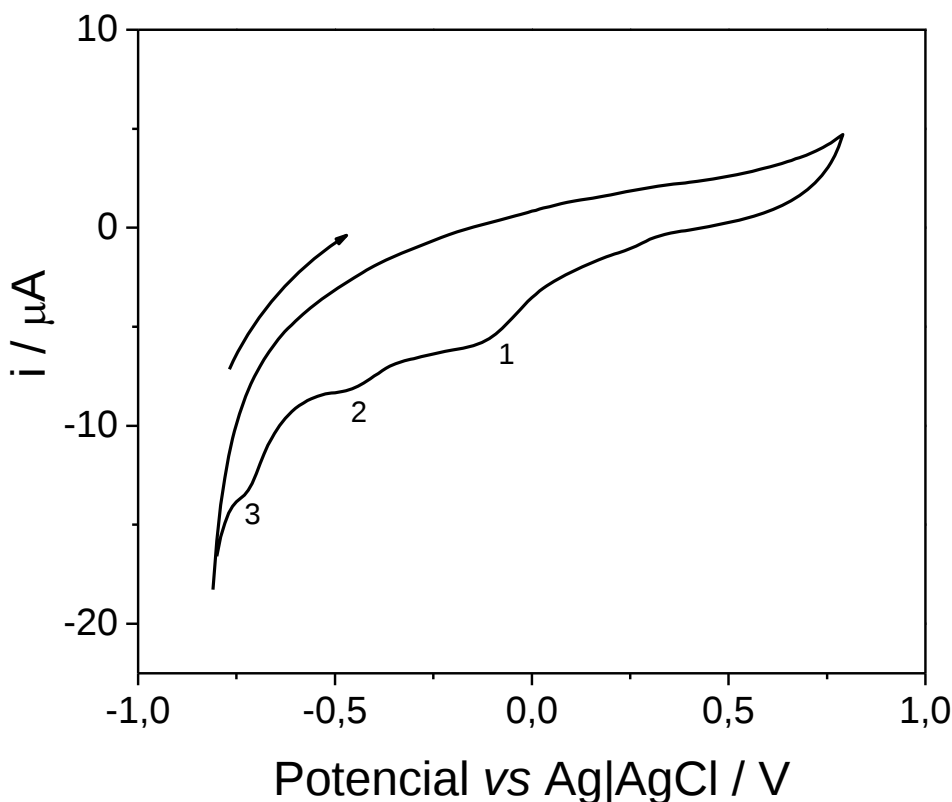


Figura 16: Voltamograma cíclico para o sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPc] após borbulhar por 40 minutos nitrogênio em solução. Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Desta forma, visando investigar a natureza destes picos, foi realizado um experimento modificando uma pasta de carbono com a ftalocianina sem centro metálico, e o resultado obtido é mostrado nas Figuras 17a e 17b.

Pela Figura 17a, pode ser observado um comportamento análogo ao da pasta sem modificação (Figura 12) em ν de 50 mV s⁻¹, indicando que a redução do MTZ, ocorre apenas na presença do centro metálico de Co na ftalocianina, sendo este complexo o responsável pela corrente catódica observada na presença de metribuzin.

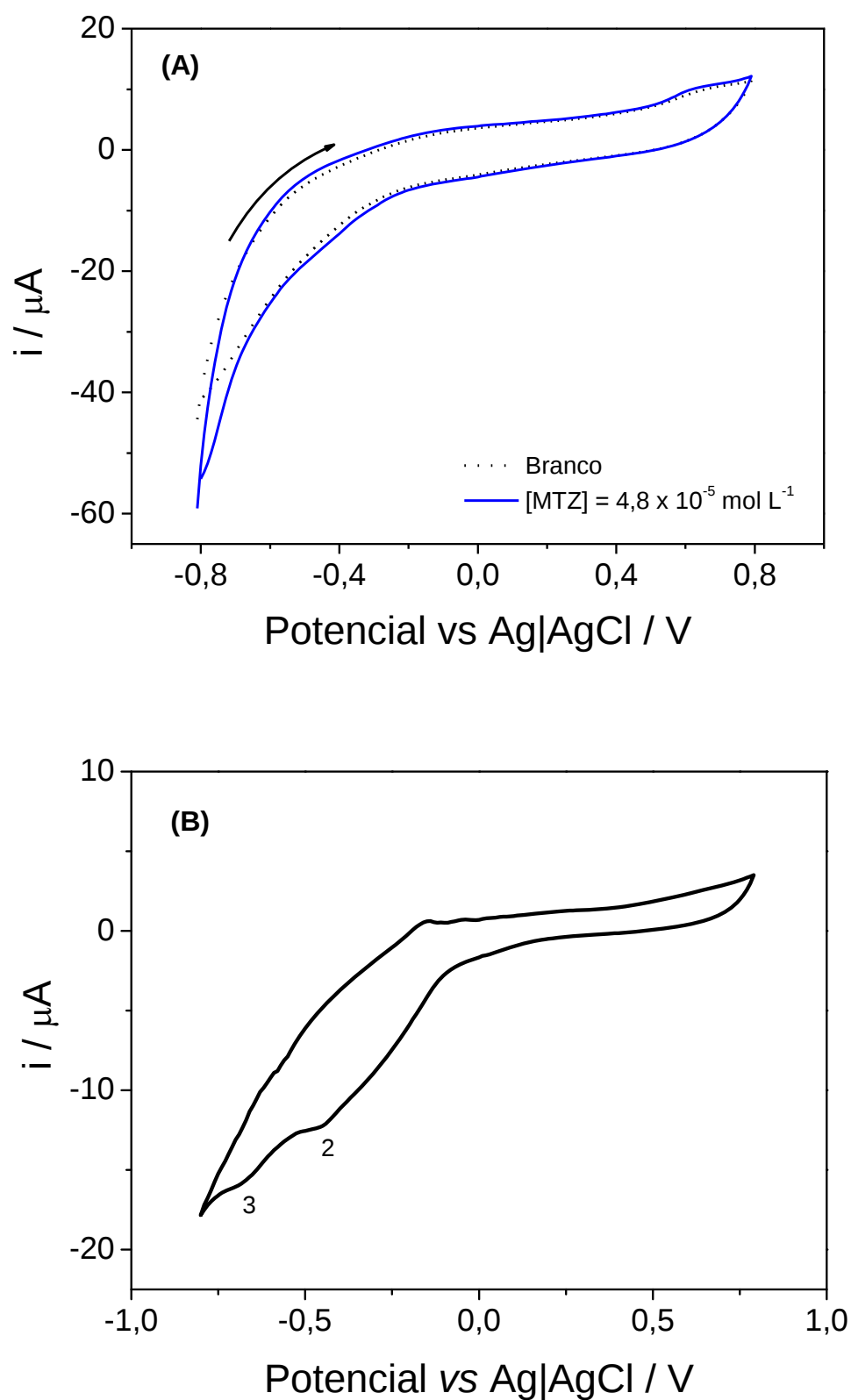


Figura 17: (A) Voltamogramas cíclicos para eletrodo à base de pasta de carbono modificada com ftalocianina sem centro metálico. Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L^{-1} (pH 2,0), velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Voltamograma cíclico para o mesmo eletrodo em tampão BR 0,08 mol L^{-1} (pH 2,0), velocidade de varredura: 5 mV s^{-1} .

Por outro lado, em velocidades de varredura menores a 5 mV s^{-1} , observam-se novamente dois picos em -460 mV (**2**) e -690 mV (**3**), em potenciais análogos aos observados nas Figuras 15 e 16, confirmando a hipótese de que esses picos correspondem à redução dos grupos pirrólicos da molécula de ftalocianina. Estes picos não são visualizados em velocidades de varredura maiores, provavelmente devido à limitação no transporte de carga na macromolécula.

Com a finalidade de avaliar se a redução do MTZ é eletrocatalítica, tal como sugerem os gráficos das Figuras 13 a 15, foram realizados experimentos variando a velocidade de varredura da voltametria cíclica (Figura 18), e que permitiram avaliar as características eletroquímicas do sensor à base de CoPc.

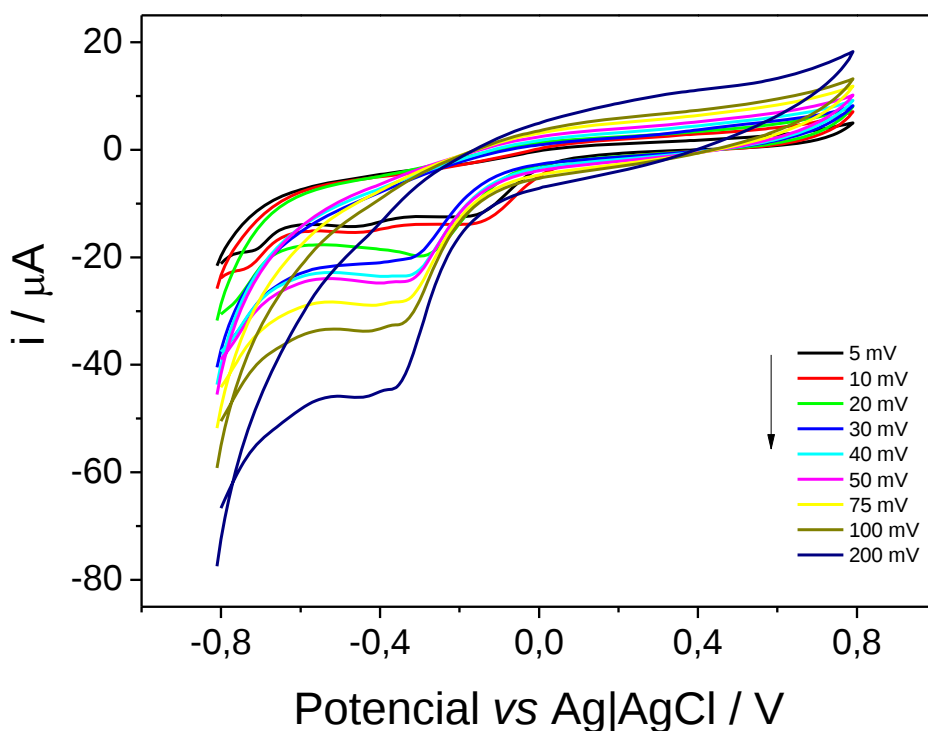


Figura 18: Voltamogramas cíclicos para o sensor em $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metribuzin e em diversas velocidades de varredura.

Sabe-se que um sistema catalítico, no qual a corrente aumenta preferencialmente em um único sentido, seja anódico ou catódico; comporta-se como um sistema eletroquímico irreversível controlado por difusão⁶⁹. Para verificar este fato, o processo de redução do metribuzin na superfície do sensor foi avaliado

em diferentes velocidades de varredura, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 19.

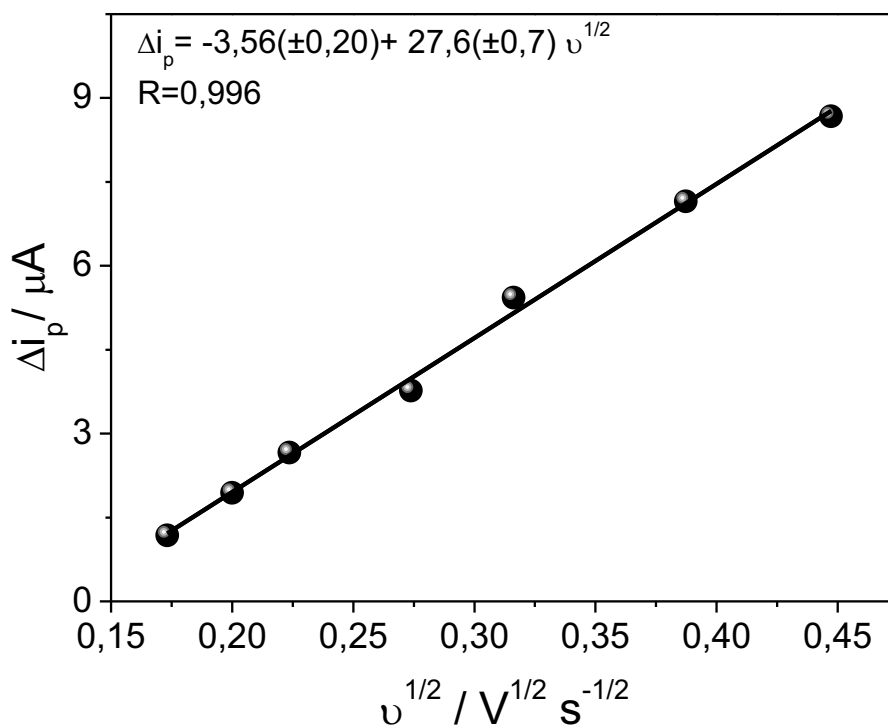


Figura 19: Variação da corrente de pico catódico (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo [CoPc]. Contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metribuzin.

Da Figura 19 pode-se observar que há uma dependência linear entre a corrente de pico catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura na faixa entre 25 e 200 mV s^{-1} , indicando que a redução do metribuzin na superfície do sensor é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo.

Adicionalmente, quando plotado o gráfico da variação da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($\Delta i_{pc} v^{-1/2}$) vs v (Figura 20) o perfil obtido sugere fortemente que o processo de redução do metribuzin é eletrocatalítico do tipo EC' (electrochemical/chemical catalytic), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada ao processo eletroquímico⁷⁰, este resultado será importante ao propor um mecanismo de resposta para este sensor.

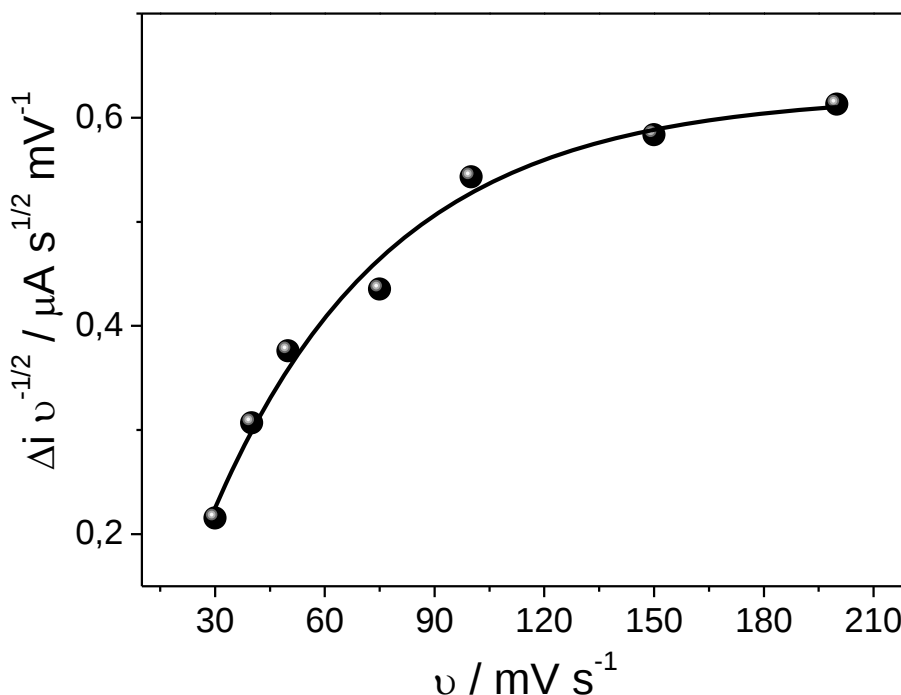


Figura 20: Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹, pH 2,0 contendo $4,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de metribuzin.

Após verificar que o sensor apresenta uma resposta electrocatalítica para a redução do MTZ, a seguir foram realizados os experimentos necessários para otimizar a resposta analítica do sensor para este analito.

4.1.2. Otimização da resposta do sensor

No estudo de otimização do sensor para metribuzin foi empregada a técnica eletroanalítica de amperometria, inicialmente em potenciais próximos a -700 mV correspondente ao pico 3 da Figura 15, onde foi observada maior diferença de corrente e conseqüentemente maior sensibilidade.

Nestes estudos, almejou-se escolher os parâmetros que permitissem obter maior sensibilidade, estabilidade e seletividade das medidas. Para isto, parâmetros como natureza do tampão, pH e concentração do tampão; potencial aplicado e quantidade de complexo de ftalocinina-cobalto (II) na pasta de carbono, foram otimizados.

Os melhores resultados foram obtidos em tampão Britton-Robinson (BR) na concentração de 0,08 mol L⁻¹ (Figuras 21 e 22).

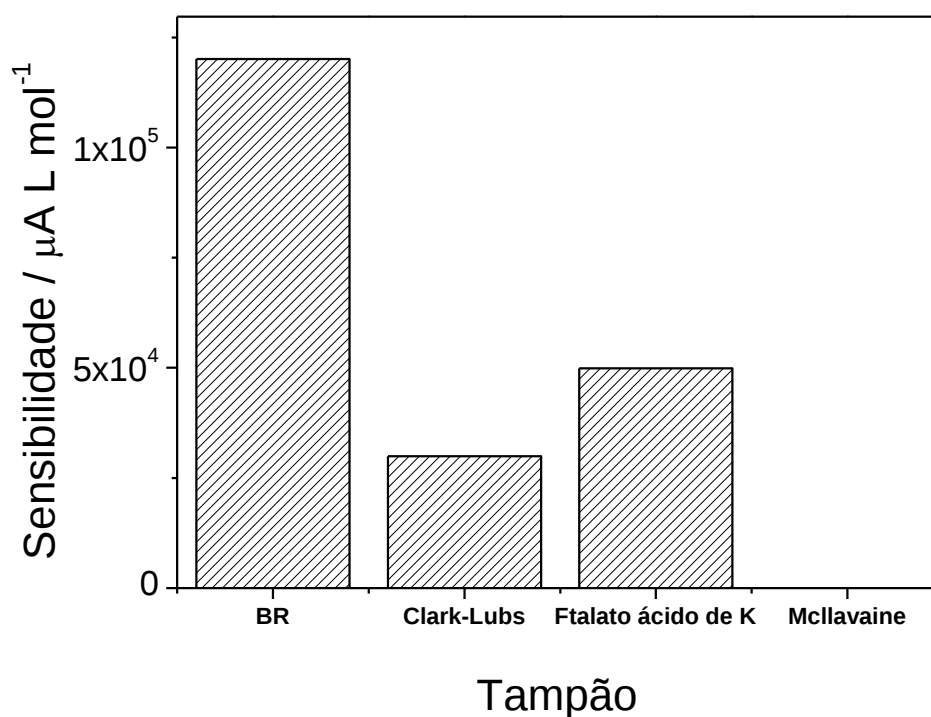


Figura 21: Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do tipo de tampão usado como eletrólito suporte nas análises amperométricas para determinação de metribuzin. Medidas realizadas em - 690 mV vs Ag|AgCl (KCl_{sat}).

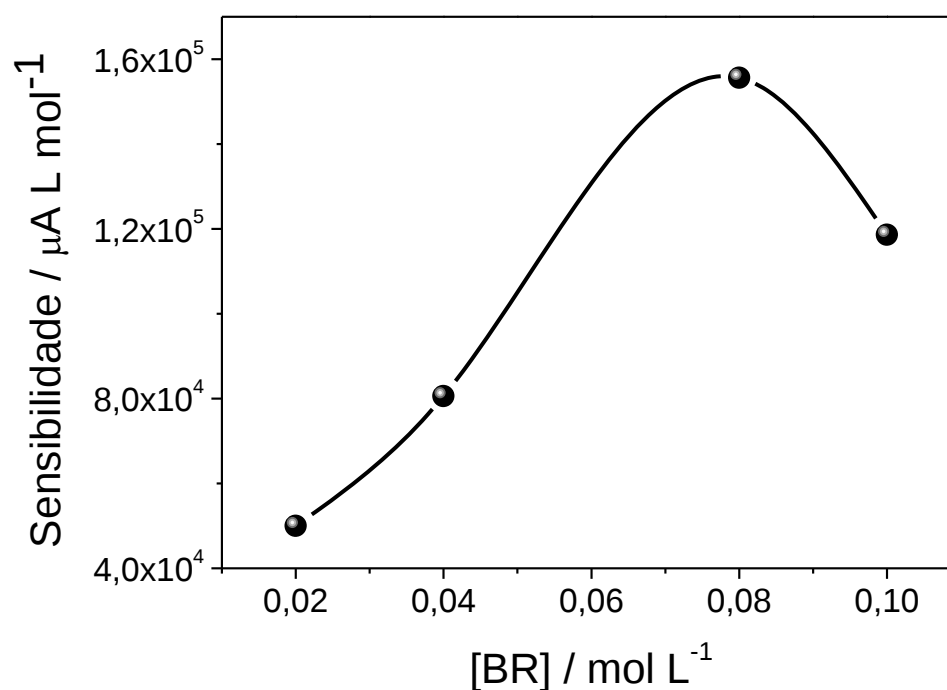


Figura 22: Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão. Medidas realizadas em - 690 mV vs Ag|AgCl (KCl_{sat}).

A Tabela 2 mostra todos os parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de metribuzin. E como pode ser visto nessa tabela, o sensor preparado com pasta de carbono contendo 15 % (m/m) de complexo de cobalto, mostrou melhor desempenho em relação a sensibilidade e repetibilidade em solução tampão BR com concentração de $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 2,0 e potencial aplicado de $-690 \text{ mV vs Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat}}$. Desta forma, estas variáveis foram fixadas para a aplicação do sensor nas análises de metribuzin em batelada.

Tabela 2: Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de metribuzin

Parâmetros Avaliados								Otimizado
Quantidade de complexo na pasta / % (m/m)	7	10	15	20	---	---	---	15
pH	2,0	3,5	4,5	6,0	7,0	8,5	---	2,0
Tampão	MacIlavaine	Clark-Lubs	Ftalato ácido de potássio	BR	TRIZMA	Acetato	---	BR
[BR] / mol L^{-1}	0,02	0,04	0,08	1,0	---	---	---	0,08
Potencial vs Ag AgCl / mV	-940	-840	-790	-690	-450	-300	---	-690

4.1.3. Perfil de resposta do sensor

Sob as condições otimizadas, o sensor apresentou um perfil amperométrico de resposta tal como mostrado na Figura 23, onde a curva analítica (Figura 24) é obtida a partir dos dados amperométricos, da variação de corrente após cada adição em relação ao branco.

A otimização da pasta de carbono e dos parâmetros para realização das medidas amperométricas permitiu obter uma faixa linear para o metribuzin entre $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com uma sensibilidade de $148.908 (\pm 1.485) \mu\text{A L mol}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $4,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, os quais foram calculados conforme recomendado pela ANVISA⁷¹. O limite de detecção (LOD) foi calculado como três vezes o desvio padrão do coeficiente linear (**a**, obtido da média de três curvas analíticas) dividido pelo coeficiente angular médio dessas três curvas analíticas (**b**, sensibilidade média), $3\sigma_a/b$. Já o limite de quantificação (LOQ)⁷¹, foi calculado como 3,3 vezes o valor do LOD ($10\sigma_a/b$).

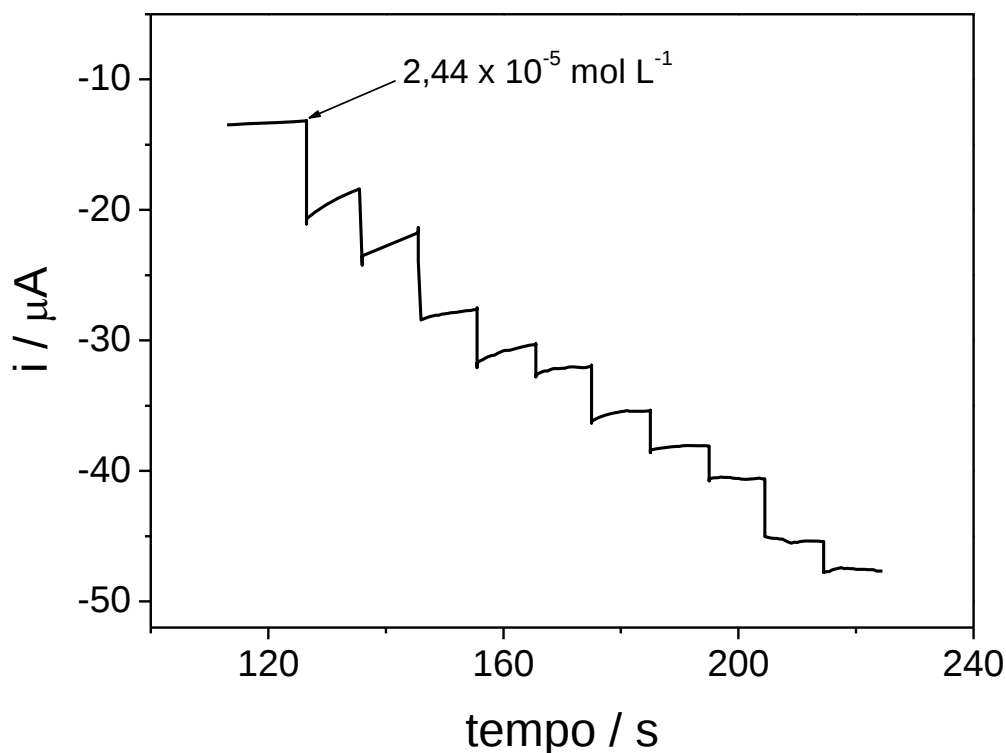


Figura 23: Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Amperograma típico obtido para adições sucessivas de $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metribuzin.

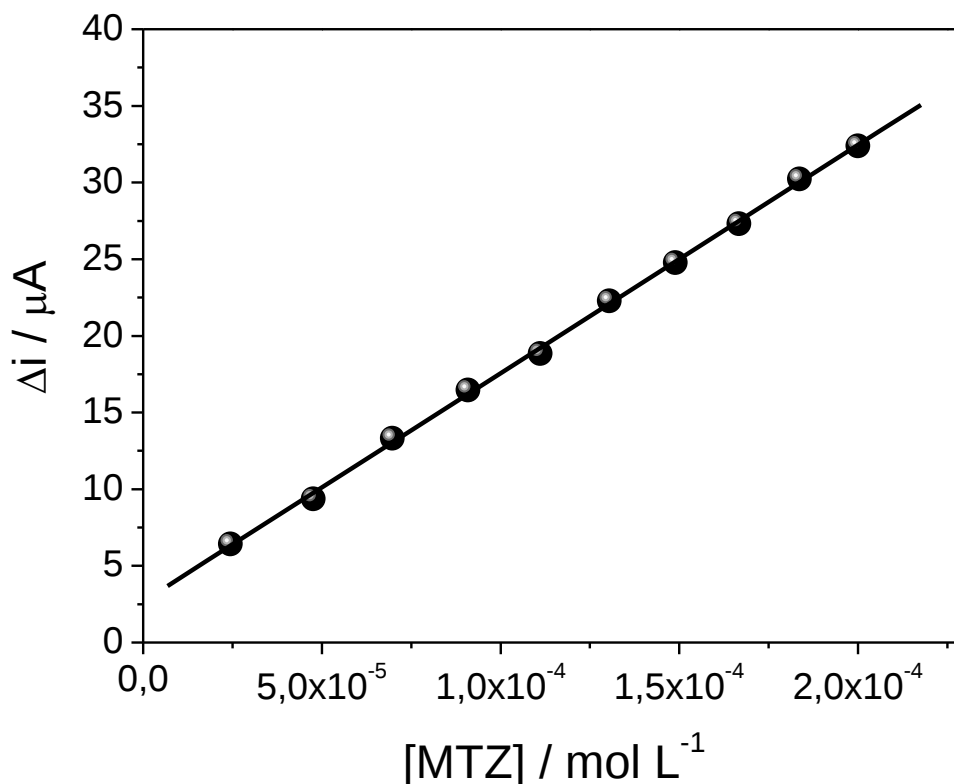


Figura 24: Curva analítica construída com os resultados obtidos na amperometria da Figura 23.

A equação da reta que representa os dados da Figura 24 é mostrada na equação 1, cujo “R” foi de 0,999, para n=10.

$$\Delta i/\mu A = 2,67(\pm 0,19) + 148.908(\pm 1485)[Metribuzin]/mol\ L^{-1} \quad (\text{equação 1})$$

Na Tabela 3 são mostradas todas as características analíticas apresentadas pelo sensor, avaliado neste trabalho apenas em sistema em batelada.

Tabela 3: Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$2,4 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4}$
Sensibilidade ($\mu\text{A Lmol}^{-1}$)	148.908
Coeficiente de Correlação (n=10)	0,999
Limite de detecção (mol L^{-1})	$4,3 \times 10^{-6}$ (0,9 ppm)
Limite de quantificação (mol L^{-1})	$1,4 \times 10^{-5}$ (3,0 ppm)
Repetibilidade intra-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	3,5%
Repetibilidade inter-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	4,5%
Tempo de vida mantendo 95% sinal inicial	5 dias

A repetibilidade da resposta do sensor biomimético pode ser verificada através dos valores obtidos para o desvio padrão médio relativo (RSD) da sensibilidade de cinco curvas analíticas registradas em dias diferentes (inter-dia) e no mesmo dia (intra-dia), respectivamente, os quais foram inferiores a 5%. O tempo de vida do eletrodo também foi avaliado em uso contínuo, sem troca de pasta e registrando curvas analíticas em triplicata, sendo os resultados obtidos bastante aceitáveis, uma vez que ao ser preparado um lote de pasta de carbono modificada, ela pode ser facilmente substituída rapidamente durante várias vezes.

4.1.4. Estudo da seletividade

Para realizar este estudo de seletividade, a resposta amperométrica do sensor foi avaliada para seis agrotóxicos, com diversas estruturas e classificações, além do metribuzin (Figura 25), e observou-se que o sensor não apresentou resposta para nenhum dos seis compostos estudados, tal como mostrado na Tabela 4.

Desta forma, este resultado sugere que o sensor à base de ftalocianinacobalto (II), é seletivo para metribuzin em relação a outros agrotóxicos, tal qual, é esperado para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático, altamente seletivo.

Tabela 4: Agrotóxicos analisados no estudo da seletividade.

Agrotóxicos	Sinal analítico
Carbendazim	n.d
Carbofurano	n.d
Clorpirifós	n.d
Diuron	n.d
Hexazinona	n.d
Metribuzin	SIM
2,4-D	n.d

n.d = não detectado

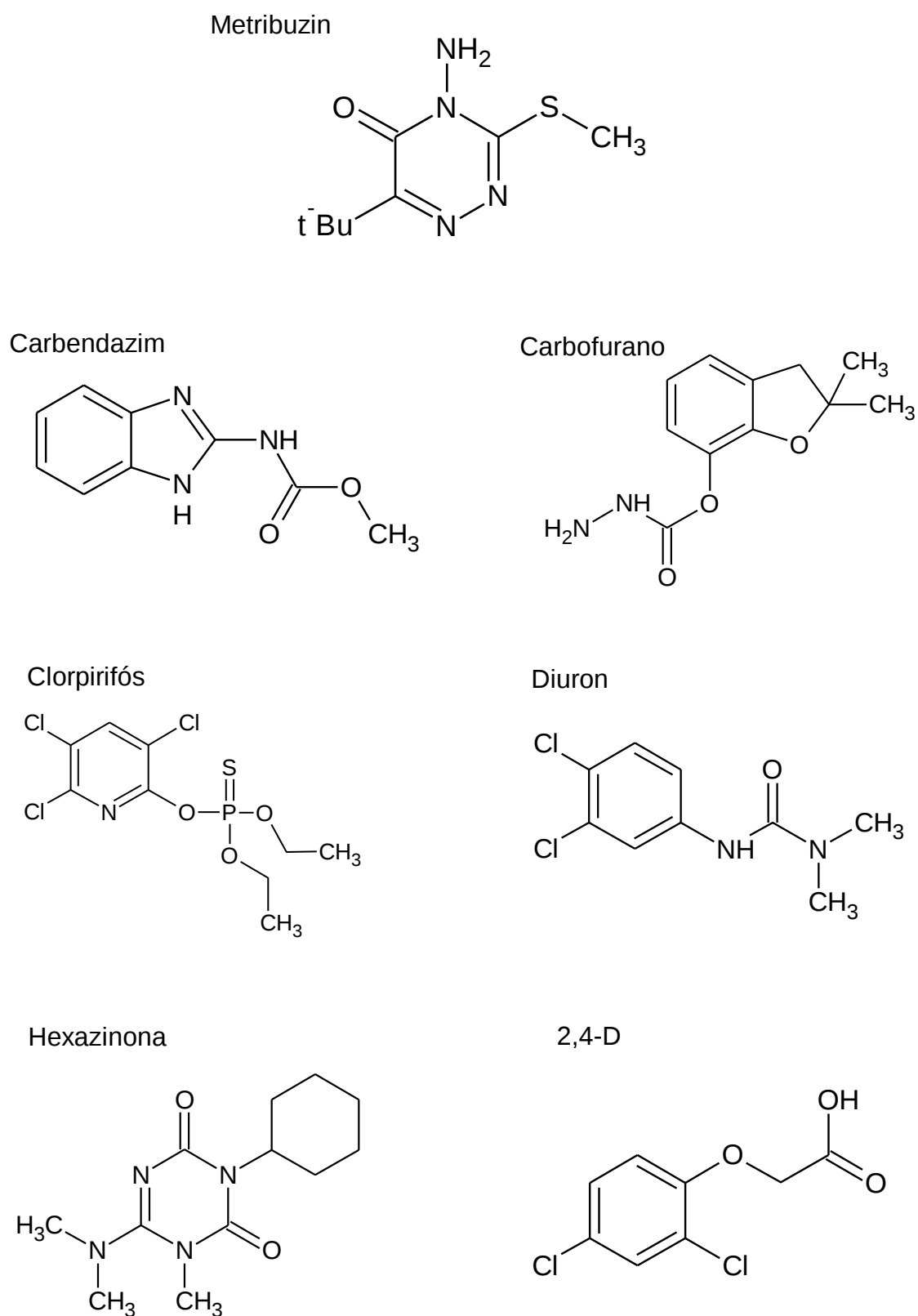


Figura 25: Estruturas químicas do metribuzin e dos agrotóxicos avaliados no estudo da seletividade do sensor.

4.1.5. Verificação do caráter biomimético do sensor

Visando verificar se o sensor proposto apresenta um comportamento similar aos sensores enzimáticos, o perfil de resposta foi avaliado até a região da saturação, obtendo-se o gráfico mostrado na Figura 26.

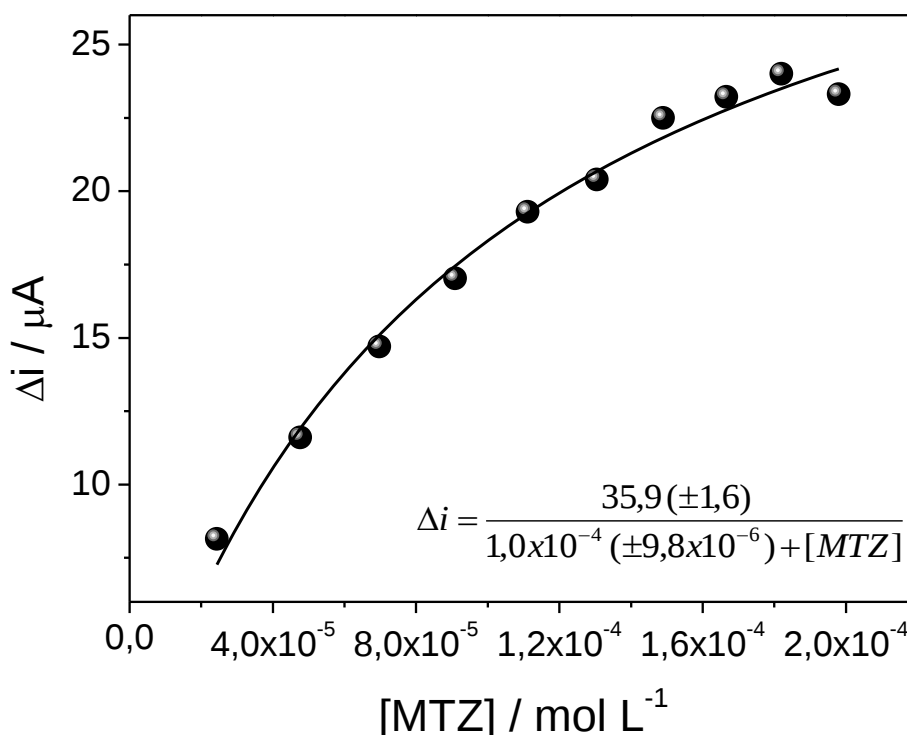


Figura 26: Perfil hiperbólico do sensor à base de ftalocianinacobalto (II).

Da Figura 26 pode ser verificado um perfil hiperbólico, tal como ocorre no caso dos biossensores enzimáticos, indicando que o complexo de cobalto na pasta de carbono segue uma cinética do tipo “Michaelis-Menten”⁷².

Adicionalmente, ao plotar o gráfico de Linewaver-Burker ou do duplo recíproco (Figura 27), foi possível estimar a constante aparente de Michaelis-Menten⁷², a qual apresentou um valor de $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, que é um valor que indica uma forte afinidade⁷² do complexo biomimético de cobalto pelo “substrato” metribuzin.

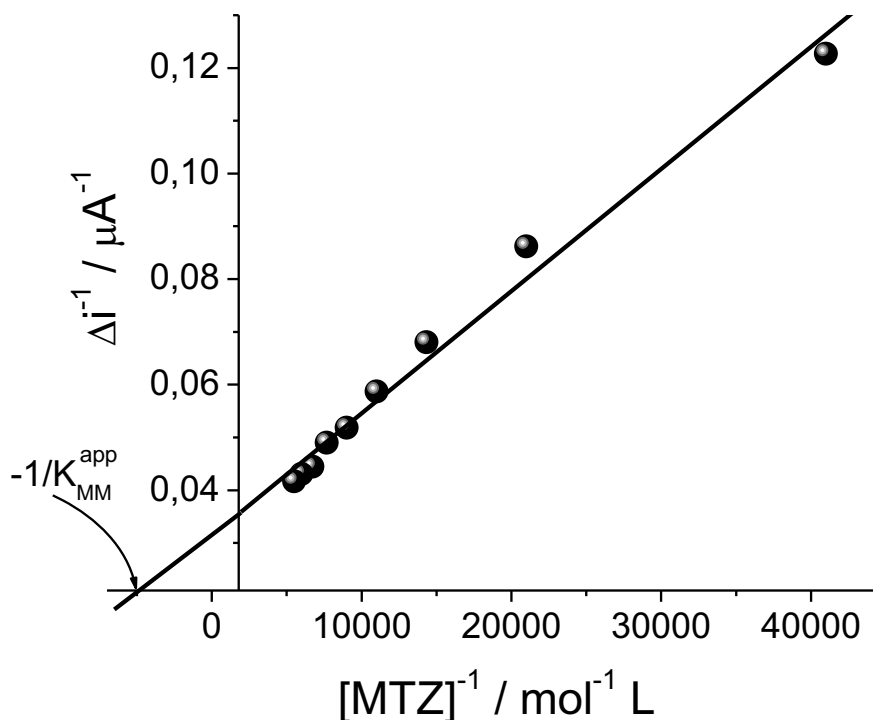


Figura 27: Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 26.

Com base nos resultados obtidos nas Figuras 13, 19 e 20 que sugerem que a redução do metribuzin é eletrocatalítica; com base nos resultados obtidos da seletividade do sensor para metribuzin (4.1.4); e com base nas Figuras 26 e 27 que sugerem que a resposta do sensor é hiperbólica e que existe uma alta afinidade entre o complexo de cobalto e o metribuzin; pode-se dizer que o sensor construído à base do complexo ftalocianinacobalto (II), trata-se de um sensor biomimético.

4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor

Visando a propor um mecanismo de resposta para o sensor à base de CoPc, com base nas evidências experimentais até aqui mostradas, a Figura 28 mostra um esquema para a resposta do sensor para metribuzin.

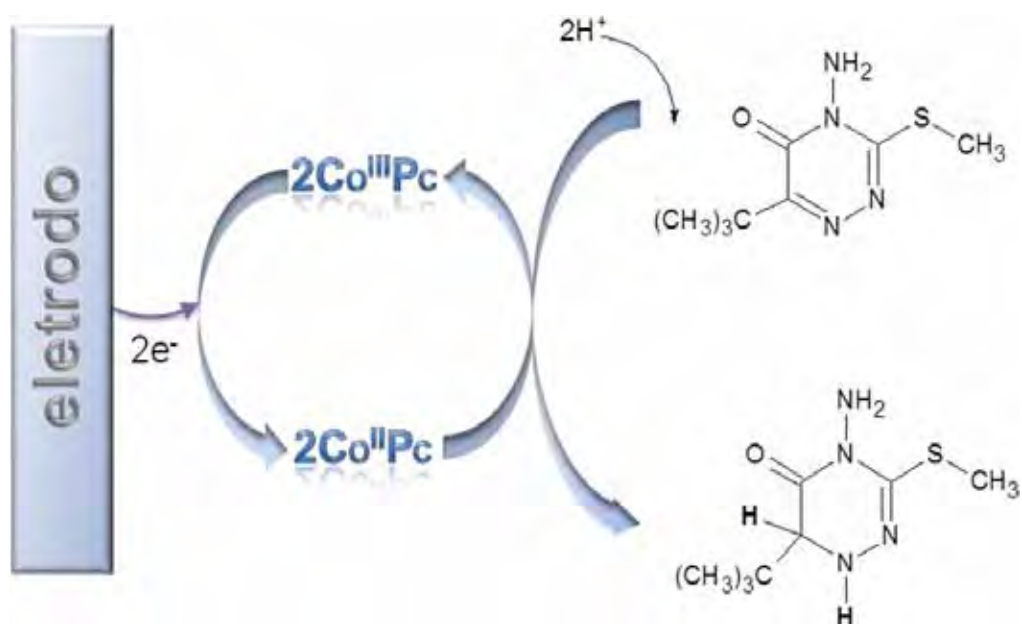


Figura 28: Esquema do mecanismo proposto para a resposta do sensor.

No mecanismo proposto da Figura 28, é mostrado o processo catalítico observado em potenciais > -270 mV (pico 2' na Figura 13). Entretanto, acredita-se que uma redução direta do MTZ, nos potenciais abaixo de -450 mV (Figura 15, picos 2 e 3), também estejam contribuindo se considerar o mecanismo de redução do MTZ da Figura 3.

Na Figura 28, inicialmente a reação química (*chemical step*) entre o MTZ oxidado e 2 moléculas de $\text{Co}^{\text{II}}\text{Pc}$ em meio ácido, promoverá a redução do MTZ e a oxidação da ftalocianina de cobalto. Na etapa eletroquímica acoplada à química, a redução da ftalocianina na superfície do eletrodo leva à obtenção da corrente observada em função da presença de metribuzin na cela de medida.

Com a finalidade de estimar o número de elétrons no sistema, que permita sustentar o mecanismo proposto na Figura 28, foram usados os gráficos das Figuras 19 e 29, que permitiram calcular o número de elétrons através das equações de Andrieux-Savèant (equação 2)^{62,69} e de Randles–Sevcík (equação 3)^{62,70}.

$$i_p = 0.496FAC_s D_0^{1/2} \left(\frac{F}{RT} \right)^{1/2} \nu^{1/2} \quad (\text{equação 2})$$

Onde, C_s é a concentração do MTZ ($4,8 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$), D_0 é o coeficiente de difusão do MTZ, F é a constante de Faraday, $R = 8.31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$ e $A = 0,126 \text{ cm}^2$. Usando a equação 2, o coeficiente de difusão do MTZ pode ser estimado usando o valor da inclinação da Figura 18 (Δi vs $v^{1/2}$) multiplicado por 10^{-6} , para transformar as unidades em ampères, e o fator $0.496FAC_sD_0^{1/2}F^{1/2}(RT)^{-1/2}$. Através deste cálculo foi possível calcular um coeficiente de difusão (D_0) de $2,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, correspondente à difusão média do MTZ e de seu(s) produto(s) de redução, durante o processo catalítico.

Assumindo que a redução eletrocatalítica do MTZ é um processo irreversível, a equação de Randles-Sevcík (3) pode ser usada para estimar o número de elétrons envolvidos.

$$j_p = (2,99 \times 10^5) n [(1-\alpha)n_a]^{1/2} D_0^{1/2} C_s v^{1/2} \quad (\text{equação 3})$$

nesta equação 3, $j_p = i_p/A = 219,05 \times 10^{-6} \text{ A cm}^{-2} \text{ V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$, n é o número total de elétrons envolvidos na reação, α é o coeficiente de transferência eletrônica, n_a representa o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação, D_0 ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) é o coeficiente de difusão do MTZ e das espécies eletroativas, calculado anteriormente, C_s (mol cm^{-3}) é a concentração do MTZ e v é a velocidade de varredura.

Contudo, na equação 3, para estimar o valor de n , é necessário que primeiramente seja calculado o valor $(1-\alpha)n_a$. Para isto, em um sistema catalítico ou irreversível, um cálculo aproximado deste fator está baseado na relação linear entre o potencial de pico (E_p) e o $\log v$ (Figura 29).

A relação entre a inclinação da Figura 29 e o fator $(1-\alpha)n_a$, (4) fornece um valor de 0,3786, o qual pode ser inserido na equação 3, para finalizar o cálculo de n .

$$0.078 = \frac{1.15RT}{[(1-\alpha)n_a]F} \quad (\text{equação 4})$$

Após os cálculos necessários, e substituindo todos os valores na equação de Randles-Sevcík (3), foi possível calcular o número de elétrons envolvidos na eletrorredução catalítica do MTZ na superfície do sensor à base da CoPc, tendo sido obtido o valor de 1,63, o qual pode ser aproximado para 2 e⁻.

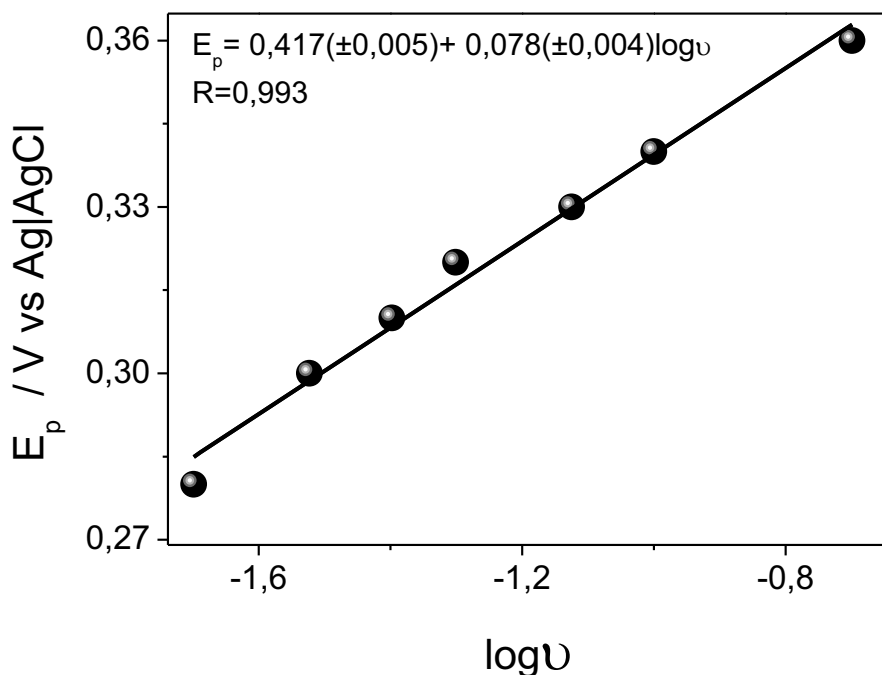


Figura 29: Variação linear do potencial de redução (E_p) vs $\log v$. Varreduras realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), contendo $4,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de MTZ.

4.2 SENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM NANOTUBO DE CARBONO E [COPC]

No intuito de tentar aumentar a detectabilidade do sensor modificado com ftalocianinacobalto (II), foram inseridos nanotubos de carbono na preparação da pasta.

Para verificar se a modificação da pasta com nanotubos de carbono (MWCNT) e complexo de cobalto [CoPc], traria algum ganho na detectabilidade do sensor em relação à pasta de carbono modificada apenas com ftalocianinacobalto (II) para detecção de metribuzin, foi registrada a voltametria cíclica para efeito de comparação, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 30.

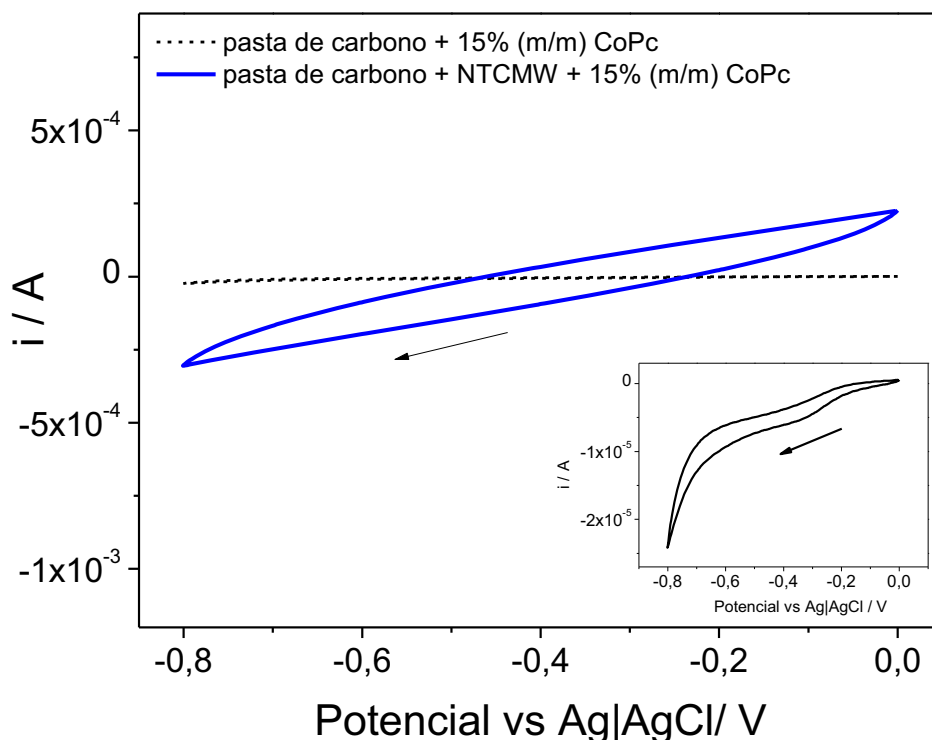


Figura 30: Voltamograma cíclicos para sensor à base de pasta de carbono modificada com 15% [CoPc] (preto) e à base de pasta de carbono modificada com MWCNT e 15% [CoPc] (azul). Medidas realizadas em solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), ν : 50 mV s⁻¹. No gráfico inserido é mostrada uma ampliação do voltamograma em preto.

Pode-se observar que a área do voltamograma da pasta contendo MWCNT e o complexo, é maior do que a do voltamograma correspondente à pasta de grafite e complexo. Esse resultado já era esperado devido ao aumento de corrente gerado pela maior área superficial do nanotubo de carbono. Entretanto, a excessiva quantidade de óleo mineral (Nujol[®]) necessária para obtenção da pasta, torna o material mais resistivo, tal como indicado pelo voltamograma da figura anterior.

Apesar do resultado obtido, para verificar se ainda assim haveria algum aumento na sensibilidade do sensor, o mesmo foi avaliado sob as condições amperométricas otimizadas anteriormente para o sensor de pasta de carbono com [CoPc] e o perfil de resposta é mostrado na Figura 31 a seguir.

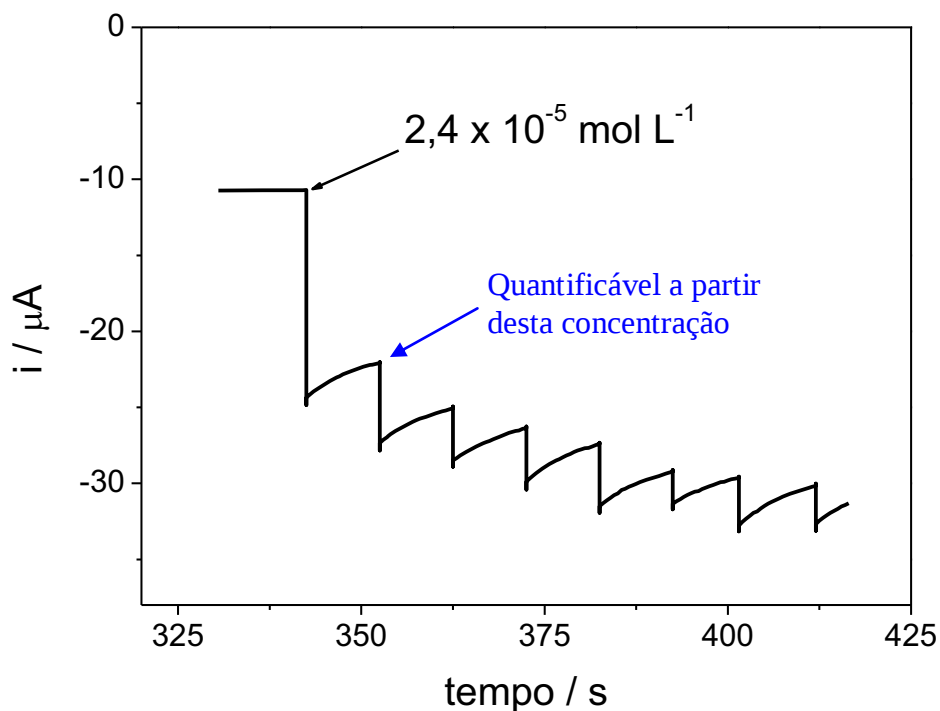


Figura 31: Amperograma típico obtido com o sensor à base de MWCNT para adições sucessivas de $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metribuzin no potencial de -0,690 V.

Claramente pode-se observar um problema na difusão do analito em relação à pasta de carbono sem MWCNT, pelo perfil de “serra” mostrado na Figura 31 quando comparado com o perfil de resposta mostrado na Figura 23. Este perfil da Figura 31, novamente pode ser atribuído ao excesso de aglutinante (que é isolante) na preparação da pasta de grafite/MWCNT/completo, que foi 150% maior daquele usado na pasta de carbono convencional.

Com os dados obtidos pelas adições sucessivas, traçou-se a respectiva curva analítica, mostrada na Figura 32.

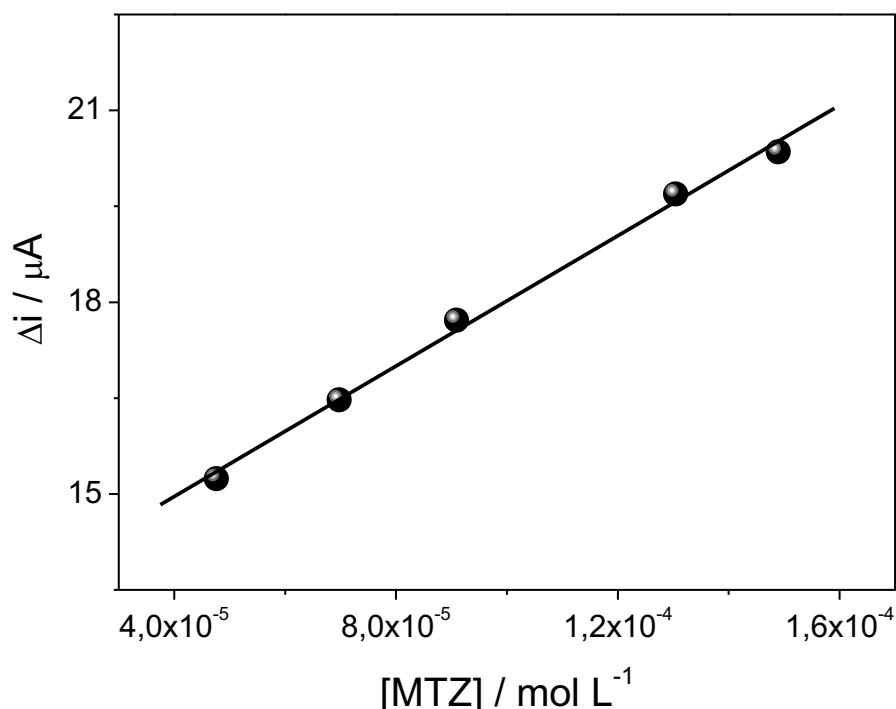


Figura 32: Curva analítica obtida através do amperograma do sensor mostrado na Figura 31.

A equação da reta que representa os dados da Figura 32 é mostrada na equação 5, que foi ajustada com um coeficiente linear de 0,998, para 5 pontos.

$$\Delta i / \mu A = 12,92 (\pm 0,20) + 50.988 (\pm 1947) [\text{Metribuzin}] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{equação 5})$$

Pelos resultados obtidos com o sensor usando MWCNT, e baseados na razão custo – benefício, o sensor à base de pasta de carbono modificada com estes nanomateriais e [CoPc], não trouxe o ganho esperado na sensibilidade para determinação de MTZ, principalmente devido ao bloqueio na transferência eletrônica e na difusão do analito, ocasionado pelo excesso de material isolante aglutinante requerido para obtenção da pasta, sendo 150% a mais desse material em relação à pasta simples. Desta forma, procurou-se outra alternativa para imobilização dos MWCNT junto com o catalisador biomimético na tentativa de aumentar a detectabilidade do sensor para detecção sensível de MTZ, a qual será descrita no item a seguir.

4.3. SENSOR IMPRESSO DE GRAFITE MODIFICADO COM MWCNT E [CoPc]

Para verificar se a modificação do eletrodo impresso com nanotubo de carbono e complexo de cobalto [CoPc], aumentaria a sensibilidade analítica para detecção de metribuzin, em relação ao eletrodo impresso (EI) não modificado e às pastas de carbono modificadas com ftalocianinacobalto (II) e NTCMW, foi primeiramente registrada a voltametria cíclica na ausência e na presença do analito usando os eletrodos impressos não modificados e modificados com NTCMW e [CoPc] 5% (m/m) (Figura 33 e 34). Pode-se observar que na Figura 34 um aumento de corrente a partir de 0 mV é obtido após adição de MTZ e que aumenta conforme o potencial se torna mais negativo. Esta mudança de corrente catódica não é observada no eletrodo impresso sem o complexo (Figura 33). Este resultado mostrou a viabilidade do uso do EI modificado na detecção de MTZ.

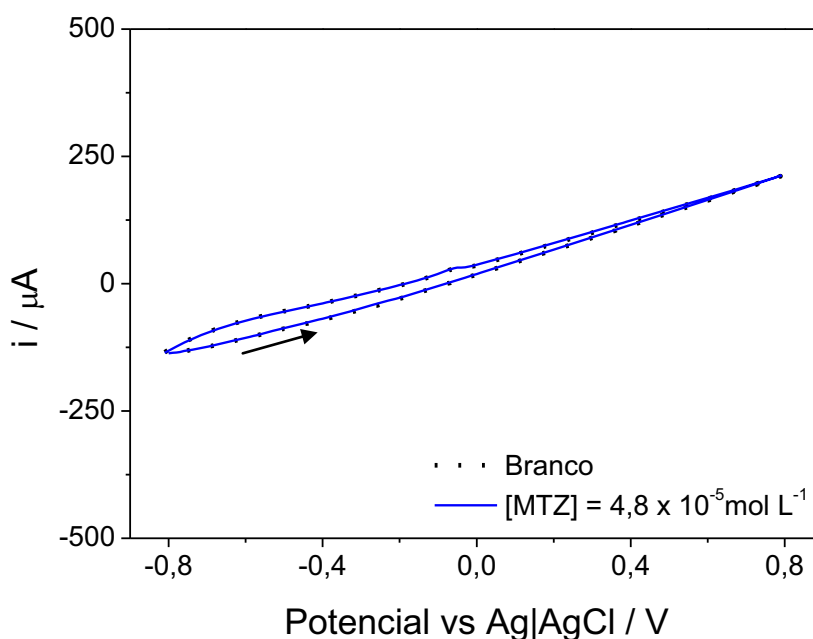


Figura 33: Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso sem modificar. Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), v: 50 mV s⁻¹.

A seguir, sob as mesmas condições otimizadas para o sensor de pasta de carbono com [CoPc], realizaram-se experimentos amperométricos, e observou-se que no potencial de -600 mV, os sinais obtidos eram os melhores. A partir das amperometrias obtidas sob essas condições foi construída a curva analítica mostrada na Figura 35.

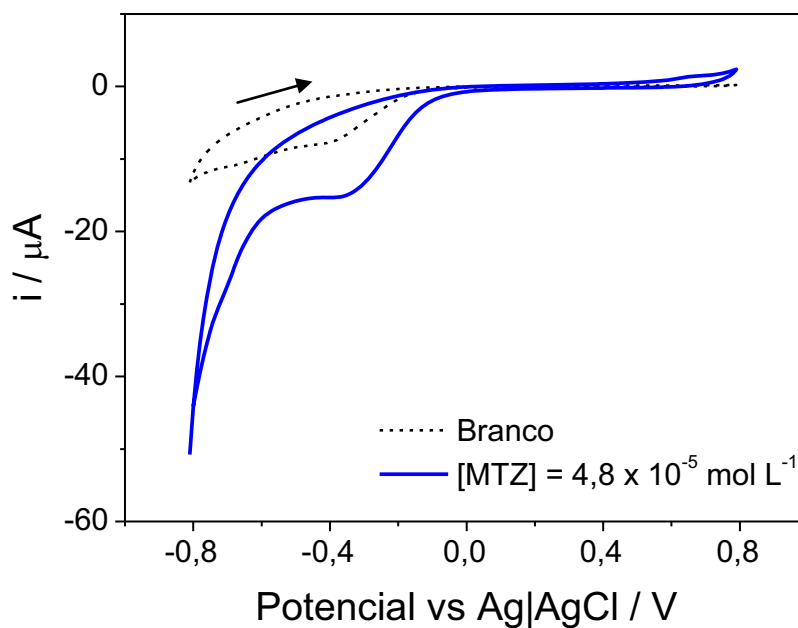


Figura 34: Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 5% (m/m).
Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), ν : 50 mV s⁻¹.

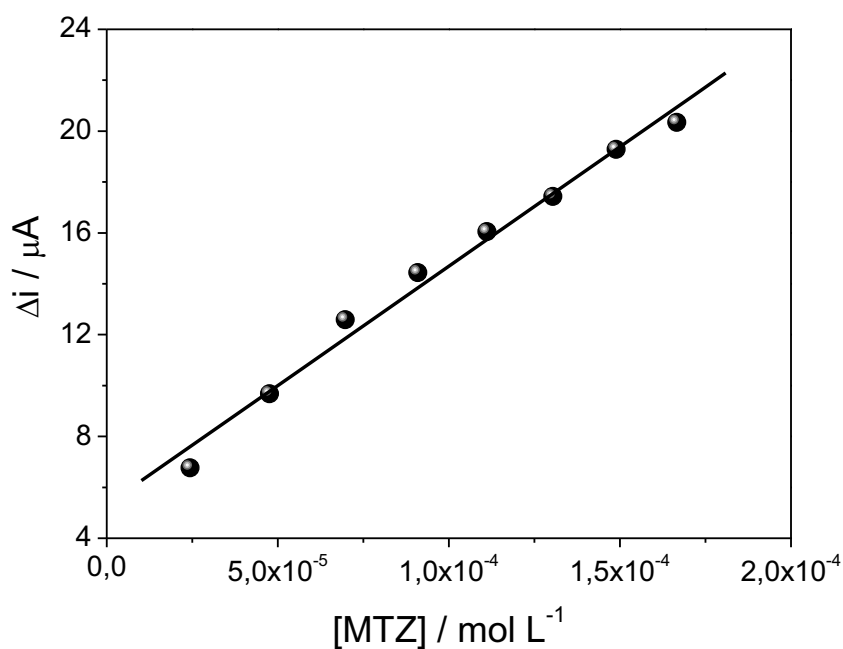


Figura 35: Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 5% (m/m).
Medidas amperométricas realizadas no potencial de - 0,600 V.

A curva analítica da Figura 35 mostrou uma faixa linear de resposta para o metribuzin entre $2,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com uma sensibilidade de 93.828 (± 4487) $\mu\text{A L mol}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

e $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, os quais foram calculados conforme recomendado pela ANVISA⁷¹.

A equação da reta que representa os dados da Figura 35 é mostrada na equação 6 ($R = 0,993$ e $n=8$).

$$\Delta i / \mu\text{A} = 5,3(\pm 0,49) + 93.828(\pm 4487)[\text{Metribuzin}] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{equação 6})$$

A seguir visando preparar e avaliar os sensores impressos com diferentes quantidades de CoPc, foram realizados experimentos voltamétricos e amperométricos usando 0,3% de MWCNT e ftalocianinacobalto (II) em quantidades de 10% (m/m) (Figuras 36 e 37) e 15% (m/m) (Figuras 38 e 39) nos eletrodos impressos modificados.

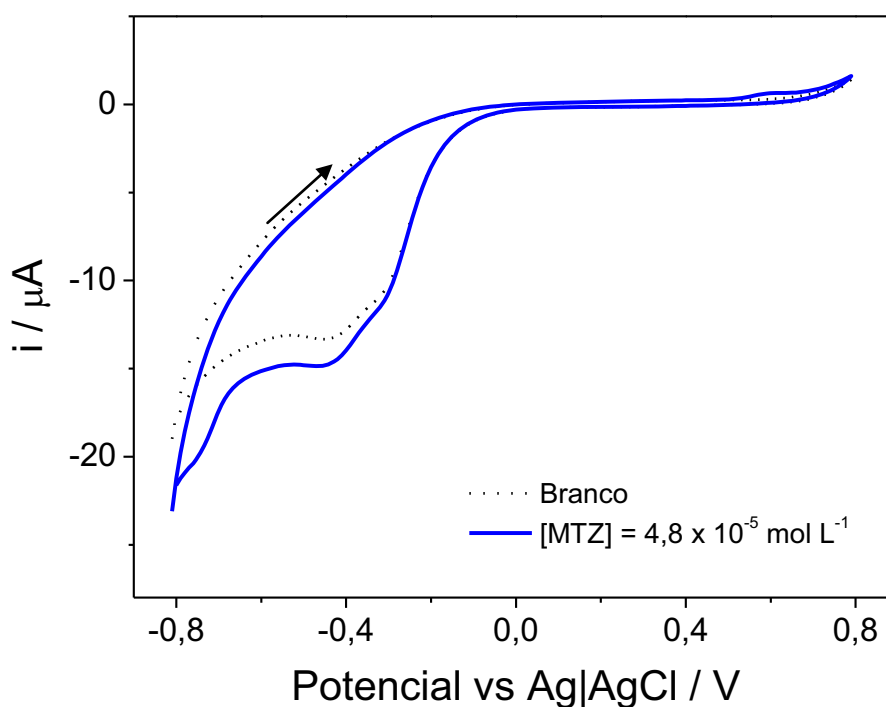


Figura 36: Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 10% (m/m).

Branco: Solução tampão BR $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), v : 50 mV s^{-1} .

A equação da reta que representa os dados da Figura 37 é mostrada na equação 7 ($R = 0,999$ e $n=6$).

$$\Delta i / \mu\text{A} = -0,02(\pm 0,02) + 38.772(\pm 749)[\text{Metribuzin}] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{equação 7})$$

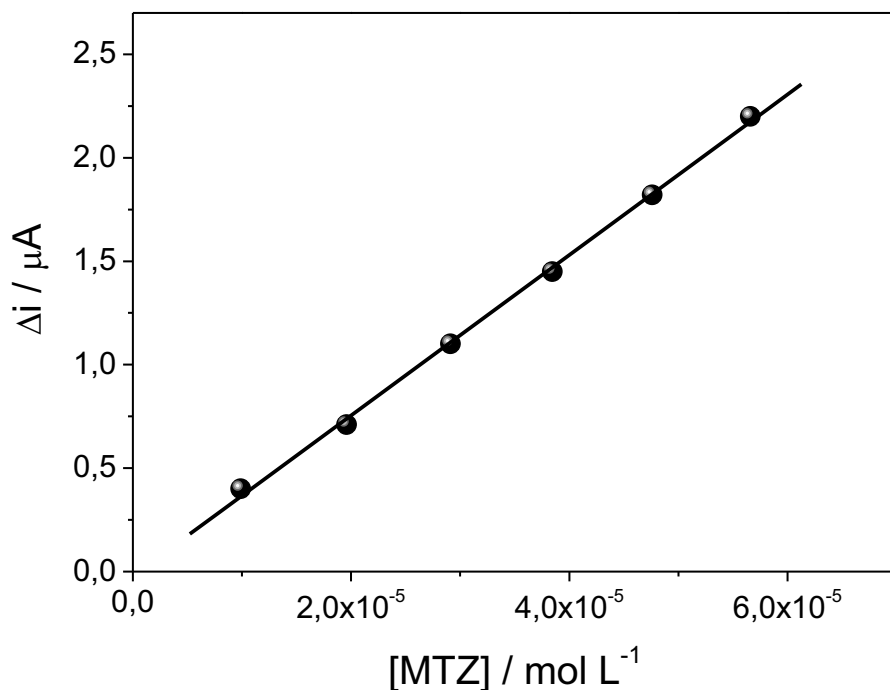


Figura 37: Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 10% (m/m). Medidas amperométricas realizadas no potencial de - 0,600 V.

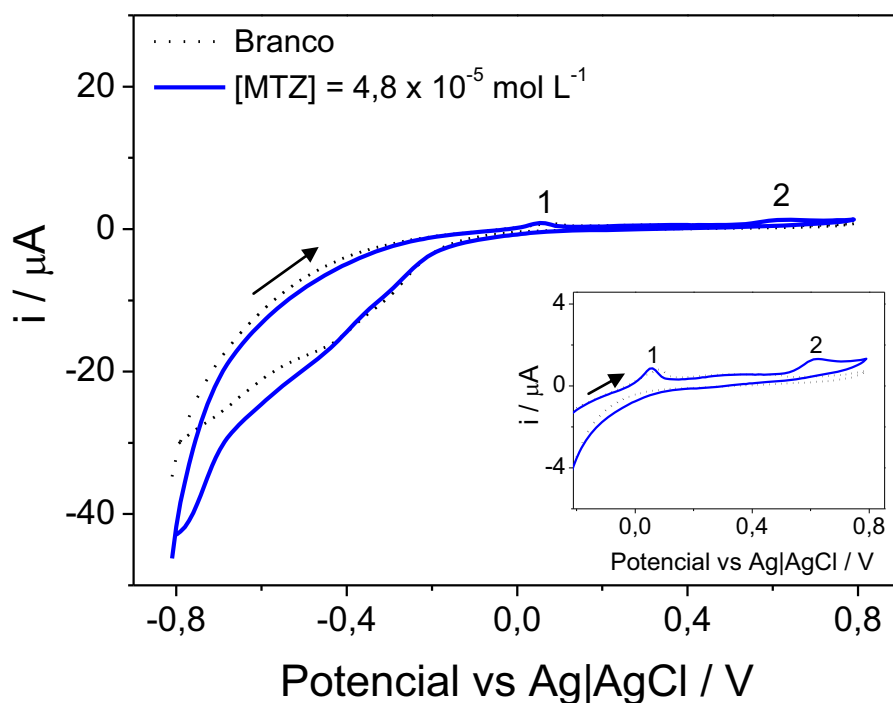


Figura 38: Voltamogramas cíclicos para eletrodo impresso com MWCNT/CoPc a 15% (m/m). Branco: Solução tampão BR 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0), ν : 50 mV s⁻¹.

Dos voltamogramas obtidos com os sensores impressos, observa-se que o pico 2 (no *inset* da Figura 38) que aparece sempre na presença de metribuzin (Figuras 13, 14, 17) se torna bem definido nos sensores impressos (Figuras 34, 36 e 38), assim como, quando usado 15% de complexo, pode ser observado o pico correspondente à CoPc oxidada (pico 1 do *inset* da Figura 38), o que não ocorre nos sensores à base de pasta de carbono por se tratarem de configurações em *bulk*, diferentemente dos Els que são produzidos por finas camadas de material carbonáceo modificado.

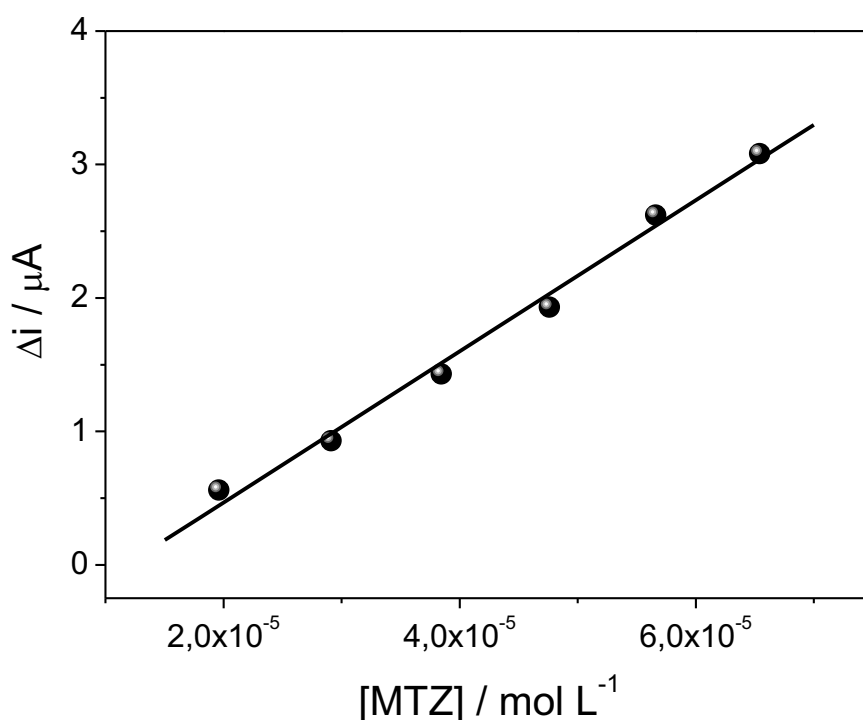


Figura 39: Curva analítica do eletrodo impresso modificado com MWCNT e [CoPc] 15% (m/m). Medidas amperométricas realizadas no potencial de - 0,600 V.

A equação da reta que representa os dados da Figura 39 é mostrada na equação 8 ($R = 0,996$ e $n=6$).

$$\Delta i / \mu A = -0,66(\pm 0,12) + 56.605(\pm 2.650)[\text{Metribuzin}] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{equação 8})$$

Após as análises realizadas com os eletrodos impressos modificados com quantidades diferentes de [CoPc], pode-se observar na Tabela 5 que não houve um

ganho esperado na sensibilidade na detecção do metribuzin, resultado esse que pode ser explicado provavelmente pela menor área ativa dos Els quando comparados às pastas, que apesar de conter nanotubos de carbono a quantidade empregada foi muito pequena (apenas 0,3% da massa total usada na confecção dos eletrodos), então seu efeito na sensibilidade dos sensores foi praticamente nula. Entretanto, em estudos posteriores uma investigação exaustiva da influência da quantidade de nanotubos de carbono na preparação dos Els deverá ser realizado. Por outro lado, o sensor contendo 5% de CoPc foi aquele que forneceu os melhores resultados, uma vez que houve dificuldade na homogeneização da pasta em quantidades maiores de complexo, prejudicando a repetibilidade na construção dos sensores. Entretanto, fica evidente que a CoPc permitirá a confecção e aplicação de sensores seletivos para o MTZ, e experimentos futuros permitirão a melhora da detectabilidade do sistema sensor proposto.

Tabela 5: Comparação das sensibilidades dos eletrodos impressos modificados com MWCNT em diferentes proporções de [CoPc].

Eletrodo impresso	Sensibilidade / $\mu\text{A L mol}^{-1}$
MWCNT + [CoPc] 5% (m/m)	93.828
MWCNT + [CoPc] 10% (m/m)	38.772
MWCNT + [CoPc] 15% (m/m)	56.605

4.4. COMPARAÇÃO TRÊS SENSORES CONSTRUÍDOS

Após as análises e os resultados obtidos para os dois tipos de modificação na pasta de carbono e análise com os três eletrodos impressos com diferentes proporções de [CoPc] na detecção e quantificação do metribuzin, pode-se observar na Tabela 6, que o eletrodo de pasta de carbono modificada com [CoPc] possui uma maior sensibilidade ao analito do que o sensor à base de pasta de carbono com MWCNT e [CoPc], mostrando assim que não houve uma melhoria significativa na detecção e quantificação do metribuzin como se esperava, sendo consequência da

grande quantidade de Nujol[®] necessária para obtenção da pasta contendo os nanotubos de carbono.

Contudo, quando comparados os sensores de pasta de carbono modificada com [CoPc] 15% (m/m) e o eletrodo impresso contendo MWCNT e [CoPc] 5% (m/m), a sensibilidade e o limite de detecção fornecido por este último foi menor, esse resultado pode ser atribuído a quantidade de complexo usado na confecção do eletrodo impresso, que é menor do que a usada na pasta de carbono, e quando essa proporção foi aumentada não foi obtido uma melhora significativa devido a dificuldade de imobilizar o complexo na superfície do eletrodo. Porém, deve ser ressaltado que o limite de quantificação em todos os casos foi praticamente o mesmo, e acredita-se que deva melhorar quando a quantidade de nanotubo de carbono seja aumentada nos EIs.

Tabela 6: Resultados obtidos com a modificação do eletrodo de pasta de carbono e eletrodo impresso.

Tipo de eletrodo e modificação	Sensibilidade / $\mu\text{A L mol L}^{-1}$	R	LOD / mol L^{-1}	LOQ / mol L^{-1}
EPCM com 15% de [CoPc]	155.598	0,999	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-5}$
EPCM com 15% de [CoPc] e 70% de MWCNT	50.988	0,998	$3,9 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$
EI à base de grafite modificado com 0,3% de MWCNT e 5% de [CoPc]	93.828	0,993	$5,2 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-5}$

EPCM: Eletrodo de pasta de carbono modificada; EI: eletrodo impresso; R: coeficiente de Pirson; LOD: limite de detecção e LOQ: limite de quantificação. Todas as percentagens referem-se a m/m.

4.5. APLICAÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS AMBIENTAIS (RIOS)

As amostras de águas de rios foram coletadas em várias localidades próximas à cidade de Araraquara, sendo avaliada a recuperação em amostras enriquecidas com metribuzin usando o sensor de pasta de carbono modificado com [CoPc] 15% (m/m) e o eletrodo impresso modificado com MWNTC e [CoPc] 5% (m/m), com a finalidade de verificar a viabilidade do uso destes sensores nesse tipo de amostras.

Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Tabela 7 para o sensor à base de pasta de carbono e a Tabela 8 para o sensor impresso.

Tabela 7: Dados obtidos na recuperação de metribuzin em amostras de águas de rios usando o sensor à base de pasta de carbono modificada com 15% (m/m) de [CoPc].

Rio	Metribuzin / $\mu\text{mol L}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionada	Encontrada	
Jacaré Pepira	24,4	24,1	98,6 ($\pm 2,8$)
Jacaré Guaçu	24,4	23,8	97,5 ($\pm 2,5$)
Chibarro	24,4	22,8	93,3 ($\pm 2,7$)

Tabela 8: Dados obtidos na recuperação de metribuzin em amostras de águas de rios usando eletrodo impresso modificado com MWCNT e 5% (m/m) [CoPc].

Rio	Metribuzin / $\mu\text{mol L}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionada	Encontrada	
Jacaré Pepira	24,4	24,2	99,3 ($\pm 5,4$)
Jacaré Guaçu	24,4	22,6	92,6 ($\pm 5,1$)
Chibarro	24,4	25,6	105,1 ($\pm 5,8$)

Os resultados encontrados na recuperação em batelada de metribuzin em amostras de águas de rios como pode ser visto nas Tabelas 7 e 8, evidenciam que nesses meios analisados praticamente não ocorreu efeito de matriz.

A partir dos dados encontrados na aplicação do sensor nesse tipo de amostra, pode-se dizer que o método proposto apresentou resultados satisfatórios e dessa forma pode ser usado como um método alternativo ao método oficial de análise para a quantificação de metribuzin.

5. CONCLUSÕES

5.1 O sensor de pasta de carbono modificado com [CoPc] 15% (m/m) desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis, exatas, precisas e seletivas no sistema em batelada.

5.2 Estudos eletroquímicos e características do sensor como sensibilidade, seletividade e afinidade pelo metribuzin, indicam que o complexo ftalocianinacobalto (II), esteja se comportando como um catalisador biomimético da enzima P450 na redução do metribuzin.

5.3 Com base nos resultados obtidos em batelada, conclui-se que a versatilidade e simplicidade apresentadas com o eletrodo de pasta de carbono modificada com ftalocianinacobalto (II) possibilitam que este método se torne uma ferramenta real para análise de metribuzin “em campo”, assim como uma alternativa mais econômica, quando comparada aos outros métodos analíticos já existentes. Pois, foi satisfatoriamente demonstrada a aplicação deste sensor na detecção, quantificação e monitoramento de metribuzin em amostras ambientais.

5.4. Nas medidas eletroquímicas realizadas com eletrodo impresso modificado com ftalocianinacobalto (II) e MWCNT pode-se concluir que foram obtidos resultados satisfatórios, mostrando-se como uma alternativa econômica quando comparado aos outros métodos analíticos.

6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

Como propostas a serem elaboradas para continuidade deste trabalho visando melhora na detectabilidade do dispositivo sensor, assim como automatização do sistema, sugere-se:

6.1. Realizar um estudo detalhado da influência de nanotubos de carbono de parede simples e parede múltipla, na preparação dos sensores impressos.

6.2. Realizar a dispersão da ftalocianina no nanotubo e utilizar essa mistura para a preparação da pasta.

6.3. Construir sistemas impressos completos, contendo o sensor, um eletrodo de referência e um auxiliar, em um mesmo dispositivo, de forma a obter eletrodos descartáveis.

6.4. Acoplar em sistema de análise por injeção em fluxo, os sensores descartáveis obtidos, no intuito de otimizar o tempo de análise e automatizar o sistema.

6.5. Aplicação do sensor em amostras de alimento e solo.

REFERÊNCIAS

- 1 RAGSDALE, N. N. The impact of the food quality protection act on the future of plant disease management. **Rev. Phytopathol.**, v. 38, n. 1, p. 577-596, 2000.
- 2 RICE, P. J.; RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 5367-5376, 2007.
- 3 GONZÁLEZ, R. R. M.; RIAL, O. R.; CANCHO, G. B.; SIMAL, G. J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chem.**, v. 107, p. 1342-1347, 2008.
- 4 KOVALCZUK, T.; LACINA, O.; JECH, M.; POUSTKA, J.; HAJŠL VÁ, J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Addict. Contam.**, v. 25, p. 444-457, Apr. 2008.
- 5 CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; LACINA, O.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1186, p. 281-294, 2008.
- 6 BOTITSI, H.; ECONOMOU, A.; TSIPI, D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, p. 1685-1695, July 2007.
- 7 PICÓ, Y.; LA FARRÉ, M.; SOLER, C.; BARCELÓ, D. Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Imazalil as a case study of quantification. **J. Chromatogr. A.**, v. 1176, p. 123-134, Oct. 2007.
- 8 SWARUP, D.; PATRA, R. C. Environmental pollution and its impact on domestic animals and wildlife. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 75, n. 2, p. 231-240, 2005.
- 9 COHEN, M. Environmental toxins and health. The health impact of pesticides. **Aust. Fam. Phys.**, v. 36, n. 12, p. 1002-1004, 2007.
- 10 KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; YAZDANFAR, N.; SHARIATI, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 606, p. 202-208, Jan. 2008.

11 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC 119. Cria o programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 maio 2003. Disponível em:

<<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7876>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

12 ŠKRBIC, B.; PREDOJEVIC, Z. Levels of organochlorine pesticides in crops and related products from Vojvodina, Serbia: estimated dietary intake. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, n. 4, p. 628-636, May 2008.

13 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos**: autoridades trocam experiências sobre regulação. 10 mar. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm>. Acesso em: 17 jan. 2012.

14 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informativo de procedimentos para avaliação toxicológica de agrotóxicos, seus componentes e afins**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/estrutura/pesticidas.htm>>. Acesso em: 17 Jan. 2012.

15 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Normas sobre o uso de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/uso.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

16 OLIVEIRA, L. A. G. de. **Determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em laranja por dispersão de matriz em fase sólida (MSPD)**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Produção Sustentável, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.

17 HAYES, W. J.; LAWS, E. R. **Handbook pesticides toxicology**. San Diego: Academic Press, 1997.

18 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria Nº 10/SNVS. Base de dados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mar. 1985. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/10_85.htm>. Acesso em: 19 jul. 2011.

19 RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**: contribuição para o uso em plantio direto e convencional. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 2005. p. 373-377.

20 LUDVIK, J.; RIEDL, F.; LISKA, F.; ZUMAN, P. Electrochemical reduction of metribuzin. **Electroanalysis**, v. 10, n. 13, p. 869-876, 1998.

21 SKOPALOVÁ, J.; LEMR, K.; KOTOUCEK, M.; CÁP, L.; BARTÁK, P. Electrochemical behavior and voltametric determination of the metribuzin at mercury electrodes. **Anal. Chem.**, v. 370, p. 963-969, 2001.

- 22 OLNESS, A.; BASTA, N. T.; RINKE, J. Redox effects in resin extraction of herbicides from soil. **Talanta**, v. 57, p. 383-391, July 2002.
- 23 MAJUNDAR, K.; SINGH, N. Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. **Chemosphere**, v. 32, p. 1445-1454, 2003.
- 24 SELIM, H. M.; ZHOU, L.; ZHU, H. Herbicide retention in soil as affected by sugarcane mulch residue. **J. Environ. Qual.**, v. 32, p. 1445-1454, 2003.
- 25 PAPADAKIS, E. M.; PAPADOPOULOU-MOUKIDOU, E. Determination of metribuzin and major conversion products in soils by microwave-assisted water extraction followed by liquid chromatographic analysis of extracts. **J. Chromatogr. A.**, v. 962, p. 9-20, 2002.
- 26 WELLS, M. J. M.; RIEMER, D. D.; WELLS-KNECHT, M. C. Development and optimization of a solid-phase extraction scheme for determination of pesticides metribuzin, atrazine, metolachlor and esfenvalerate in agricultural runoff water. **J. Chromatogr. A.**, v. 659, p. 337-348, 1994.
- 27 HENRIKSEN, T.; SVENSMARK, B.; JUHLER, R. K. Analysis of metribuzin and transformation products in soil by pressurized liquid extraction and chromatographic-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 957, p. 79-87, 2002.
- 28 HUERTAS-PÉREZ, J. F.; IRUELA, M. O.; GARCIA-CAMPANÁ, A. M.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, A. Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 1102, p. 280-286, 2006.
- 29 ERENCHUN, N. R.; GOICOLEA, M. A.; BALUGERA, Z. G.; PORTELA, M. J.; BARRIO, R. J. Determination of herbicides by reductive amperometric detection in liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 763, p. 227-235, 1997.
- 30 WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: VCH, 1994. p. 164-173.
- 31 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.
- 32 FUJIWARA, S. T. **Filme fino do polieletrólito cloreto de 3-n-propiopiridínico silsesquioxano sobre SiO₂/Al₂O₃: preparação, caracterização e aplicações**. 2002. 203 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- 33 OLIVEIRA, M. C. Q.; TANAKA, A. A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. P. T. Studies of the electrochemical degradation of acetaminophen using a real-time biomimetic sensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2616-2621, 2011.
- 34 MOSES, P. R.; WIER, P.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Anal. Chem.**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.

- 35 KATZ, E.; LOTZBEYER, T.; SCHLERETH, D. D.; SCHUHMANN, W.; SCHIMDT, H-L. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinone. Effect of Ca^{2+} cations. **J. Electroanal. Chem.**, v. 373, p. 189-200, 1994.
- 36 PERSSON, B. J. Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electroanal. Chem.**, v. 287, p.183-189,1990.
- 37 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quím. Nova**, v. 25, n. 6, p. 787-976, 2002.
- 38 TIWARI, A.; ARYAL, S.; PILLA, S.; GONG, S. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p. 1401-1407, Feb. 2006.
- 39 ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analy. Chem.**, v. 30, n. 9, p. 1576, Sept. 1958.
- 40 CRESPILO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, ago. 2004.
- 41 SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R.; KUBOTA, L. T. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of p-aminophenol. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, p. 1919-1929, 2007.
- 42 ZHENG, L.; JUN-FENG, S. Electrocatalytic oxidation of methanol and other short chain aliphatic alcohols at Ni(II)-quercetin complex modified multi-wall carbon nanotube paste electrode. **J. Solid State. Electrochem.**, v.14, n. 1, p. 43-50, 2008.
- 43 SHAIDAROVA, L. G.; ZIGANSHINA, S. A.; MEDYANTSEVA, E. P.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric cholinesterase biosensors with carbon paste electrodes modified with cobalt phthalocyanine. **Rus. J. of App. Chem.**, v. 77, n. 2, p. 241-248, Nov. 2004.
- 44 FANJUL-BOLADO, P.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; LAMAS-ARDISANA, P. J.; MARTÍN-PERNÍA, A.; COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. **Electrochem. Acta.**, v. 53, p. 3635-3642, 2008.
- 45 CAI, J.; CIZEK, K.; LONG, B.; McAFERTY, K.; CAMPBELL, C. G.; ALLEE, D. R.; VOGT, B. D.; LA BELLE, J.; WANG, J. Flexible thick-film electrochemical sensors: impact of mechanical bending and stress on the electrochemical behavior. **Sens. Actuators, B**, v. 137, p. 379-385, 2009.

- 46 METTERS, J. P.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **Analyst**, v. 136, p. 1067-1076, 2011.
- 47 NASCIMENTI, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk screen". **Quím. Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, jan. 1998.
- 48 IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- 49 MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing VI: carbon nanotubes. **TrAC-Trends Anal. Chem.**, v. 24, n. 9, p. 826-838, 2005.
- 50 MORAES, F. C. **Nanotubos de carbono no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. 2010. 126 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- 51 WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic. **Anal. Sens.**, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.
- 52 WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000.
- 53 EGGINS, B. R. **Chemical sensors and biosensors**. Chichester: Wiley, 2002.
- 54 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, dez. 2006.
- 55 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Quím. Nova**, v. 25, n.1, p.123-128, fev. 2002.
- 56 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: CRAIG, A. G.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors**. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195.
- 57 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SIGIOLI, A.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrroline as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 4, p. 734-743, 2008.
- 58 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor highly selective for dopamine and analogous compounds determination using bis(2,2'-bipyridil) copper(II) chloride complex. **Electroanalysis**, v. 15, n. 9, p.787-796, June 2003.

- 59 BATISTA, I. V.; LANZA, M. R. V.; DIAS, I. L. T.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Electrochemical sensor highly selective for estradiol valerate determination based on a modified carbon paste with iron tetrapyridinoporphyrazine. **Analyst**, v. 133, n. 12, p. 1692-1699, 2008.
- 60 OLIVEIRA, M. C. Q.; LANZA, M. R. V.; TANKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector. **Anal. Met.**, v. 2, n. 5, p. 507-512, May 2010.
- 61 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. **Comb. Chem. High Thr. Screen.**, v. 13, n. 8, p. 666-674, Sept. 2010.
- 62 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.
- 63 SHIH, Y.; ZEN, J. M.; KUMAR, A. S.; CHEN, P. Y. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, v. 62, p. 912-917, Apr. 2004.
- 64 CONCEIÇÃO, C. D. C.; FARIA, R. C.; FATIBELLO FILHO, O.; TANAKA, A. A. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of hydrazine in industrial boiler feed water using a cobalt phthalocyanine-modified electrode, **Anal. Lett.**, v. 41, n. 6, p. 1010-1021, Jan. 2008.
- 65 BALAN, I.; DAVID, I. G.; DAVID, V.; STOICA, A. I.; STAMATIN, C. M.; CIUCU, I. A. A. Electrocatalytic voltammetric determination of guanine at a cobalt phthalocyanine modified carbon nanotubes paste electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 654, n. 1/2, p. 8-12, 201.
- 66 JUBETE, E.; ZELECHOWSK, K.; LOAIZA, O.; LAMAS, P. J.; OCHOTECO, E.; FARMER, K. D.; ROBERTS, K. P.; BIERNAT, J. F. Derivatization of SWCNTs with cobalt phthalocyanine residues and applications in screen printed electrodes for electrochemical detection of thiocholine. **Electro. Acta**, v. 56, n. 1, p. 3988-3995, Apr. 2011.
- 67 HONEYCHURCH, K. C.; GILBERT, L.; HAR, J. P. Electrocatalytic behaviour of citric acid at a cobalt phthalocyanine-modified screen-printed carbon electrode and its application in pharmaceutical and food analysis. **Anal Bioanal Chem.**, v. 396, n. 8, p. 3103-3111, Apr. 2010.
- 68 SILVA, B. V. M. **Emprego de nanomateriais em imunossensores eletroquímicos para detecção da troponina t cardíaca humana**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

69 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **J. Electro. Chem.**, v. 93, n. 2, p. 163-168, July 1978.

70 BARD, A. J.; FAULKNER, R. D. **Electrochemical methods-fundamental and applications**. 2nd ed. NewYork: Wiley, 2001.

71 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 899, publica o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em:
< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em: 17 jan. 2012.

72 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 157.

73 BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J.; GRABL, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd ed. Weinheim: Chemie, 1983. v. 1, p. 86.