



UNESP - Universidade Estadual Paulista

Instituto de Química - Araraquara
Departamento de Química Analítica



TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para detecção de íon cianeto e do metabólito do diuron, a 3,4-dicloroanilina, em análises ambientais.

Eduardo Carneiro Figueira

**Araraquara
2017**

Eduardo Carneiro Figueira

Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para detecção de íon cianeto e do metabólito do diuron, a 3,4-dicloroanilina, em análises ambientais.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

**Araraquara
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

F475d Figueira, Eduardo Carneiro
Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para
detecção de íon cianteto e do metabolito do diuron, a 3,4-
dicloroanilina, em análises ambientais / Eduardo Carneiro
Figueira. – Araraquara : [s.n.], 2017
108 f. : il.

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

1. Detectores. 2. Água-Poluição. 3. Biossensores.
4. Cianetos. 5. Metabólitos. I. Título.

EDUARDO CARNEIRO FIGUEIRA

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

Araraquara, 21 de setembro de 2017.

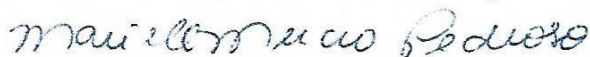
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Marco Aurelio Cebim
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Dr^a. Mariele Mucio Pedroso
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Universidade Federal de São Carlos - UFSCAr, Araras - SP



Prof^a. Dr^a. Renata Kelly Mendes Valente
Pontifícia Universidade Católica - Puccamp, Campinas - SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Felisberto e Maria, por todo amor e ensinamentos. As mulheres da minha vida, Mayara e Isabela, que deram um novo sentido para a vida e um novo significado para a palavra amor.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

(José de Alencar)

*“Somente após a última árvore ser cortada;
Somente após o último rio ser envenenado;
Somente após o último peixe ser pescado;
Somente então o homem descobrirá que dinheiro
não pode ser comido.”*
(Chefe Seattle)

“Ninguém nasce odiando outra pessoa pela cor de sua pele, por sua origem ou ainda por sua religião. Para odiar, as pessoas precisam aprender, e se podem aprender a odiar, elas podem ser ensinadas a amar. ”
(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo o seu amor, fidelidade e misericórdia.

Aos meus pais Felisberto e Maria, por todo amor, dedicação e que sempre me proporcionaram o melhor, de acordo com a realidade vivida em cada etapa da vida.

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

A minha pequena Isabela, por dar um novo sentido à vida. Amo você!

Aos meus irmãos Neto e Rogério, pela amizade, companheirismo, apoio e paciência.

À professora Maria Del Pilar, pela orientação, ensinamentos e ajuda neste trabalho, mas também, principalmente, por ser essa professora amiga e compreensiva.

Aos amigos, Marcos (Harry), Rafa Pupin, Lucas Neres, Ju Brito e Mariele por toda ajuda durante este trabalho e principalmente pela amizade construída.

Aos amigos do laboratório GEAR, por toda troca de conhecimento e pela amizade.

A todos os funcionários do IQ.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Eduardo Carneiro Figueira

Data de Nascimento: 1 de fevereiro de 1983

Naturalidade: Araraquara - SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Casado

Filiação: Felisberto Dias Figueira e Maria Aparecida Carneiro Figueira

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Instituto Federal de São Paulo-IFSP

Função: Professor

Carga horária: 40h (DE)

Início: Fevereiro de 2013; Atual, Local: Matão-SP

Colégio COC

Função: Professor

Início: Fevereiro de 2011; Término: Fevereiro de 2013; Local: Jaú-SP

Colégio Objetivo

Função: Professor

Início: Agosto de 2010; Término: Fevereiro de 2013; Local: Araraquara-SP

Colégio COC

Função: Professor

Início: Março de 2009; Término: Dezembro de 2009.

Início: Fevereiro de 2012; Término: Dezembro de 2013; Local: Matão-SP

Colégio COC

Função: Professor

Início: Março de 2009; Término: Fevereiro de 2013; Local: Araraquara-SP

3. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Química:** UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP
Período: Agosto 2013 – Outubro 2017
Título da tese: Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para detecção de íon cianeto e do metabólito do diuron, a 3,4-dicloroanilina, em análises ambientais. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor
- **Mestrado em Química Analítica:** UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP
Período: Março 2010 - Abril 2012
Título da Dissertação: Estudo e desenvolvimento de sensores biomiméticos baseados em materiais carbonáceos modificados com ftalocianinacobalto (II) para detecção amperométrica de metribuzin.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor
- **Licenciatura em Química:** UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP
Período: Março 2005 - Dezembro 2009

4. PUBLICAÇÕES

- FIGUEIRA, E. C.; NERES, L. C. S.; RUY, M. R. S.; TROIANO, G. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of a biomimetic sensor for selective identification of cyanide. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6353-6360, 2016.
- RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T.; Biomimetic sensor for detection of hydrochlorothiazide employing amperometric detection and chemometry for application in doping in the sport. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2015.
- RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T.; Electroanalytical determination of bumetanide employing a biomimetic sensor for detection of doping in sports. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5792-5798, 2014.

5. EVENTOS CIENTÍFICOS

- NERES, L. C. S.; FIGUEIRA, E. C.; RUY, M. R. S.; FELICIANO, G. T.; SOTOMAYOR, M. P. T. Desenvolvimento de sensor biomimético para identificação de cianeto visando aplicação em química forense. **18º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2016, Florianópolis-SC, Brasil.
- FIGUEIRA, E. C.; RUY, M. R. S.; SOTOMAYOR, M. P. T., Estudio y aplicación de sensor biomimético en la reducción electrocatalítica de metribuzin. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ, 2014, Lima, Peru.
- RUY, M.R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T., Determinación amperométrica de hidroclototiazida en formulaciones farmacéuticas utilizando un electrodo de pasta de carbono modificado con hemina. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ, 2014, Lima, Peru.
- RUY, M.R.S.; FIGUEIRA, E.C.; SOTOMAYOR, M.P.T., Determinación electroanalítica de bumetanida empleando un sensor biomimético para la detección del dopaje en el deporte. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ, 2014, Lima, Peru.

6. OUTRAS EXPERIÊNCIAS ACADÊMICAS

- **Estágio Docência:** na disciplina Análise Instrumental realizado no período de 26/09/2014 a 19/01/2015 - Instituto de Química - UNESP, com uma carga horária de 60 horas.
- **Coorientação de aluno de iniciação científica:** Lucas Neres Chagas da Silva - Projeto intitulado: Desenvolvimento de sensores ópticos e eletroquímicos baseados em polímeros impressos visando aplicação em química forense. (Ago. 2014 - Jun. 2015)

RESUMO

O presente estudo está baseado na construção de sensores biomiméticos para determinação sensível e seletiva de dois poluentes, o íon cianeto, que é liberado no ambiente por meio de efluentes da indústria metalúrgica; e o composto 3,4-dicloroanilina, o metabólito do herbicida diuron que causa alteração do sistema endócrino, largamente usado na agricultura. Para o desenvolvimento dos sensores biomiméticos, eletrodos à base de pasta de carbono foram modificados com complexos que mimetizam o sítio ativo das enzimas P450. Os complexos que apresentaram perfil biomimético e melhores resultados na determinação voltamétrica do íon cianeto e do 3,4-dicloroanilina, foram respectivamente 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H, 31H-ftalocianinacobalto (II) $[\text{Co(II)PcF}_{16}]$ e ftalocianinacobre (II) $[\text{Cu(II)Pc}]$. O sensor construído para a determinação do íon cianeto apresentou as melhores respostas utilizando como eletrólito de suporte o hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 12,0 e 15% m/m do complexo $[\text{Co(II)PcF}_{16}]$, usando a voltametria de onda quadrada a 20 Hz de frequência, 10 mV de amplitude e 10 mV de incremento de potencial (ΔE s). Com os parâmetros otimizados, o sensor apresentou uma faixa linear de resposta de $2,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e limites de detecção e de quantificação de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os melhores resultados obtidos para o sensor desenvolvido para o herbicida 3,4-dicloroanilina foram em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 e 15% m/m de $[\text{Cu(II)Pc}]$, usando a voltametria de onda quadrada a 30 Hz de frequência, 100 mV de amplitude e 5 mV de incremento de potencial (ΔE s). Com os parâmetros otimizados, o sensor apresentou uma faixa linear de resposta de $2,8 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e limites de detecção e de quantificação de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. Avaliou-se também a biomimeticidade dos sensores, explorando o perfil hiperbólico da resposta nos mesmos, velocidade de varredura e estudo de interferentes. Os sensores foram satisfatoriamente usados nas análises em amostras ambientais, como águas de rios. Assim se apresentam como alternativas vantajosas em relação a outros métodos disponíveis, pois para a aplicação das metodologias, há necessidade de um baixo consumo de reagentes e amostras, apresentam baixo custo relativo, além de serem simples, rápidos e não requererem procedimentos específicos ou complicados para o preparo das amostras.

ABSTRACT

The present study is based on the construction of biomimetic sensors for the sensitive and selective determination of two pollutants, the cyanide ion, which is released into the environment through effluents from the metallurgical industry and 3,4-dichloroaniline, the metabolite of the herbicide diuron that causes alteration of the endocrine system, widely used in agriculture. For the development of biomimetic sensors, carbon paste-based electrodes have been modified with complexes that mimic the active site of the P450 enzymes. The complexes that presented biomimetic profile and better analytical performance in the voltammetric determination of cyanide and 3,4-dichloroaniline were respectively *1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25*-hexadecafluoro-*29H,31H*-phthalocyanincobalt (II) [Co(II)PcF₁₆] and phthalocyaninecopper (II) [Cu(II)Pc]. The sensor constructed for the determination of the cyanide ion presented the best responses using sodium hydroxide 0.5 mol L⁻¹ pH 12.0 and 15% w/w of the [Co(II)PcF₁₆] complex as the support electrolyte, using square wave voltammetry at 20 Hz frequency, 10 mV amplitude and 10 mV potential increase (ΔE s). With the optimized parameters, the sensor had a linear response range of 2.4×10^{-5} mol L⁻¹ to 1.7×10^{-4} mol L⁻¹ and limits of detection and quantification of 1.1×10^{-5} mol L⁻¹ and 3.6×10^{-5} mol L⁻¹, respectively. The best results for the 3,4-dichloroaniline herbicide were obtained in Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹ pH 5.0 buffer and 15% w/w [Cu(II)Pc] using square wave voltammetry at 30 Hz frequency, 100 mV amplitude and 5 mV potential increase (ΔE s). Under optimized conditions, the sensor presented a linear response range of 2.8×10^{-5} to 3.0×10^{-4} mol L⁻¹ and limits of detection and quantification of 1.1×10^{-5} mol L⁻¹ and 3.7×10^{-5} mol L⁻¹, respectively. The biomimeticity of the sensors were also evaluated, exploring the hyperbolic profile of each response, scan rate and interferences. The sensors were satisfactorily used in the analyzes in environmental samples, such as river waters. They are presented as advantageous alternatives in relation to other available methods, due to proposed methodologies allowed a low consumption of reagents, present low cost, simplicity, quick and do not require specific or complicated procedures for sample preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de água no Brasil.	19
Figura 2. Diagrama de distribuição de espécies para o sistema CN^- em H_2O a $25^\circ C$	22
Figura 3. Publicações relacionadas a determinação do íon cianeto.	24
Figura 4. Crescimento populacional mundial e projeções.	29
Figura 5. Fórmula estrutural do herbicida Diruon.	33
Figura 6. Esquema do transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese.	33
Figura 7. Estrutura do Diuron e de seus principais metabólitos.	34
Figura 8. Ilustração de um sensor eletroquímico.	40
Figura 9. Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) voltamograma obtido para um sistema reversível.	42
Figura 10. a) Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox: b) sistema reversível e c) sistema irreversível [75].	43
Figura 11. Estrutura da protoporfirina de ferro IX presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.	45
Figura 12. Estrutura química dos complexos: a) 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25–hexadecafluoro–29H,31H–ftalocianinacobalto (II) e b) ftalocianina de cobre (II).	46
Figura 13. Fluxograma ilustrativo das etapas de preparação da pasta modificada.	53
Figura 14. Ilustração representativa de uma cela eletroquímica.	54
Figura 15. Fotografia da aparelhagem usada.	54
Figura 16. Perfis eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica, sendo (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) CoPcF16, com (---) adição de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto. Medições realizadas utilizando uma solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).	58
Figura 17. Voltamogramas de onda quadrada para eletrodo de pasta sem modificação. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte, uma solução de NaOH (pH 12,0), Amplitude: 10 mV, Frequência: 10 Hz e incremento de potencial: 5 mV.	60
Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono modificada com [CoPcF16]. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte, uma solução de NaOH (pH 12,0), Amplitude: 10 mV, Frequência: 10 Hz e incremento de potencial: 5 mV.	60
Figura 19. Voltamogramas cíclicos para o sensor em $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto e em diversas velocidades de varredura.	61

Figura 20. Variação da corrente de pico catódico (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com [CoPcF16]. Contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto.....	62
Figura 21. Variação da corrente de pico catódico normalizada ($(\Delta i_{pc} v^{-1/2})$ vs v Medidas realizadas em uma solução de NaOH, pH 12 contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto.	63
Figura 22. Relação da porcentagem de modificador e a sensibilidade.....	64
Figura 23. Relação da concentração do eletrólito e a sensibilidade.	65
Figura 24. Relação do pH do eletrólito e a sensibilidade.	65
Figura 25. Relação da frequência e a sensibilidade.....	66
Figura 26. Relação da amplitude de pulso e a sensibilidade.	67
Figura 27. Relação do incremento de potencial e a sensibilidade.....	67
Figura 28A. Perfil de resposta do sensor para cianeto em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Eletrólito NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 12, amplitude: 10 mV, frequência: 20 Hz e incremento potencial: 10 mV.	68
Figura 1B. Ampliação do perfil de resposta do sensor para cianeto em voltametria de onda quadrada relativo a Figura 28A.....	69
Figura 29. Curva analítica obtida nas condições otimizadas. Eletrólito NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 12, amplitude: 10 mV, frequência: 20 Hz e incremento potencial: 10 mV.....	69
Figura 30. Perfil hiperbólico do sensor modificado com o complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 - hexadecafluoro - 29H - 31H – ftalocianinacobalto (II).....	72
Figura 31. Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 30.	73
Figura 32. Perfis eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica, sendo (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) Cu(II)Pc , com (- - -) adição de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3,4-DCA. Medições realizadas utilizando solução tampão BR (pH 5,0).	78
Figura 33. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono não modificada. Medidas realizadas usando solução tampão BR (pH 5,0), Amplitude:10 mV, Frequência:10 Hz e Incremento de potencial: 5 mV.	79
Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono modificada com [Cu(II)Pc]. Medidas realizadas usando solução tampão BR (pH 5,0), Amplitude:10 mV, Frequência:10 Hz e Incremento de potencial: 5 mV.	79
Figura 35. Voltamogramas cíclicos para o sensor em $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto e em diversas velocidades de varredura.	80

Figura 36. Variação da corrente de pico catódico (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com [Cu(II)Pc]. Contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 3,4-DCA.....	81
Figura 37. Relação da porcentagem de modificador e a sensibilidade.....	83
Figura 38. Relação do pH da solução tampão Britton-Robinson e a sensibilidade.....	83
Figura 39. Relação da natureza da solução tampão e a sensibilidade.	84
Figura 40. Relação da concentração do eletrólito e a sensibilidade.	85
Figura 41. Relação da frequência e a sensibilidade.....	86
Figura 42. Relação da amplitude de pulso e a sensibilidade.	86
Figura 43. Relação do incremento de potencial e a sensibilidade.....	87
Figura 44. Perfil de resposta do sensor para 3,4-DCA em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento potencial: 5,0 mV.....	88
Figura 45. Curva analítica obtida nas condições otimizadas. Solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento potencial: 5,0 mV.....	88
Figura 46. Perfil de resposta do sensor para os possíveis interferentes do herbicida 3,4-DCA em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento potencial: 5,0 mV.....	91
Figura 47. Perfil hiperbólico do sensor modificado com o complexo ftalocianina de cobre (II).....	92
Figura 48. Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 48.....	93
Figura 49. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes de estabilidade dos complexos de Au(I) [5].....	21
Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida e ao agrupamento químico [46, 47].....	31
Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos quanto ao potencial de periculosidade [45, 47].....	32
Tabela 4. Exemplos de agrotóxicos metabolizados pelas enzimas citocromo P450.	45
Tabela 5. Complexos analisados como modificadores na presença de $1,1 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de íon cianeto utilizando como eletrólito NaOH (pH 10,0).	57
Tabela 6. Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de cianeto.....	68
Tabela 7. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.	70
Tabela 8. Sais analisados para o estudo de possíveis interferentes.	71
Tabela 9. Dados obtidos na recuperação de cianeto em amostras de águas de rios e em água mineral usando o sensor a base de pasta de carbono modificada com 15% (m/m) do complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 - hexadecafluoro - 29H - 31H – ftalocianinacobalto(II).	75
Tabela 10. Complexos analisados como modificadores na presença de $4,8 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 3,4-DCA utilizando solução tampão BR (pH 5,0).....	77
Tabela 11. Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de 3,4-dicloroanilina.....	87
Tabela 12. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.	90
Tabela 13. Agrotóxicos analisados para o estudo de possíveis interferentes.	91
Tabela 14. Dados obtidos na recuperação de 3-,4-dicloroanilina em amostras de águas de rios.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA – Agência Nacional de Águas
B.R. - Britton-Robinson
CE - *Chemical/Electrochemical*
CG - Cromatografia gasosa
CL- Cromatografia líquida
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCMU - 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia
DCPMU - 3,4-diclorofenil-metil-uréia
DCPU - 3,4-diclorofenil-uréia
3,4-DCA - 3,4-dicloroanilina
DDT - Diclorodifeniltricloroetano
EPA - *United States Environmental Protection Agency*
E_{Pc} -Potencial de pico catódico
E_{Pa} - Potencial de pico anódico
EPC - Eletrodo de pasta de carbono
IUPAC - União Internacional da Química Pura e Aplicada
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
ONU – Organização das Nações Unidas
UV - Ultravioleta
Vis - Visível
VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

LISTA DE SIMBOLOS

A - ampères

°C - graus Celsius

DL – dose letal

Δi - variação de corrente elétrica

ΔE_p - amplitude do pulso

ΔE_s - incremento de potencial

i - corrente elétrica

nm - nanômetros

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

σ – desvio padrão

V - volts

v - velocidade de varredura

μ - micro

t - tempo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Considerações Gerais.....	19
1.2. Indústria Metalúrgica.....	20
1.2.1. Íon Cianeto	22
1.2.2. Métodos de Determinação do íon Cianeto	23
1.3. Agrotóxicos.....	29
1.3.1. 3,4-dicloroanilina.....	32
1.3.2. Métodos de Determinação do 3,4-dicloroanilina	35
1.4. Sensores Químicos.....	39
1.4.1. Sensores Eletroquímicos	40
1.4.2. Sensores Biomiméticos	43
2. OBJETIVOS.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Instrumentação Básica	49
3.2. Reagentes e Soluções.....	49
3.3. Preparo das Soluções	50
3.4. Preparo das Amostras	51
3.5. Construção dos Sensores	52
3.6. Medidas Eletroquímicas	53
3.7. Determinação cromatográfica de 3,4-dicloroanilina.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo para detecção de cianeto	56
4.1.1. Caracterização eletroquímica do sensor utilizando estudos voltamétricos	56
4.1.2. Otimização da resposta do sensor	63
4.1.3. Perfil de resposta do sensor	68
4.1.4. Estudo de seletividade	71
4.1.5. Verificação do caráter biomimético do sensor	71
4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor	73
4.1.7. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras ambientais (rios) e de água mineral	74
4.2. SENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM COMPLEXO PARA DETECÇÃO DE 3,4-DICLOROANILINA.	76
4.2.1. Caracterização eletroquímica do sensor utilizando estudos voltamétricos	76

4.2.2.	Otimização da resposta do sensor	82
4.2.3.	Perfil de resposta do sensor	87
4.2.4.	Estudo de seletividade	90
4.2.5.	Verificação do caráter biomimético do sensor	92
4.2.6.	Proposta de mecanismo de resposta do sensor	93
4.2.7.	Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras ambientais (rios)	94
5.	CONCLUSÕES	96
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
	REFERÊNCIAS	98

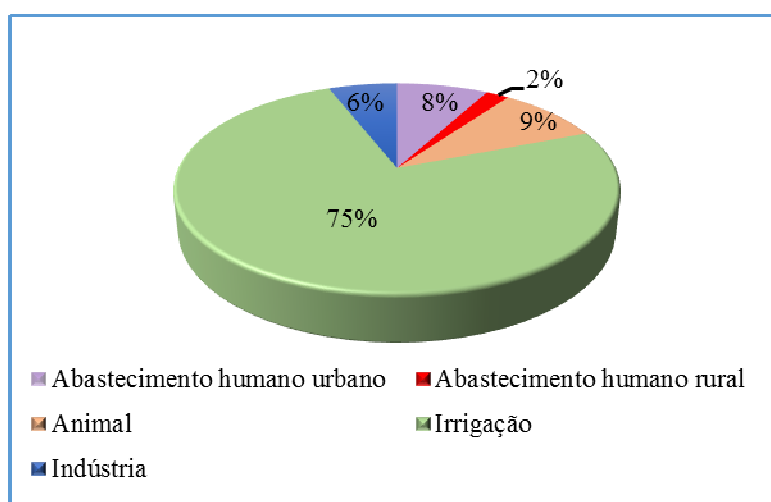
1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

O Brasil é um país com dimensões continentais e quando comparado com outros países, possui grande oferta de água. Esse recurso natural abundante no Brasil, está distribuído de forma heterogênea pelo território, sendo que aproximadamente 80% da vazão hídrica está localizado na bacia Amazônica e os outros 20% distribuídos nas demais regiões do país [1,2].

As regiões beneficiadas com 20% de vazão hídrica, utilizam 75% desse recurso para a irrigação na agricultura, 8% para o abastecimento humano urbano e 6% são utilizados pela indústria, tal como observado na **Figura 1** [2].

Figura 2. Consumo de água no Brasil.



Fonte: Agência Nacional das Águas

As práticas humanas que demandam de uma maior quantidade de água, também são práticas que a poluem. A poluição das águas pode ser definida como o lançamento ou a infiltração de substâncias nocivas causadas por diferentes atividades executadas pelo homem, sendo essas: industrial, mineração, despejo de esgoto e a principal é a atividade agrícola [3].

Nesse trabalho será abordada a poluição das águas ocasionadas pela liberação do íon cianeto proveniente principalmente da indústria metalúrgica e; a poluição das águas pelo uso de agrotóxicos em atividades agrícolas, por meio de seus metabólitos, que normalmente são espécies mais solúveis que os correspondentes pesticidas. Neste caso específico foi escolhido o composto 3,4-dicloroanilina, que é o metabólito do herbicida Diuron que causa alterações

no sistema endócrino e pode originar um produto mutagênico, potencialmente cancerígeno. [4].

1.2. Indústria Metalúrgica

As indústrias metalúrgicas, até o século XVI utilizavam a separação gravimétrica seguida de amalgamação como técnica de extração de ouro, porém, uma vez esgotados os minérios de mais fácil lavra e extração, os mineradores depararam-se com as dificuldades de extração de ouro fino e ouro associado a sulfetos, para os quais as técnicas de separação gravimétrica e amalgamação não se mostravam tão eficientes [5]. Foi nesse cenário que surgiu o processo hidrometalúrgico de cianetação, processo que se baseia na capacidade do cianeto em formar complexo com o ouro, no qual o cianeto é utilizado na forma de sais, como o cianeto de sódio (NaCN) ou de potássio (KCN) [5]. Em sua forma livre, é uma espécie química que pode ser encontrada com frequência em efluentes resultantes da extração do ouro e que se combina com elementos químicos deste ou de outro meio, formando complexos tóxicos. Os complexos mais tóxicos são os menos estáveis como os compostos $\text{Zn}(\text{CN})_4^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^-$ e os que possuem maior estabilidade, portanto menos tóxicos são os compostos $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ e $\text{Co}(\text{CN})_6^{-4}$ [6].

As primeiras utilizações do processo de cianetação para a extração de minérios ocorreram em 1887 e foram realizadas por McARTHUR e FORREST, após essa aplicação, o processo foi difundido para todo o resto do mundo, acarretando um crescimento exponencial na produção de ouro [5-7].

Para a realização da extração do ouro, é necessário a sua dissolução e, para isso, requer a combinação de um agente oxidante, como o oxigênio, e agentes complexantes específicos, como o íon cloreto, tiouréia e cianeto, capazes de estabilizarem os íons áurico ou auroso em solução [5], sendo assim, as principais vantagens do uso de cianeto no processo de extração do ouro são: o baixo custo e a estabilidade do complexo dicianoaurato formado [6].

Na **Tabela 1**, pode-se observar a grande estabilidade do complexo dicianoaurato em relação aos outros agentes complexantes.

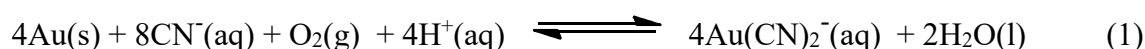
Tabela 1. Constantes de estabilidade dos complexos de Au(I) [5].

Complexo	Log β^*
Au(CN)_2^-	38
$^{(a)}\text{AuTu}_2^+$	23,3
$\text{Au(S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$	28,7
Au(SCN)_2^-	17,1
AuBr_2^-	12
AuCl_2^-	9

* β representa a constante de equilíbrio para a seguinte reação de complexação do metal:

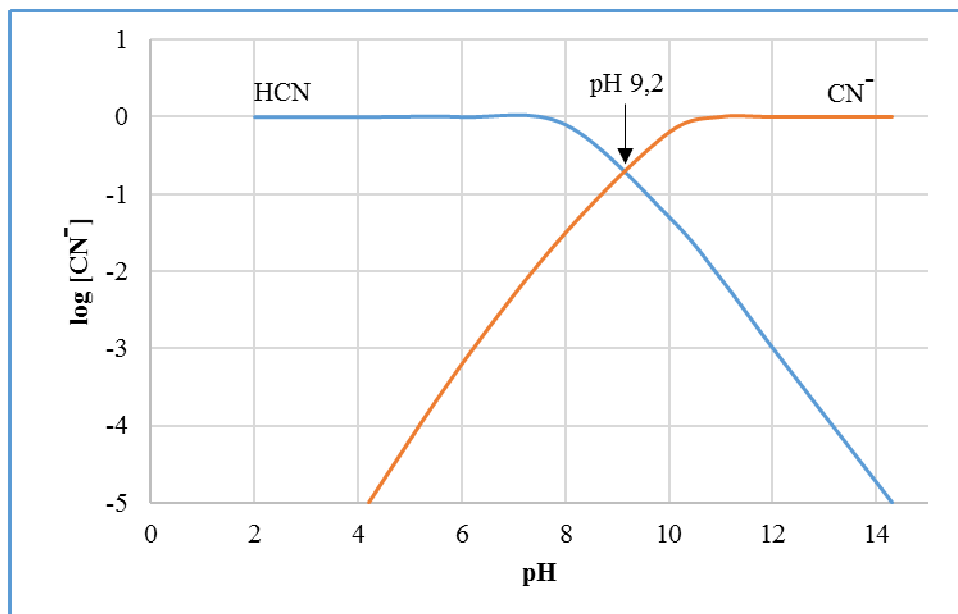
$\text{Au}^+ + n\text{C}^{m-} = \text{Au(C)}_n^{1-m}$, $^{(a)}\text{Tu}$ representa tiouréia, $\text{CS(NH}_2)_2$.

O processo de cianetação é influenciado por alguns fatores como: pH, temperatura, concentração de cianeto e de oxigênio. A cianetação baseia-se na capacidade do cianeto, proveniente da hidrólise do sal do cianeto de sódio ou cianeto de potássio, em formar complexo com o ouro e assim a dissolução do metal, esse processo está ilustrado na reação global (1) [5]:



A posterior dissociação do ácido em íons H^+ e CN^- tem implicações importantes na prática da cianetação. O ácido cianídrico apresenta uma elevada pressão de vapor, o que favorece a formação do gás HCN. Por razões econômicas (perdas de reagente) e ambientais (toxicidade do gás cianídrico), a cianetação deverá ser conduzida em condições em que a formação desse gás seja minimizada. O diagrama de distribuição de espécies para o sistema HCN/CN^- , mostrado na **Figura 2**, ilustra que, em pH 9,2 ($\text{pH} = -\log K_a$), as concentrações das espécies dissociada e não dissociada são iguais. Em pH inferior a 9,2 a espécie HCN predomina, enquanto em pH superior a 9,2, a forma dissociada, CN^- , prevalece. Na prática industrial, o pH é mantido em torno de 10,5, sendo que o valor final depende das características do minério [5].

Figura 3. Diagrama de distribuição de espécies para o sistema CN^- em H_2O a 25°C .



Fonte: CIMINELLI, V. S. T.; GOMES, A. D. G. Princípios da cianetação. In: Extração do ouro - Princípios, Tecnologia e Meio Ambiente. 2002, p. 51-82.

O cianeto é utilizado em outros segmentos industriais, tais como: indústria de galvanoplastia, tratamentos térmicos de aços, síntese de produtos químicos inorgânicos e orgânicos e fabricação de plásticos [8], o que destaca a importância de conhecer as propriedades, características e legislações relativas ao íon cianeto.

1.2.1. Íon Cianeto

Os compostos de cianeto possuem um importante papel na indústria química, entretanto os cianetos são altamente tóxicos, cuja toxicidade depende da sua forma química e da constante de estabilidade, sendo assim, quanto maior a instabilidade do ciano composto, maior será a toxicidade.

O ácido cianídrico é altamente tóxico, pois é um composto volátil e com baixa estabilidade, quando inalado em concentrações elevadas, o ácido causa asfixia, inconsciência, convulsão e morte por falência respiratória. A dose letal de cianeto por inalação é de $10 \mu\text{g}$ de CN^- por litro de ar. O ácido possui alta tendência em atacar a enzima Citocromo C, inibindo sua função na cadeia de transporte de elétrons e levando a hipóxia citotóxica, asfixia celular e acidose láctica que finalmente resultam na morte em poucos minutos [9,10].

Quando o cianeto (CN^-) é ingerido, parte da quantidade ingerida chega ao fígado e é transformado no íon tiocianato (SCN^-), que posteriormente é eliminado na urina. A dose letal varia entre 0,5 a 3,5 mg kg^{-1} de peso corporal e a ingestão causa cefaleia, descontrole de movimentos, palpitações e convulsões, levando a morte após 1 hora da ingestão [9,10].

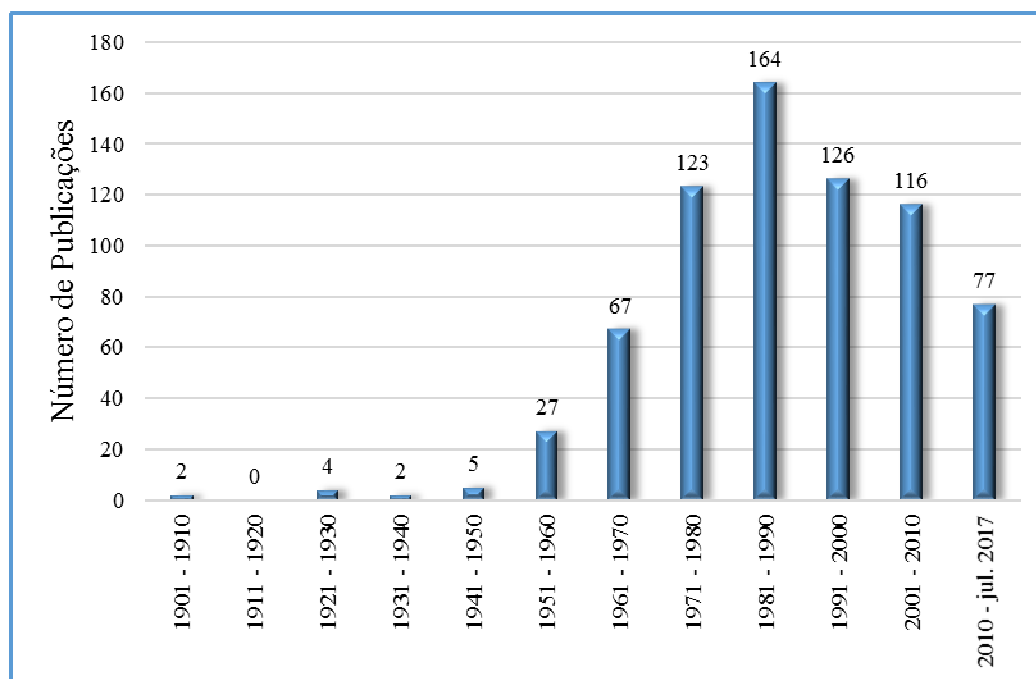
Além das ameaças mais imediatas citadas acima, estes complexos de cianetos representam também riscos potenciais para o meio ambiente se não forem tratados antes da liberação nos efluentes. Os corpos d'água, não apenas as águas superficiais como também os lençóis freáticos, são os mais atingidos pelos contaminantes. Os limites de concentração permitidos em ambientes de trabalho, efluentes e em águas potáveis são baixos [11]. No Brasil, órgãos públicos ligados ao controle ambiental de poluição determinaram os valores máximos permitidos em diversas categorias, assim, de acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, águas potáveis e efluentes, o limite de tolerância para cianeto é de 0,005 mg L^{-1} e 0,2 mg L^{-1} , respectivamente [12]. Adicionalmente, segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA) esse limite é de 0,2 mg L^{-1} em água potável [13].

Dessa forma, buscar soluções para minimizar o impacto ambiental desse poluente, por meio da determinação e quantificação de cianeto, é de extrema importância. Para as determinações das concentrações das diferentes formas de cianeto, vários métodos analíticos têm sido utilizados.

1.2.2. Métodos de Determinação do íon Cianeto

Um levantamento bibliográfico foi realizado na principal fonte de consulta eletrônica (Scifinder Scholar[®]) utilizando as palavras chaves: “determination of cyanide” e “analysis of cyanide” e foram encontradas 713 publicações sobre métodos analíticos para a determinação de cianeto no período compreendido de 1901 a junho/2017. Na **Figura 3**, têm-se a distribuição dessas publicações.

Figura 4. Publicações relacionadas a determinação do íon cianeto.



Fonte: Scifinder Scholar®

De um modo geral, os métodos destinam-se à detecção e/ou quantificação de cianeto em diversas matrizes, tais como: fluídos biológicos (urina, sangue e plasma), saliva, bebidas e em amostras de águas. Diferentes métodos são encontrados para a determinação de cianeto, tais como: cromatográficos, quimioluminescentes, fluorescentes, piezoelétricos, colorimétricos e espectrofotométricos, estes por muitas vezes são acoplados a análise em fluxo, dentre outros métodos. Segundo a *American Public Health Association* e *Environmental Protection Agency* (EPA), os métodos oficiais para a determinação de cianetos incluem análise por titulação, espectrofotometria, potenciometria com eletrodos seletivos de cianeto, injeção de fluxo com detecção amperométrica utilizando eletrodos íons seletivos [13].

Os métodos espectrofotométricos, por apresentarem simplicidade instrumental e operacional, estão entre os métodos mais utilizados para determinação de cianeto. WANG et al [14] determinaram cianeto em água usando um pré-tratamento de destilação automática para a reação entre o analito e ácido isonicotínico-pirazolona com detecção por espectrofotometria. Parâmetros como pressão de vácuo, taxa de absorção, tempo de aquecimento foram otimizados. As recuperações de amostras reais foram de 95% a 104%, a precisão de 2,6% a 4,6%, de acordo com os requisitos do monitoramento ambiental da água.

SUN, ZHANG e HU [15] desenvolveram um método com determinação espectrofotométrica de fluxo contínuo para quantificação de cianeto em águas residuais

oleosas utilizando extração com hexano. A faixa linear do método foi de 0,005-0,500 mg L⁻¹ e o limite de detecção foi de 0,0009 mg L⁻¹. As recuperações das amostras variaram de 85,0% a 110,0% com desvio padrão relativo entre 2,3% - 5,6% (n= 6). O método possui boa reprodutibilidade, baixo limite de detecção, com um pré-tratamento simples.

SURLEVA et al [16] propuseram uma melhora na reação da ninidrina com o cianeto para detecção espectrofotométrica. Esse método foi empregado em amostras reais de água, fumaça de cigarro, urina e plantas cianogênicas, conseguindo um procedimento adequado de pré-tratamento de amostras para a liberação e separação de cianetos. A reação entre cianeto e ninidrina é suficientemente rápida para ser realizada em condições ambientais, mas o reagente de ninidrina deve ser preparado recentemente em solvente livre de oxigênio. O limite de detecção foi 8 ppb. A recuperação de CN⁻ foi de (100,5 ± 0,1)%, enquanto a precisão foi de 1,7%. Além disso, a absorbância a 485 nm provou ser dependente da temperatura em todas as medidas, a reação à base de ninidrina provou ser confiável, econômica e ambientalmente amigável.

CAI, ZHONG e DING [17] propõem uma metodologia utilizando a reação 5,0 mL de ácido isonicotínico e pirazona, sendo o cianeto determinado no comprimento de onda de 638 nm, além disso, usaram comprimidos efervescentes que são fáceis de conservar e possuem cores estáveis, em vez de cloramina T, apresentando uma recuperação nas amostras de água satisfatória. YU [18] fez a determinação do cianeto na água por espectrofotometria utilizando ácido isonicotínico-ácido barbitúrico, o método mostrou-se eficiente e com boa precisão nas análises de amostras de água.

Métodos de cromatografia iônica também são desenvolvidos em quantidades significativas, uma vez que estes apresentam alta sensibilidade e seletividade. DESTANOGLU e GUMUS-YILMAZ [19] propuseram um método seletivo, sensível e confiável para determinação simultânea direta de cianato, tiocianato e cromo hexavalente por cromatografia iônica com detecção condutométrica. Utilizando o mesmo sistema cromatográfico, determinaram-se também cianetos. No entanto, uma vez que os cianetos não podem ser detectados pelo método direto, os íons de cianeto livre foram convertidos em cianato com cloramina-T em pH alcalino, assim, os cianetos metálicos fortemente complexados foram convertidos em cianato usando foto-oxidação. O método proposto foi aplicado para análise simultânea de cianeto e cromo hexavalente em soluções de banho de galvanoplastia e em águas residuais industriais. O cianeto e o cromo hexavalente foram medidos nas faixas dinâmicas lineares de 0,6-961,5 e 0,9-118,5 × 10⁻⁶ mol L⁻¹,

respectivamente. O limite de detecção e o limite de quantificação do cianeto foram 0,18 e $0,61 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e estes valores para o cromo (VI) foram 0,26 e $0,86 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

LU [20] apresentou um método para análise de cianeto em águas residuais de revestimento por cromatografia iônica com detecção eletroquímica. Os resultados mostraram que o limite de detecção foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, teve uma boa relação linear na concentração de 1-40 mg L^{-1} e a taxa de recuperação de CN^- foi entre 95% e 110%. Este método apresentou boa estabilidade e um desvio padrão relativo de 5,71%. LI, SUZUKI e FUJISAWA [21] também determinaram cianeto em águas residuais por cromatografia iônica com detecção eletroquímica. Os agentes redutores para cianeto não causaram interferência.

LONG et al [22] desenvolveram um método para determinação de cianeto em água por cromatografia iônica com detecção amperométrica. O eluente utilizado foi NaOH 0,1 mol L^{-1} e acetona a 10% (v/v). O intervalo linear do método foi 0,05–100 $\mu\text{g L}^{-1}$, o coeficiente de correlação de 0,999 e o desvio padrão relativo foi menor que 10%. As taxas de recuperação foram entre 97,0% e 102,1% e o limite de detecção de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método foi rápido, preciso e seguro, e pode ser usado para a detecção de traços de cianeto em água.

Outros métodos, como por exemplo, métodos quimioluminescentes/fluorescentes, absorção atômica e piezoelétricos são desenvolvidos em menores quantidades. HAN, WANG, e JIA [23] propuseram um método de quimioluminiscência por injeção de fluxo para a determinação de cianeto com base no sinal óptico obtido por Cu^{2+} , um quantum dot de CdTe e um sistema de peróxido de hidrogênio com glutathione. O limite de detecção para CN^- foi de 6,0 ng mL^{-1} . Este método foi aplicado para detectar CN^- em águas do rio e águas residuais industriais com resultados satisfatórios.

GAVRILOV et al [24] determinaram também íons cianeto por quimioluminiscência. Solução alcalina de luminol apresenta quimioluminiscência na presença de íons p-nitrobenzaldeído, hemina e cianeto, em atmosfera de oxigênio. O procedimento foi desenvolvido com um limite de detecção de $(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-7} \text{ mg mL}^{-1}$.

MIRMOHSENI e ALIPOUR [25] construíram um sensor para determinação de cianeto em efluentes industriais baseado em micro balança de cristal de quartzo. Para isso, uma fina camada de níquel revestiu a parte superior dos cristais de quartzo. O níquel reagiu com íons cianeto na presença de oxigênio após imersão em solução de cianeto causando uma diminuição na massa dos cristais que é responsável pela mudança de frequência. Os resultados mostraram que o deslocamento de frequência correspondente foi linearmente

relacionado a concentração de íons cianetos em solução. Utilizando este método, os íons cianetos podem ser medidos na faixa de 0–10 ppm. Não houve interferência de outros íons e cátions no desempenho do sensor. O limite de detecção foi de 0,28 ppm.

NOROOZIFAR, KHORASANI e HOSSEINI[26], desenvolveram um novo e simples procedimento de injeção de fluxo para determinação indireta de cianeto por espectrometria de absorção atômica de chama. No método, as soluções aquosas de cianeto foram carregadas na coluna empacotada com carbonato de zinco (pérolas de sílica gel em suspensão a 25% m/m). O analito estava presente no eluente na forma de complexos de cianeto de zinco, que foram gerados em reação entre carbonato de zinco e cianeto. O limite de detecção correspondente foi de $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, o desvio padrão relativo foi de 1,41% e a taxa de amostragem foi de 65 h^{-1} . O método foi aplicado à determinação do cianeto nas águas residuais industriais.

Na literatura são encontrados muitos trabalhos para determinação de cianeto em amostras de água. Entretanto, metodologias baseadas em métodos eletroquímicos e principalmente utilizando sensores biomiméticos ainda são escassos.

GHANAVALI, AZAD e MOUSAVI [27] desenvolveram um biossensor de inibição amperométrica para cianeto. A enzima peroxidase de raiz forte foi imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho usando quitosana e acrilamida. A medição foi conduzida com um potencial aplicado de -100 mV vs. Ag/AgCl em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, na presença de hidroquinona como mediador de elétrons. A faixa linear da metodologia foi de $1,64\text{--}13,13 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $0,43 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros cinéticos como a constante de Michaelis-Menten foram calculados com e sem inibidor. Verificou-se que a interferência de sulfeto na inibição da enzima, causou um erro de 51,96% na determinação de cianeto e o biossensor proposto avaliou amostras de efluentes.

NOROOZIFAR, KHORASANI-MOTLAGH e TAHERI [28] desenvolveram um método para determinação de cianeto em águas residuais utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de hexacianoferrato de prata imobilizadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas. O eletrodo foi usado para quantificar cianeto, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada em solução tampão borato, em pH 8,0. A faixa linear encontrada foi de $40,0 \text{ a } 150,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção foi de $8,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Este eletrodo modificado foi usado na presença de contaminantes comuns em níveis que se apresentam em águas residuais industriais, apresentando alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e estabilidade em longo prazo.

ABBASPOUR et al [29] propuseram um método eletroquímico para determinação de cianeto utilizando um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificada com tetra(3,4-piridil)porfirazinatocobalto (II). O método possui um intervalo linear entre $1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com uma inclinação Nernstiana de $60 \pm 1,5$ mV / década e o limite de detecção de $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O tempo de resposta do eletrodo é de 5 minutos. O eletrodo proposto foi aplicado com sucesso e alguns aniões, como SCN⁻, I⁻, Cl⁻, Br⁻ e oxalato que geralmente são espécies interferentes graves para a maioria dos eletrodos seletivos de cianeto, não tiveram nenhum efeito interferente para este eletrodo proposto.

SAFAVI, MALEKI e SHAHBAAZI [30] desenvolveram um método voltamétrico indireto para determinação de íons cianeto e HCN. O método baseia-se na reação competitiva de formação do complexo de cobre entre a adenina na superfície do eletrodo e os íons CN⁻ na solução, ocorrendo a diminuição linear da corrente de pico de Cu-adenina na presença de cianeto. O limite de detecção foi $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ com tempo de acumulação de 60 s. O método foi aplicado em várias águas residuais industriais, como de indústrias de galvanização, e em amostras de ar para determinação de HCN.

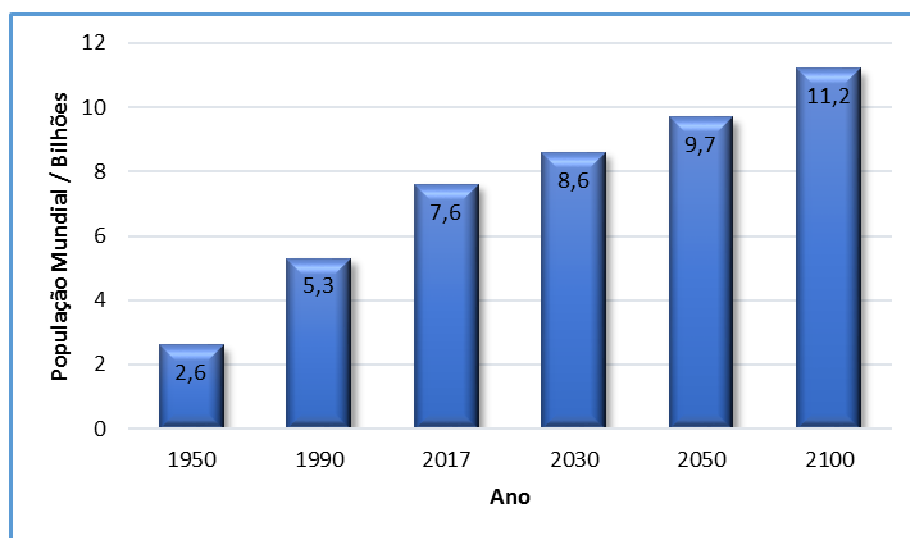
SHAMSIPUR, KARIMI e TABRIZI [31] propuseram um sensor eletroquímico para cianeto usando eletrodo cerâmico de carbono com nanopartículas de ouro. A eletrodeposição das nanopartículas no eletrodo cerâmico de carbono foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. A imagem da microscopia mostrou que o tamanho das nanopartículas de ouro foi em torno de 75 nm. Os métodos de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada foram utilizados para a determinação de CN⁻. Obtendo-se intervalo dinâmico linear de 0,5 a $14,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $0,09 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Estudos de interferência foram realizados com ânions típicos presentes em águas naturais e águas residuais. Com base no resultado obtido, o sensor proposto sofre interferência do íon tiocianeto (SCN⁻).

Diante do exposto, verifica-se que na literatura são descritos inúmeros métodos com diversas técnicas para a quantificação de cianeto em diferentes matrizes. Entretanto, o método proposto neste trabalho visa o desenvolvimento de metodologia nova, rápida e que usa baixas quantidades de solventes, gera pouca quantidade de resíduo e possibilita a construção de dispositivos que realizem as análises *in situ* e/ou em menor tempo.

1.3. Agrotóxicos

A população mundial está crescendo de forma contínua desde 1950 e de acordo com a projeção das Organização das Nações Unidas – ONU, o aumento populacional mundial continuará ocorrendo (**Figura 4**), podendo chegar a 11,2 bilhões de habitantes em 2100. [32,33]. Para suprir a demanda mundial por alimentos, há necessidade do desenvolvimento de sistemas agrícolas mais eficientes em toda a cadeia produtiva, neste sentido, umas das formas de aumentar a produção é por meio do uso dos agrotóxicos para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita, tornando-se uma ferramenta essencial para garantir o crescimento e a qualidade da produção agrícola [34-37].

Figura 5. Crescimento populacional mundial e projeções.



Fonte: Elaborado pelo autor com base nos dados da Organização das Nações Unidas

O agrotóxico orgânico surgiu em 1874 com as primeiras sínteses das moléculas de Diclorodifeniltricloroetano (DDT) realizadas por Othmar Zeidler, (estudante de doutorado do professor Adolf Bayer), mas em 1940, o entomologista suíço Paul Müller, descobriu as propriedades inseticidas do DDT, devido ao uso no combate à malária, sessenta e seis anos após a primeira síntese [38]. O DDT teve o seu uso intensificado durante a Segunda Guerra Mundial para a prevenção de epidemias de tifo, transmitidas por piolhos, que causavam a morte das pessoas atingidas. Além do uso desse inseticida para o controle do mosquito transmissor da malária em todo o globo terrestre, no Brasil foi usado para combater o bicho barbeiro, transmissor da doença de Chagas [39].

Devido a eficiência do DDT no combate as pragas, novos compostos organossintéticos foram produzidos nos anos de 1940 e 1950 na América do Norte e Europa Ocidental, favorecendo o crescimento da indústria de agroquímicos[40].

O Brasil, na década de 40, seguiu a tendência mundial no uso de agrotóxicos, que teve um crescimento exponencial no final da década de 60 com a isenção de impostos e de taxas de importação de produtos agrícolas [41]. Além da eficiência no combate as pragas, ocorreu um crescimento no consumo de agrotóxicos devido ao desenvolvimento de novas tecnologias e ao aumento do poder econômico dos agricultores, que foi incentivado por planos de financiamento do governo federal no final na década de 70 [42].

O Governo Federal foi o principal incentivador da expansão da agricultura brasileira, ao condicionar o crédito rural à compra do agrotóxico, com isso, o mercado brasileiro passou a ser um dos mais importantes para a indústria dos agrotóxicos [43]. O Brasil é o maior consumidor desse tipo de produto no mundo, além de ser um país agrícola, os agrotóxicos são considerados extremamente relevantes no modelo de agricultura aplicado atualmente e historicamente no país.[44].

Sabendo da importância do agrotóxico para o modelo de agricultura aplicado no Brasil, a Lei Federal 7.802, em seu Artigo 2, Inciso I define agrotóxicos e afins como sendo:

os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento [44].

Neste trabalho será utilizado o termo agrotóxico, que é o termo que consta na legislação brasileira, mas que até a Constituição de 1988 tratava esse tipo de produto químico como defensivo agrícola. Na literatura internacional de língua inglesa, o termo utilizado para esse grupo de substâncias/produtos químicos é pesticida (*pesticide*) ou “agroquímico” (*agrochemicals*) e na literatura espanhola é utilizado o termo “praguicida” (*plaguicidas*) [45].

Os agrotóxicos podem ser categorizados quanto à natureza da praga combatida e ao grupo químico a que pertencem, como apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida e ao agrupamento químico [46, 47].

Classificação quanto à natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos*
Inseticidas (controle de insetos)	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio
	Extratos vegetais	Óleos vegetais
	Organoclorados	Aldrin**, Dieldrin**, Diclorodifeniltricloroetano (DDT)**, Hexaclorobenzeno (HCB) **
	Organofosforados	Fenitrothion, Parathion, Malathion, Metilparathion
	Carbamatos	Carbofuran, Aldicarb, Carbaril
	Piretróides sintéticos microbianos	Deltamethrina, Permethrina, <i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungicidas (controle de fungos)	Inorgânicos	Cálcio Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril
	Organomercuriais Antibióticos Trifenil estânico Compostos Formilamina	Acetato de fenilmercúrio Estreptomicina, Ciclo-hexamida Duter, Brestam Triforina, Cloraníformetam
	Fentalamidas	Captan, Captam
	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
Herbicidas (controle de plantas invasoras)	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, Dinitro-ortho-cresol (DNOC).
	Fenoxiacéticos	Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T)
	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
	Glifosato	Round-up
	Uréia	Diuron
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
Desfoliantes (combate às folhas indesejadas)	Dinitrofenóis	Dinoseb, Dinitro-ortho-cresol
Fulgigantes (combate às bactérias do solo)	Hidrocarbonetos halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
	Geradores de Metilisocianato	Dazomet, Metam
	-	Formaldeído
Rodenticidas/Raticidas (combate aos roedores/ratos)	Hidroxycumarinas	Cumatetralil, Difénacum
	Indationas	Fenil-metil-pirozolona, pindona
Moluscocidas (combate aos moluscos)	Inorgânicos (aquáticos)	Sulfato de cobre
	Carbamatos (terrestres)	Aminocarb, Metiocarb, Mexacarbato
Nematicidas (combate aos nematódeos)	Hidrocarbonetos halogenados	Dicloropropeno, e Dicloropropeno + dicloropropano (DD)
	Organofosforados	Diclofention, Fensulfotion
Acaricidas (combate aos ácaros)	Organoclorados	Dicofol, Tetradifon
	Dinitrofenóis	Dinocap, Quinometionato

* Incluem nomes comerciais

**Proibidos em vários países e no Brasil.

Os agrotóxicos segundo a portaria normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996, podem ser classificados quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseando-se nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. Dividindo-os em quatro classes, como mostrado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos quanto ao potencial de periculosidade [45, 47].

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

*DL 50: (Dose Letal 50%) ou dose letal média de uma substância expressa o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas. Correspondem às doses que provavelmente matam 50% dos animais de um lote utilizados para experiência [45].

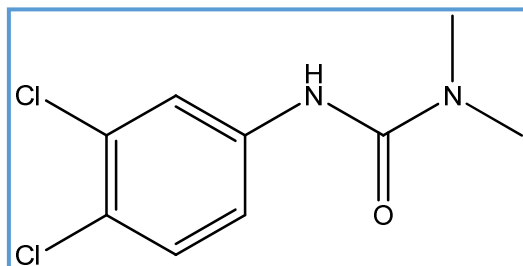
Como apresentado, existem uma variedade de agrotóxicos com diferentes grupamentos químicos, toxicidade e que podem ser aplicados no controle de diversas pragas nas variadas culturas agrícolas existentes, entretanto, o presente estudo abordou o herbicida 3,4-dicloroanilina, um metabólito do herbicida Diuron, que pode ser aplicado em diversas culturas como cana-de-açúcar e laranja.

1.3.1. 3,4-dicloroanilina

O Diuron (**Figura 5**), conhecido como DCMU (3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-Dimetilureia), é um herbicida que possui o grupamento ureia em sua estrutura e o nome químico 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia. Esse agrotóxico possui classificação toxicológica III e é amplamente utilizado para fins agrícolas em pré- e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, frutas cítricas,

seringueira e uva. O DCMU pode ser aplicado para fins não agrícolas como: aplicação em ferrovias, rodovias, pistas de aeroportos, oleodutos, subestações elétricas e pátios industriais, e é comercializado como Cention, Direx, Diurex, Diuron, Diuron Fersol, Diuron Milenia, Diuron Nortox, Diuron Agritec, Diuron Volagro, Diuron Volcano, Grasp, Herburon, Karmex e Netun [48-51].

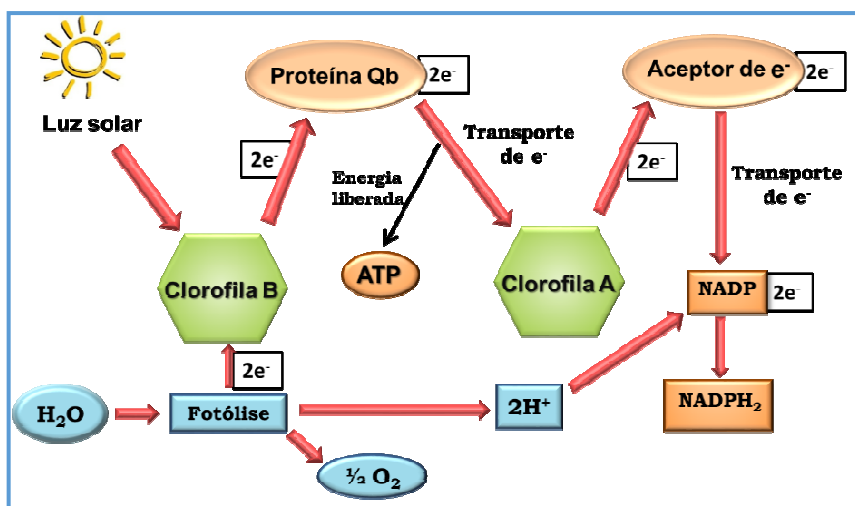
Figura 6. Fórmula estrutural do herbicida Diuron.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O DCMU é classificado como inibidor de elétrons do fotossistema II, inibindo assim a produção de energia para a realização da fotossíntese (**Figura 6**), além de causar um acúmulo de elétrons no ponto de inibição (proteína Qb), que por sua vez promove uma peroxidação dos lipídeos [50, 51]. A inibição da fotossíntese ocorre com a ligação do herbicida na proteína Qb, causando um bloqueio no transporte de elétrons da Clorofila B para Clorofila A. Isto interrompe a fixação de CO₂ e a produção de ATP E NADPH₂, os quais são essências para o crescimento das plantas[51].

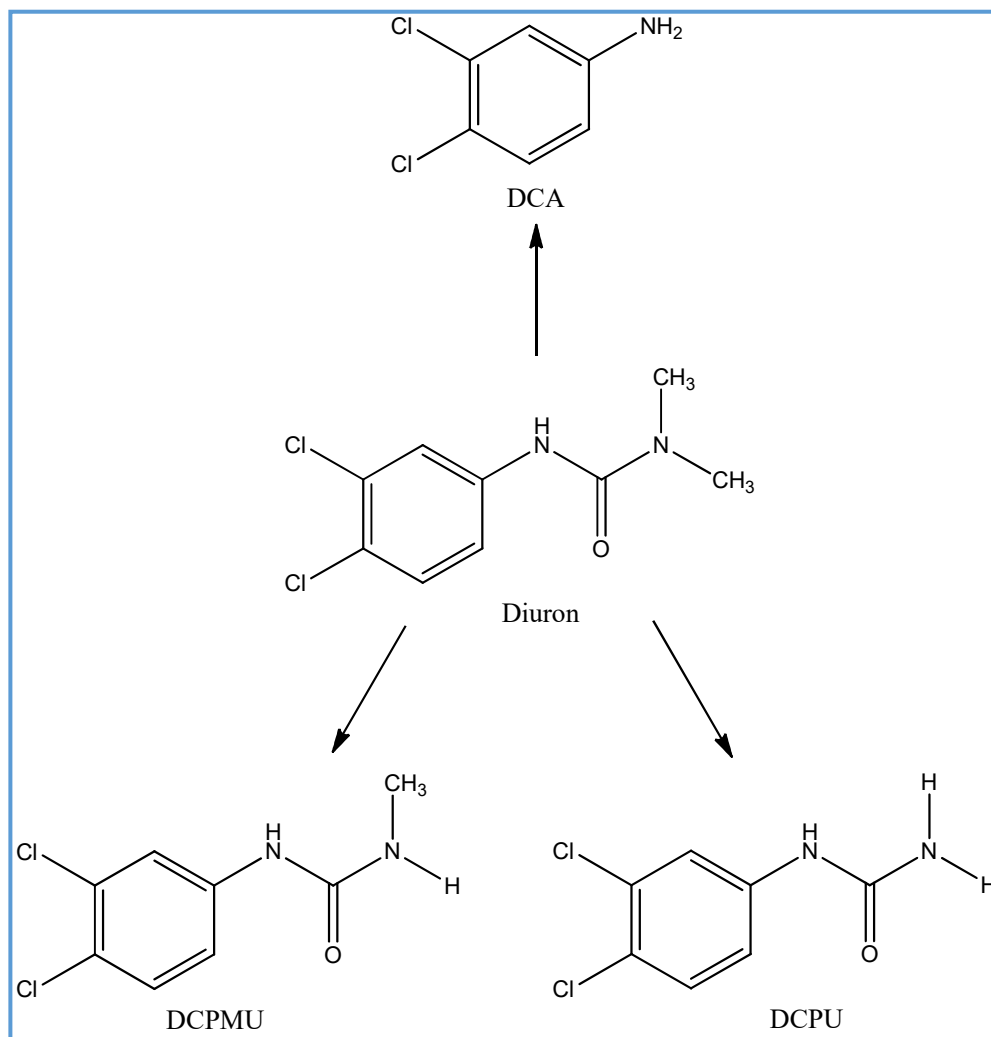
Figura 7. Esquema do transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No ambiente o diuron pode sofrer uma degradação microbiana muito lenta, obedecendo uma cinética de primeira ordem e pode ser degradado por *N*-desmetilação em condições aeróbicas e gerar os metabólitos (**Figura 7**) 3,4-diclorofenil-metil-uréia (DCPMU), 3,4-diclorofenil-uréia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) [4,52,53].

Figura 8. Estrutura do Diuron e de seus principais metabólitos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns estudos identificaram o 3,4-DCA como possível alterador do sistema endócrino, interferindo na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no organismo [4,48,54,55]. Além das alterações citadas, 3,4-DCA pode condensar-se e formar o composto 3,3', 4,4'-tetracloroazobenzeno, produto mutagênico, potencialmente cancerígeno. O metabólito 3,4-DCA possui uma solubilidade em água elevada, quando comparado com o Diuron, sendo 92 e 42 mg L⁻¹ respectivamente, proporcionando um maior risco ambiental [50, 51].

Dessa forma, buscar soluções para minimizar o impacto ambiental do 3,4-DCA é de extrema importância e para a determinação das concentrações de Diuron e de seu metabólito 3,4-DCA vários métodos analíticos têm sido utilizados.

1.3.2. Métodos de Determinação do 3,4-dicloroanilina

O levantamento bibliográfico foi realizado nas principais fontes de consultas eletrônicas (*Scifinder Scholar* e *Web of Science*) utilizando as palavras chaves: “*determination of 3,4-dicloroaniline*” e “*determination of diuron and its metabolites*” foram encontradas poucas e antigas publicações sobre métodos analíticos para a determinação de apenas 3,4-dicloroanilina, entretanto há um pouco mais de trabalhos existentes que abordam a determinação simultânea de diuron e seus metabólitos.

De um modo geral, os métodos que se destinam à detecção e/ou quantificação de diuron e seus metabólitos são métodos cromatográficos e são aplicados em diversas matrizes, tais como: urina, amostras de águas (superficiais, subterrâneas e mar), solo e sedimento marinho.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada para determinação desses compostos, principalmente quando associada à absorção por ultravioleta (UV), detecção por arranjo de diodos (DAD) e amperometria, e à espectrometria de massas (EM) como técnica confirmatória. Isso devido à sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo sua ampla aplicabilidade[56].

MARUYAMA et al [57] propõem a determinação de traços de 3,4-dicloroanilina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica. Para isso, usou-se um cartucho C18 como fase estacionária e metanol-água (70:30 v/v) contendo 0,05 mol L⁻¹ de acetato de amônio como eluente (ou fase móvel). O potencial do eletrodo de trabalho (carbono vítreo) foi ajustado em + 960 mV vs. Ag/AgCl. O intervalo dinâmico linear entre a corrente e a concentração do analito foi de aproximadamente 1 x 10² (0,2 – 20 ng) e a quantidade mínima detectável foi de 0,2 ng. Este método foi aplicado satisfatoriamente na determinação de vestígios de linuron e 3,4-dicloroanilina livre em batatas.

MELLO, LOBO E YABE [58] otimizaram um método de extração ultra-sônica e análise por CLAE com detecção por arranjo de diodos para determinação de Diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de cana-de-açúcar. Realizou-se a extração com metanol em

banho ultra-sônico e a condição de análise otimizada para separação dos analitos foi a fase móvel sendo metanol:água 50:50 (v/v), fluxo 1 mL min⁻¹ e dois comprimentos de onda de 240 e 254 nm. Utilizou-se coluna e pré coluna Waters (XTerra RP18, 5 µm, 4,6 x 150 mm e 3,9 x 20 mm). A curva de calibração foi obtida a partir da fortificação do solo com a mistura dos padrões, na faixa de 5 a 200 mg Kg⁻¹ de solo. O limite de quantificação foi de 1,25 mg Kg⁻¹ de solo. A recuperação obtida em dois níveis de concentração 5 e 200 mg Kg⁻¹ de solo ficou entre 85 e 99%.

MULLER, FATTORE e BENFENATI [59] desenvolveram um método para determinação de aminas aromáticas por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em amostras de água. A microextração em fase sólida (SPME) em cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM) foi introduzida como um método quantitativo rápido e sensível para a detecção de alguns derivados de anilina (o-toluidina, p-cloroanilina, 2,4-dicloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina) em amostras ambientais de água. Muitos parâmetros para otimização do método extrativo, como linearidade, sensibilidade, tempo de equilíbrio, precisão e diferentes condições operacionais (pH, sal) foram avaliados. A linearidade foi excelente na faixa de concentração 0,05 – 5 µg L⁻¹ e o método mostrou boa reprodutibilidade (coeficiente de variação de cerca de 5%). Os limites de detecção diferem substancialmente para os vários compostos analisados. A adição de sal (cloreto de sódio) a pH 7,6 melhorou significativamente a quantidade de analitos extraídos pela fibra. Para avaliar sua aplicabilidade em uma matriz aquosa real, foram analisadas várias amostras de águas subterrâneas coletadas em uma área industrialmente poluída ao norte de Milão, Itália.

WITTKE et al [60] apresentaram métodos para a determinação de 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina em urina. As amostras foram tratadas por hidrólise básica para degradar todos os pesticidas. A extração simultânea foi por destilação a vapor seguido de extração líquido-líquido para produzir, concentrar e purificar as porções de dicloroanilina. A cromatografia gasosa acoplada a detector de massas em tandem (CG-EM-EM) e a cromatografia gasosa (CG) com detector de captura de elétrons (DCE) após a derivação com anidrido heptafluorobutírico (HFBA) foram empregadas para separação, detecção e identificação. O limite de detecção dos métodos CG-EM-EM e CG-DCE foram de 0,03 e 0,05 µg L⁻¹, respectivamente. As recuperações absolutas obtidas a partir de uma amostra de urina com padrão interno, 3,5-DCA e 3,4-DCA, variaram entre 93 e 103% com o coeficiente de variação de 9 a 18%. As três técnicas de detecção foram comparadas quanto ao desempenho,

custo e adequação para a sua aplicação em estudos de monitoramento em humano. O procedimento descrito foi aplicado com sucesso para a determinação de 3,4-DCA e 3,5-DCA na urina de voluntários.

HORI et al [61] determinaram simultaneamente propanil, carbaril e 3,4-dicloroanilina em soro humano por CLAE com detector UV após extração em fase sólida. Quando os três compostos foram adicionados ao soro em concentrações variando entre 0,1 – 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as taxas de recuperação foram satisfatórias entre 91,1% e 101,9%. Na análise do soro de paciente que ingeriu a Emulsão Kusanon A, a substância ingerida, aparentemente, causou um aumento na concentração de DCA, o que levou ao aparecimento de metahemoglobinemia, dessa forma, propuseram a possibilidade de a concentração de DCA ser utilizada para fins prognósticos.

WEISS e ANGERER [62] desenvolveram um método que permite a determinação quantitativa simultânea de várias aminas aromáticas: anilina, toluidinas, 4-isopropilanilina, o-anisidina, 3-cloroanilina, 4-cloroanilina, 4-bromoanilina, amino-nitrotoluenos, aminodinitrotoluenos, 3,5-dicloroanilina, 3,4-dicloroanilina, alfa- e beta-naftilamina e 4-aminodifenilo em urina humana. Após a separação da matriz urinária por uma simples extração líquido-líquido com hexano a pH 6,2–6,4, os analitos sofrem derivatização com anidrido pentafluoropropiônico. A análise da separação quantitativa é realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. As taxas de recuperação relativa estiveram na faixa de 70 a 121%.

GATIDOU et al [63] determinaram diuron e seus metabólitos em água do mar por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A otimização do procedimento de extração incluiu o tipo de sorvente e o tipo de solvente orgânico para a eluição. A otimização da separação da cromatografia líquida (CL) também foi realizada e a robustez da separação desenvolvida foi testada. O procedimento otimizado incluiu extração *off-line* desses compostos de amostras de água do mar usando cartuchos de extração de fase sólida C_{18} (SPE). A precisão inter-dia do procedimento desenvolvido foi inferior a 14% para todos os compostos testados. Foram obtidas recuperações satisfatórias (superior a 82,0%) para todas as substâncias, exceto DCA, para as quais foi obtida baixa recuperação (30,5%).

PENG et al [64] utilizaram líquido iônico como um solvente de extração vantajoso para microextração de anilinas cloradas para posterior injeção no CLAE. Os parâmetros foram otimizados e alta seletividade e baixos limites de detecção das anilinas cloradas foram obtidos, pois, a extração foi realizada em alta temperatura. O procedimento proposto foi

aplicado para a análise de amostras reais, incluindo amostras de água da torneira, água do rio e águas residuais de uma planta petroquímica, e apenas 3,4-dicloroanilina foi detectada nas águas residuais em nível de $88,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

YOUNG et al [65] propuseram um método para determinar traços de cloroanilinas em amostras de águas ambientais usando microextração de fase líquida baseada em fibra oca. Após a extração, os analitos: 2-cloroanilina, 3-cloroanilina, 2,3-dicloroanilina, 2,4-dicloroanilina, 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina foram determinados usando a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. As condições experimentais que afetam a eficiência da extração foram investigadas e otimizadas. O método proposto mostrou um amplo intervalo linear até $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$. A viabilidade do método foi avaliada utilizando a análise de amostras de água do rio coletadas do rio Hudson e *East River*, na cidade de Nova York.

MARAGOU, THOMAIDIS e KOUPPARIS [66] desenvolveram uma estratégia de otimização sistemática e detalhada para o desenvolvimento de métodos de CL-EM/EM de ionização por pressão atmosférica (API) para a determinação de Irgarol 1051, diuron e seus produtos de degradação em água do mar, sedimentos marinhos e mexilhões, que foram obtidos nas marinas em Attiki, na Grécia. Foi dada especial atenção à ionização do dicloroanilina, que apresenta dificuldade particular nas técnicas API. A ionização satisfatória foi alcançada apenas com o modo íon positivo da ionização eletrospray (ESI) usando acetonitrila na fase móvel. O limite de detecção instrumental é de $0,11 \text{ ng mL}^{-1}$. A supressão do sinal foi qualitativamente estimada pelo uso de amostras purificadas e não purificadas. A preparação de amostras para sedimentos e mexilhões é direta e simples, compreendendo apenas extração de solvente. As recuperações médias variaram de 71% a 110%, e as correspondentes (%) RSDs variaram entre 4,1 e 14%. Os limites de detecção do método variaram entre $0,6$ e $3,5 \text{ ng g}^{-1}$ para sedimentos e mexilhões e de $1,3$ a $1,8 \text{ ng L}^{-1}$ para água do mar.

FELICIO et al [67] validaram um método para quantificação de diuron e seus principais metabólitos por cromatografia líquida de alta performance com detecção na região do ultravioleta. A separação foi obtida em menos de 11 minutos usando uma coluna C-18, fase móvel composta de acetonitrila e água (45: 55 v/ v) a $0,86 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção a 254 nm. O método utilizou extração sólido-líquido seguido por eluição cromatográfica isocrática mostrou-se específico, preciso e linear ($R^2 > 0,99$), apresentando mais de 90% de recuperação.

O método foi aplicado com sucesso para quantificar diuron e seus subprodutos em amostras de solo coletadas em uma área de cultivo de cana-de-açúcar, com foco no controle ambiental.

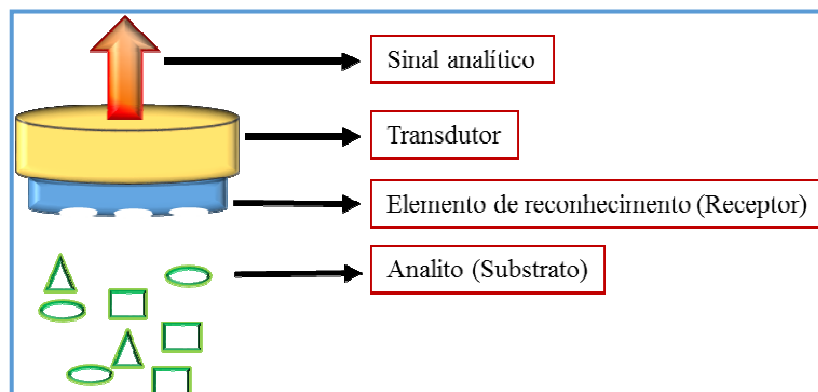
Diante do apresentado, verifica-se que na literatura são descritos quase que na totalidade, métodos cromatográficos com diferentes detecções para a quantificação do diuron e do seu metabólito 3,4-dicloroanilina em diferentes matrizes. Entretanto, não há metodologias baseadas em métodos eletroquímicos e principalmente utilizando sensores biomiméticos. Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de metodologia inédita, rápida, com possibilidade de construção de dispositivos portáteis para análises *in situ* e ambientalmente amigável.

1.4. Sensores Químicos

A utilização de sensores químicos para determinação de concentrações de substâncias e de outros parâmetros de interesse tem sido bastante referida na literatura científica. A atual definição de sensor químico foi elaborada em 1991 pela divisão de Química Analítica da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), sendo assim, sensor químico é um dispositivo que transforma informações químicas, que vão desde a concentração de analitos específicos até a composição de amostras, em um sinal analiticamente útil. As informações químicas mencionadas podem ser originárias de fenômenos químicos ou bioquímicos que envolvam a espécie de interesse [68].

Como pode ser observado na **Figura 8**, os sensores químicos são compostos por duas partes básicas, o receptor e o transdutor. Na parte receptora do sensor acontece a interação com o analito, nessa interação ocorre um evento químico que é transformado em uma forma de energia que pode ser medida pelo transdutor, sendo esse capaz de transformar a energia em um sinal analítico. O sensor químico pode ser classificado conforme o princípio de transdução, os principais são: eletroquímicos, elétricos, ópticos, magnéticos, termométricos e sensíveis à massa [68].

Figura 9. Ilustração de um sensor eletroquímico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, muitos métodos analíticos utilizam uma instrumentação complexa com a necessidade de pessoas especializadas para a sua operação, entretanto os sensores químicos são dispositivos portáteis, robustos e que dispensam a utilização de aparelhos complexos, infraestrutura e a necessidade de pessoas altamente especializadas [69]

1.4.1. Sensores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos compõem uma subclasse dos sensores químicos, que utiliza um eletrodo para a realização da transdução e a conversão do evento químico em um sinal analítico, sendo que o registro dos sinais podem ser potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, condutométricos ou impedimétricos [70-72]. Eles se baseiam em reações de oxidação e redução, transformando o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos [68]. Estes dispositivos têm sido amplamente explorados por apresentarem características interessantes como: resposta rápida, possibilidade de portabilidade, operação contínua, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade elevadas[71].

Com o desenvolvimento dos métodos eletroquímicos, foi encontrada uma vasta quantidade de aplicações, desde monitoramento ambiental e industrial, incluindo também o controle de qualidade e análises biológicas [70]. Existem diversas técnicas com detecção eletroquímica, entretanto, as mais utilizadas para desenvolvimento de uma metodologia analítica são a voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, amperometria e voltametria

de pulso diferencial, sendo a voltametria cíclica também utilizada para a obtenção de informações qualitativas da reação na superfície do eletrodo.

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. A voltametria cíclica é a técnica comumente utilizada para obter informações sobre as espécies químicas de interesse e dos mecanismos envolvidos, oferecendo informações qualitativas ou quantitativas. A eficiência desta técnica resulta de sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos [73, 74].

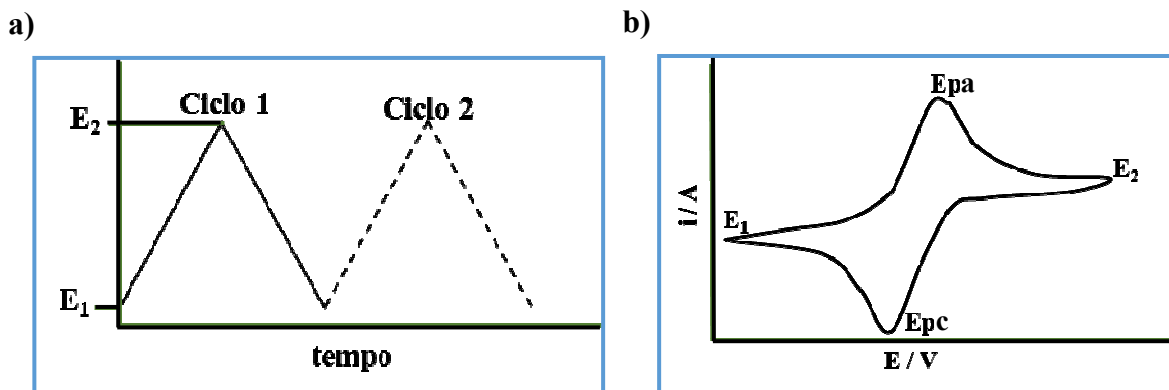
Frequentemente utiliza-se a voltametria cíclica no início do estudo eletroquímico, pois a técnica possibilita a caracterização e reconhecimento do sistema, oferecendo de maneira simples a localização do potencial redox da espécie eletroativa, assim como permite uma avaliação conveniente do efeito do meio eletrolítico no processo redox. Com as informações obtidas na voltametria, pode-se prever um possível mecanismo da reação na superfície do eletrodo, dado importante para o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico [74].

A voltametria cíclica consiste na varredura de potencial em um eletrodo de trabalho utilizando uma onda de forma triangular. Para isto, inicia-se a aplicação do potencial (E_1) de um valor no qual nenhuma oxidação ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódica) ocorre a oxidação do composto na interface eletrodo/solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação (E_2) ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação. O voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos. Os parâmetros eletroquímicos mais importantes, são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}), e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido [74, 75].

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na **Figura 9**, onde o potencial (E) é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação varia-se o potencial de forma linear alternando entre crescente e decrescente frente à referência (**Figura 9a**). Dependendo da informação desejada, simples ou

múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada como função do potencial aplicado (**Figura 9b**).

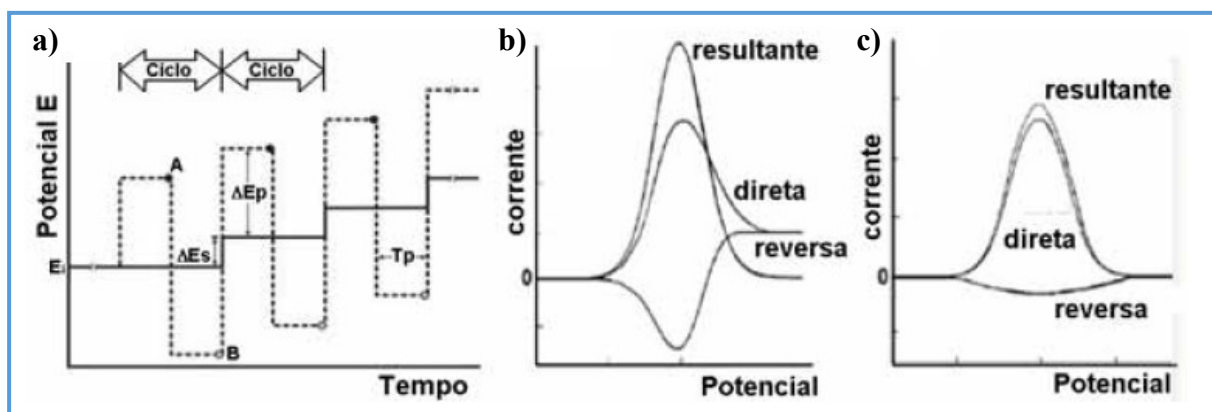
Figura 10. Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) voltamograma obtido para um sistema reversível.



Fonte: Elaborado pelo autor baseado na referência SKOOG, D. A. Princípios de análise instrumental. 8. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 1124 p. [75].

A voltametria de onda quadrada (VOQ), do inglês “*Square Wave Voltammetry*”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas [76]. Do ponto de vista prático, a maior vantagem da VOQ é a possibilidade de executar experimentos em alta velocidade de varredura com correntes de pico bem definidas, melhorando assim a sensibilidade da técnica. Além disto, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente com componente faradáica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente com componente capacitiva seja minimizada [74,76]. Na VOQ a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, em que pulsos de potencial (ΔE_s) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_p) e duração $2t_p$ (período) (**Figura 10a**). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto (A-anódico) e reverso (B-catódico), originando um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado (**Figura 10b e 10c**) [75 – 77].

Figura 11. a) Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox: b) sistema reversível e c) sistema irreversível.



Fonte: SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 8. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 1124 p.

A voltametria de onda quadrada apresenta algumas vantagens em comparação às outras técnicas de pulso, sendo essas: redução no ruído de fundo em varreduras repetitivas; registro de correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, com excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a faradáica, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica, baixo consumo de espécies eletroativas e redução nos problemas de passivação dos eletrodos; em muitos casos, a interferência do O_2 dissolvido é pouco significativa em medidas com VOQ.

Como apresentado, 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 serem 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.

1.4.2. Sensores Biomiméticos

O monitoramento rápido e *in situ* de amostras ambientais pode ocorrer com a utilização de dispositivos capazes de identificar de forma sensível e seletiva poluentes ambientais. Esses dispositivos podem ser sensores eletroquímicos, dentre os quais destacam-se os sensores biomiméticos, que podem ser definidos como um subtipo de “biossensores enzimáticos”

Os biossensores enzimáticos são produzidos com a imobilização da enzima em um eletrodo, porém fatores que aumentam a distância entre o centro redox da enzima e o eletrodo diminuem sua eficiência. Um dos fatores que diminuem a eficiência da enzima, é a densa camada proteica ao redor do sítio ativo da enzima, que dificulta a transferência eletrônica. A redução ou eliminação da camada proteica responsável pela estrutura tridimensional da enzima, pode ser realizada por meio da modificação das biomoléculas ou empregando-se complexos metálicos que imitem a estrutura do centro redox da enzima de interesse, surgindo os sensores biomiméticos [78, 79].

Os sensores biomiméticos, podem ser definidos como dispositivos que incorporam um elemento de reconhecimento seletivo intimamente conectado a um transdutor, sendo que este elemento de reconhecimento imita, em algum aspecto, determinado sistema biológico utilizando um sistema químico mais simples. Os elementos mais amplamente usados tem sido:

- Complexos metálicos [80, 81], que imitam sítios ativos enzimáticos;
- Polímeros impressos [82, 83] que imitam receptores naturais, como os anticorpos;
- Ciclodextrinas modificadas [79], que imitam sítios de ligação enzimáticos;
- Monocamadas moleculares [84], que imitam membranas celulares, entre outros.

Os sensores biomiméticos são uma estratégia experimental que tem sido usada para a obtenção de sensores mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais. Estes dispositivos visam vencer as limitações dos biossensores enzimáticos tais como temperatura, pH, disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas; assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox) / substrato [85-89].

As enzimas citocromo P450 são adequadas para serem mimetizadas e assim a construção de sensores biomiméticos, pois a química da catálise da reação enzimática e a estrutura do sítio ativo das enzimas P450 são bem conhecidas. Na atualidade são conhecidas aproximadamente 450 diferentes enzimas P450, que catalisam diversos tipos de reações químicas nos organismos, produzindo na maioria das vezes metabólitos que são fisiologicamente essenciais ou benéficos aos organismos vivos [90]. Pode-se incluir nessas reações: a metabolização de fármacos, a degradação de disruptores endócrinos e de xenobióticos como os agrotóxicos e o íon cianeto [8, 9, 91–93].

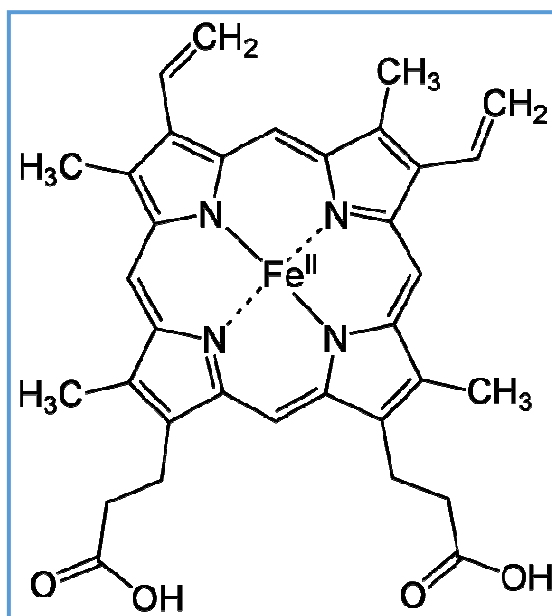
Na **Tabela 4**, são indicados alguns agrotóxicos que são metabolizados pelas P450 [93].

Tabela 4. Exemplos de agrotóxicos metabolizados pelas enzimas citocromo P450.

Agrotóxico	Enzima
Atrazina	CYP1A1; CYP1A2; CYP2B6; CYP2E1; CYP2C8; CYP2C9; CYP2C19; CYP3A4; CYP3A7
Carbofurano	CYP3A4
Clorpirifós	CYP1A2; CYP2A6; CYP2B6; CYP2C9; CYP2C19; CYP2D6; CYP3A4; CYP3A5
Diuron	CYP1A1; CYP1A2; CYP2C19; CYP3A4

As enzimas P450 possuem em comum o sítio ativo protoporfirina de ferro IX (**Figura 11**), que é o grupo prostético encontrado em todas as enzimas citocromo P450. O papel deste grupo hemino nos diferentes citocromos P450, varia em função da natureza dos ligantes próximos ao grupo prostético e do substrato que será catalisado [81].

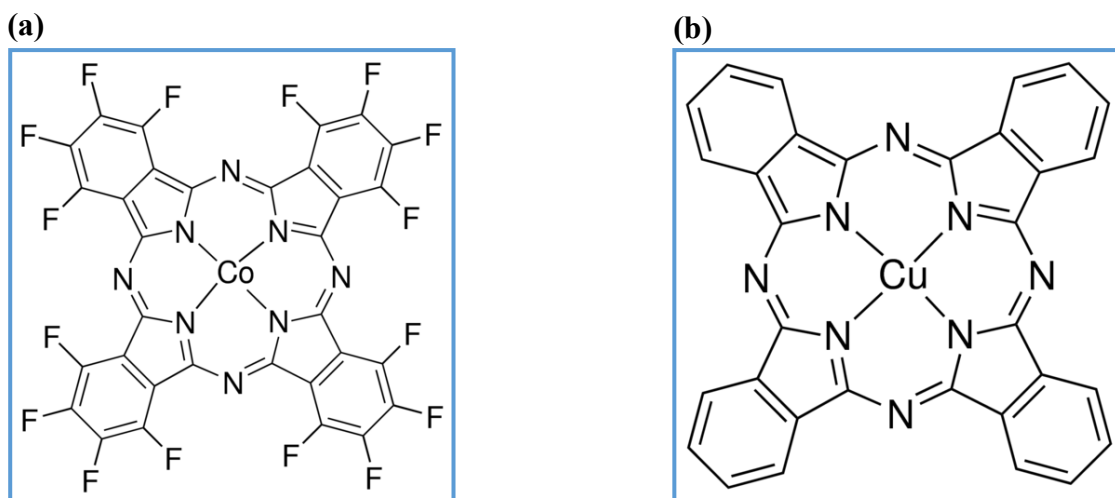
Figura 12. Estrutura da protoporfirina de ferro IX presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.



Compostos derivados das ftalocianinas e porfirinas de ferro, manganês, níquel, cobalto e cobre têm sido satisfatoriamente empregados em meio aquoso na tentativa de mimetizar o

sítio ativo das P450, dentre os complexos que podem ser avaliados como possíveis catalisadores biomiméticos da P450, devido à semelhança com a estrutura química da protoporfirina IX, tem-se a 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-ftalocianinacobalto (II), mostrada na **Figura 12(a)** e ftalocianina de cobre (II), mostrada na **Figura 12(b)**.

Figura 13. Estrutura química dos complexos: a) 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-ftalocianinacobalto (II) e b) ftalocianinacobre (II).



Nesse contexto, a utilização destas moléculas no desenvolvimento de sensores apresenta-se com um grande campo de pesquisa a ser explorado, porque estes complexos podem facilitar a transferência eletrônica entre o substrato e a superfície do eletrodo, sem a presença de uma camada protéica, como nas enzimas, o que geraria um aumento capacitivo na resposta do sensor. Além disso, devido aos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, têm conduzido a uma crescente busca por sensores, devido à necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações baixas.

Aliando as características destes materiais biomiméticos juntamente com as vantagens dos eletrodos preparados à base de pasta de carbono (EPC) podem-se desenvolver sensores que visam atender a demanda de análises de diversas áreas de interesse. Esses eletrodos oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente, facilidade de renovação da superfície e de fácil preparação. O método mais comum para a obtenção da pasta de carbono modificada é a oclusão, esse método de modificação baseia-se na mistura de grafite em pó, modificador e um aglutinante, que pode

ser parafina ou óleo mineral, tornando a pasta estável em contato com soluções aquosas. Adicionalmente o aglutinante, serve para fixar a pasta ao eletrodo e preencher as cavidades entre as partículas de grafite[94-96].

As principais vantagens da pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, etc., resultando em um sistema de medida que dispensa a necessidade de adição de reagentes em solução durante a análise [94,95], permitindo a renovação da superfície sem perda da eficiência do sensor, tornando ainda mais versátil seu uso.

Desta forma, unindo-se as vantagens que os sensores eletroquímicos apresentam com as características biomiméticas dos complexos de ftalocianinas e porfirinas, esta tese apresenta os esforços para o desenvolvimento de sensores biomiméticos para o íon cianeto e para o herbicida 3,4-dicloroanilina.

2. OBJETIVOS

Desenvolver métodos analíticos sensíveis, simples e rápidos para a análise do íon cianeto e do metabólito do diuron, a 3,4-dicloroanilina, utilizando sensores biomiméticos com detecção eletroquímica, visando aplicação em amostras de interesse ambiental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação Básica

Para a obtenção de água ultrapura, foi utilizado o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore®.

A medição dos volumes para o preparo das soluções e as adições nas análises eletroquímicas foram efetuadas com micropipetas Eppendorf® 10–100 µL, 100–1000 µL e 1000–5000 µL Boeco®. A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em uma balança analítica (Mettler-Toledo®) que possui calibração externa e tara automática, possibilitando pesagens rápidas e precisas.

Foi utilizado o pH-metro da Thermo Scientific® (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA) para a medição do pH das soluções tampão.

Nas análises cromatográficas foram efetuadas em um cromatógrafo Shimadzu® modelo 20A, com detector UV-Vis modelo SPD-20A, amostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A5.

3.2. Reagentes e Soluções

Os reagentes empregados foram de grau analítico. Para o desenvolvimento do sensor biomimético para a determinação do íon cianeto e do metabólito 3,4-dicloroanilina foram utilizados: Cianeto de potássio, 3,4-dicloroanilina e os complexos metálicos estudados: Protoporfirina IX; 5,10,15, 20 – Tetraquis (4 – metoxifenil) – 21 H, 23 H – porfirinacobalto(II); ftalocianinaferro(III) - clorada; 5, 9 ,14 ,28, 23, 27, 32, 36 – octabutoxi – 2,3 – naftalocianinaniquel(II); 5, 10, 15, 20 – Tetrafenil – 21H, 23H – porfirinaferro(III)-clorada; 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H – ftalocianinacobalto(II); 5,10,15,20 – Tetraquis (4-metoxifenil) 21H, 23H–porfirinaferro(III)-clorada; Hemina; ftalocianinacobre(II); bis(piridina)-ftalocianinaferro(II); 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H-ftalocianinacobre(II); ftalocianinacobalto(II); ftalocianinaniquel(II)-; grafite em pó; óleo mineral; foram adquiridos pela Sigma-Aldrich®. Para o preparo das soluções foram utilizados Ácido bórico; Ácido oxálico; Hidróxido de sódio e o Etanol, todos adquiridos pela Synth. Ácido acético adquirido pela QHEMIS; e o Ácido fosfórico adquirido pela Mallinckrodt.

Para a análise de interferentes do íon cianeto, foram utilizados Acetato de sódio; Borato de Sódio; Cloreto de Cálcio; Fosfato de potássio bibásico; Molibdato de amônio; Nitrato de Chumbo II, todos adquiridos pela Synth.

Para a análise de interferentes do metabólito 3,4-dicloroanilina, foram utilizados Diuron, Tebuthiuron, Atrazina, Metribuzin, Thiran, 2,4-D e Clorpirifós, todos adquiridos pela Sigma-Aldrich®.

3.3. Preparo das Soluções

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).

- ❖ Solução estoque de KCN: A solução estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do analito foi preparada pela dissolução de 65 mg em 100 mL de água deionizada.
- ❖ Solução de trabalho de KCN: A solução de trabalho $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada com uma alíquota 2,5 mL da solução estoque de KCN e diluída em um balão de 25,0 mL com água deionizada.

- ❖ Soluções tampão:

A solução tampão ácido fosfórico/fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5 foi preparada a partir da pesagem de 6,8 g de KH_2PO_4 , solubilizadas em água deionizada, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. O valor do pH foi ajustado pela adição de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) pH 3,0 a 11,0 foi preparada a partir da mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, em quantidades previamente calculadas e adequadas para as concentrações $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O valor do pH foi ajustado pela adição de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão ácido acético/ acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 foi preparada a partir de uma alíquota de 570 μL de Ácido acético concentrado, essa alíquota foi diluída em água deionizada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. O valor do pH foi ajustado pela adição de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão ácido oxálico/ oxalato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 foi preparada a partir da pesagem de 0,9 g de ácido oxálico, solubilizadas em água deionizada, a

solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. O valor do pH foi ajustado pela adição de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

- ❖ Solução de NaOH: O eletrólito NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 a 12,0 foi preparada pela dissolução de 2,0 g do composto em 500 mL de água deionizada. E após o preparo, o pH foi ajustado para 10, utilizando HCl.
- ❖ Estudo de interferência para o íon cianeto: As soluções utilizadas para o estudo de interferência foram preparadas pesando a massa de cada sal para o preparo de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e cada sal foi dissolvido e diluído em balão volumétrico de 25 mL.
- ❖ Estudo de interferência para o metabólito 3,4-dicloroanilina: As soluções utilizadas para o estudo de interferência foram preparadas pesando a massa de cada agrotóxico para o preparo de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e cada defensivo agrícola foi dissolvido e diluído em balão volumétrico de 25,0 mL em uma mistura 50:50 (v/v) de água/acetonitrila.
- ❖ Solução estoque de 3,4-dicloroanilina: A solução estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do analito foi preparada pela dissolução de 41 mg em 25,0 mL de água deionizada/etanol 50:50 (v/v).
- ❖ Solução de trabalho de 3,4-dicloroanilina: A solução de trabalho $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada com uma alíquota 2,5 mL da solução estoque de 3,4-dicloroanilina e diluída em um balão de 25,0 mL com água deionizada/etanol 50:50 (v/v).

3.4. Preparo das Amostras

A determinação de cianeto foi realizada em águas de rios e em água mineral. As amostras de águas de rios foram coletadas em dois rios da região de Araraquara: Jacaré Pepira e Chibarro, sendo que as mesmas foram preparadas para que possuísem uma concentração de cianeto de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na adição. Para isso preparou-se uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KCN, onde 2,5 mL da mesma foi diluída em um balão de 25,0 mL utilizando uma das águas de rios.

Após a diluição, foi realizada centrifugação e a filtração simples para a retirada das partículas sólidas e com o sobrenadante foram realizadas as análises pelo sensor proposto em sistema de batelada, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.

A amostra de água mineral foi enriquecida com cianeto em uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e adicionada sem nenhum tratamento prévio.

A determinação de 3,4-dicloranilina foi realizada nas águas de rios, que foram coletadas na região de Araraquara, acima mencionados. Para tal, uma solução estoque de concentração $6,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mg L^{-1}) foi preparada para as análises eletroquímicas e cromatográficas. A partir dessa solução, as amostras de rios foram contaminadas para que possuísem uma concentração final de $1,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (20 mg L^{-1}), em seguida, centrifugadas por 10 minutos com rotação de 15 rpm para a sedimentação das partículas sólidas presentes nas águas dos rios. Para as análises cromatográficas, as mesmas foram filtradas e injetadas no CLAE, nas análises eletroquímicas, com o intuito de realizar uma pré-concentração, as soluções das amostras foram evaporadas e recuperadas em um volume menor.

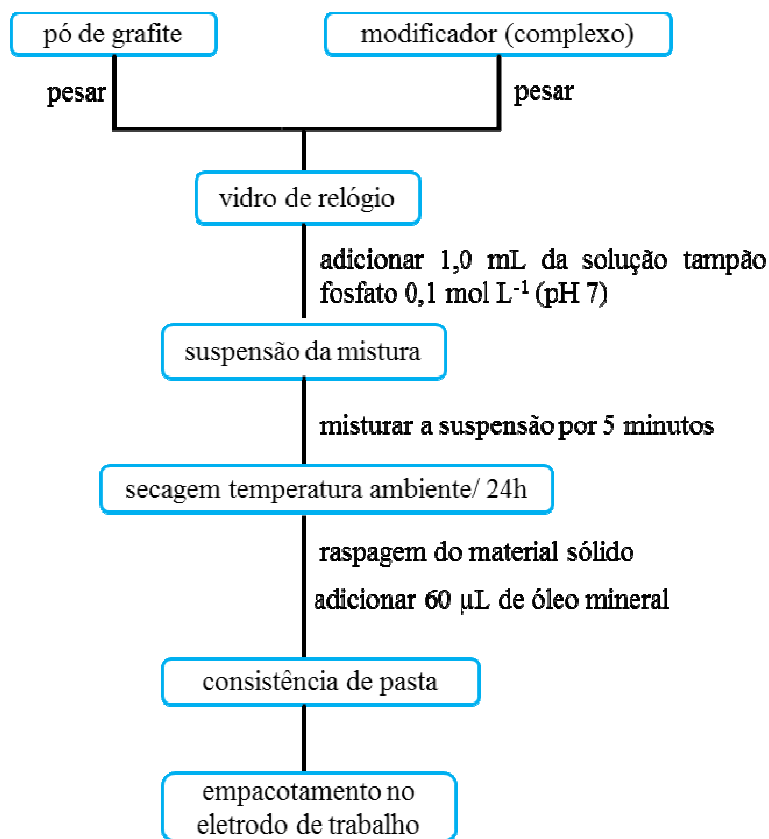
3.5. Construção dos Sensores

Com a finalidade de mimetizar o sítio ativo da enzima P450, os sensores biomiméticos desenvolvidos foram baseados nas características vantajosas das ftalocianinas e porfirinas, sendo assim, diferentes complexos insolúveis em meio aquoso foram testados.

O preparo da pasta de carbono modificada consistiu em pesar 85 mg de pó de grafite e 15 mg de um complexo, possuindo assim uma massa total de 100 mg. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) na mistura grafite com complexo e após a adição foi realizada a homogeneização com auxílio de uma espátula. A mistura foi armazenada em um local arejado por 24 horas para a evaporação da fase líquida. O material seco foi raspado com o auxílio de uma espátula e adicionou-se o $60 \mu\text{L}$ agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®), para a formação da pasta de carbono (**Figura 13**).

Nas análises, cada pasta preparada foi colocada na cavidade do eletrodo de trabalho, friccionando o eletrodo contra a pasta e em seguida, a superfície desse eletrodo foi uniformizada em uma folha de sulfite e o eletrodo foi armazenado em temperatura ambiente.

Figura 14. Fluxograma ilustrativo das etapas de preparação da pasta modificada.



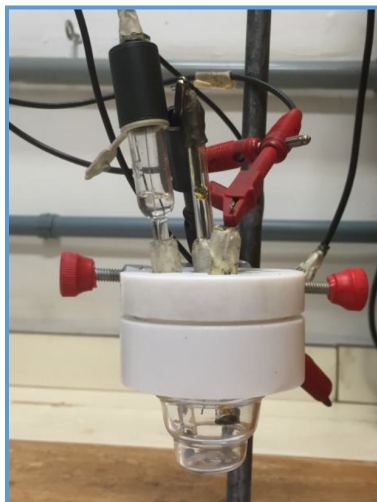
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6. Medidas Eletroquímicas

Diante das variadas técnicas eletroanalíticas disponíveis, utilizou-se nessa tese de Doutorado a voltametria cíclica para caracterização do sensor proposto e a voltametria de onda quadrada para efetuar as análises quantitativas do íon cianeto e do metabólito 3,4-dicloroanilina.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab[®] conectado ao software GPES[®], usando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos (**Figura 14**), contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl, uma espiral de platina como eletrodo auxiliar e o(s) eletrodo(s) de pasta de carbono modificada como eletrodo(s) de trabalho.

Figura 15. Ilustração representativa de uma cela eletroquímica.

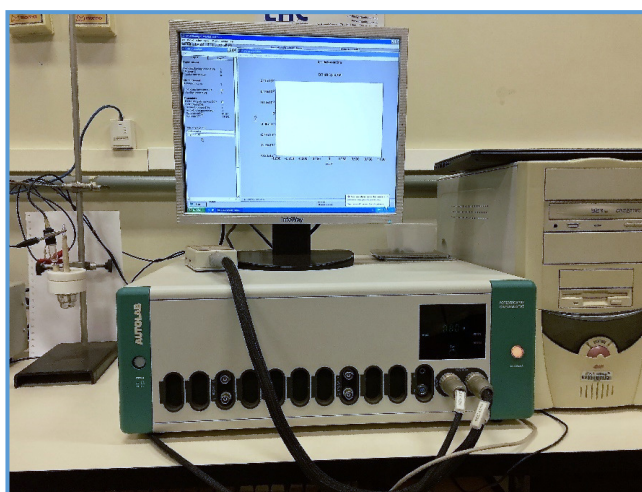


Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises foram realizadas na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de solução tampão (eletrólito) com adições de volumes conhecidos de soluções padrão dos analitos, ou de amostras contendo os analitos. A corrente 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 (*stop*), a fim de realizar a homogeneização da solução e após a adição do analito na célula, 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 (*start*) e a corrente gerada era registrada.

A **Figura 15** mostra uma fotografia do sistema de medida usado neste trabalho.

Figura 16. Fotografia da aparelhagem usada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7. Determinação cromatográfica de 3,4-dicloroanilina

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu® modelo 20A, com detector UV-Vis modelo SPD-20A, amostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A5, acoplado a um microcomputador. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa Phenomenex 5,0 μm (tamanho da partícula) 100 Å (diâmetro poro), comprimento de 250 x 4,60 mm de diâmetro interno. A fase móvel foi utilizada no modo isocrático composta por uma mistura de acetonitrila (ACN) com H_2O ultrapura na proporção 70:30 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} . A detecção foi realizada utilizando comprimento de onda de 250 nm e volume de injeção de amostra de 10 μL .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo para detecção de cianeto

4.1.1. Caracterização eletroquímica do sensor utilizando estudos voltamétricos

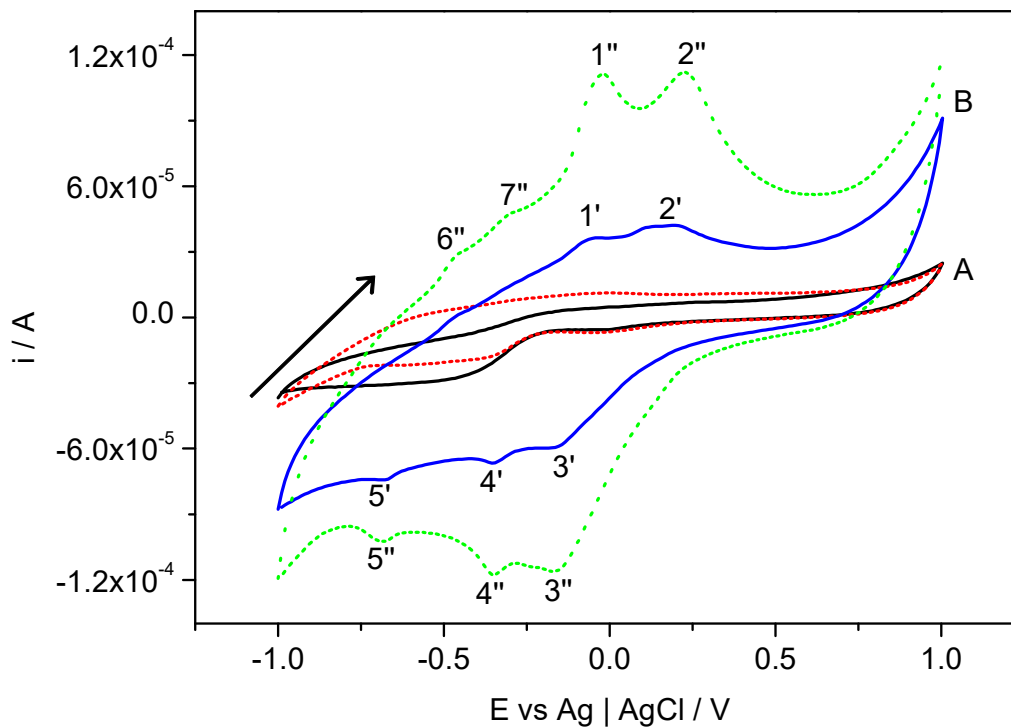
Para o desenvolvimento do sensor biomimético para a determinação de cianeto, foram realizados testes preliminares, por meio da voltametria cíclica, no qual diversos complexos foram estudados no intuito de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção do íon cianeto. Em todas as análises, 10,00 mL do eletrólito de suporte NaOH (pH 10) foram adicionados na célula eletroquímica e, a seguir, um volume conhecido de uma solução padrão de cianeto foi adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos, as varreduras do potencial foram feitas entre -1 V e $+1$ V. Após a adição do analito na cela eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador por cerca de 10 segundos e obtinha-se a leitura da corrente pelo potenciostato. Entretanto, dos onze complexos avaliados, cinco não apresentaram um sinal analítico, três apresentaram uma diminuição na corrente na presença do analito (sinal de inibição) e três apresentaram um aumento de corrente na presença de cianeto, sendo que o complexo que apresentou uma maior sinal analítico na presença do íon cianeto foi a pasta de carbono modificada com o complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H-ftalocianinacobalto(II) [CoPcF₁₆] (**Tabela 5**), o qual já é reconhecido como catalisador biomimético da enzima P450, em reações de eletro-oxidação [97,98-102].

Tabela 5. Complexos analisados como modificadores na presença de $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de íon cianeto utilizando como eletrólito NaOH (pH 10,0).

Complexos analisados	Sinal
ftalocianinaferro(III)-clorada	Sem sinal
Hemina	Sem sinal
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H-ftalocianinacobre(II)	Sem sinal
5,10,15,20 – tetraquis (4-metoxifenil) 21H, 23H – porfirinaferro(III)-clorada	Sem sinal
5, 10, 15, 20 – tetrafenil – 21H, 23H – porfirinaferro(III)-clorada	Sem sinal
protoporfirina IX	Inibição
5, 9,14,28, 23, 27, 32, 36 – octabutoxi – 2,3 – naftalocianinaniquel(II)	Inibição
5,10,15, 20 – tetraquis (4 – metoxifenil) – 21 H, 23 H – porfirinacobalto(II)	Inibição
ftalocianinacobre(II)	Aumento da corrente
ftalocianinaferro(II)-bis(piridina)	Aumento da corrente
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H-ftalocianinacobalto(II)	Aumento da corrente

Para verificar se a modificação da pasta com o complexo [CoPcF₁₆] traria algum ganho em relação à pasta de carbono sem modificação na detecção de cianeto, foram realizados estudos empregando a voltametria cíclica, cujos resultados são mostrados na **Figura 16**.

Figura 17. Perfis eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica, sendo (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) CoPcF₁₆, com (- - -) adição de $4,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de cianeto. Medições realizadas utilizando uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ (pH 10,0).



Fonte: Elaborado pelo autor.

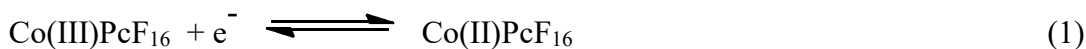
Pode-se observar na **Figura 16(A)**, que na ausência do complexo não há formação de picos e quando adicionado cianeto na cela eletroquímica, o voltamograma praticamente não se altera, mostrando apenas um pequeno aumento da corrente perto de -400 mV, provavelmente originado pelo processo redox do cianeto na superfície do eletrodo. Por outro lado, na presença do complexo, **Figura 16(B)**, é observado que a condutividade do eletrodo aumenta. Esse aumento pode ser explicado considerando que o complexo possui íons eletroquimicamente ativos (Co^{2+}) e grupos funcionais da ftalocianina, sendo esse comportamento esperado para sensores baseados nesta classe de macromoléculas [103-105].

Para explicar o voltamograma da **Figura 16(B)** obtidos pelo sensor proposto, os estudos realizados por Ouyang et al. [106] e Song et al. [107] foram utilizados como referência, assim foi possível atribuir os picos observados na ausência do analito e as respectivas semi-reações.

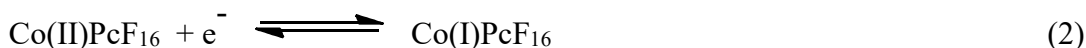
Na **Figura 16(B)**, pode-se observar a presença de dois pares de picos reversíveis, sendo o primeiro observado em 160 mV e -150 mV, que correspondem aos picos 2' e 3' respectivamente, e o segundo par de pico redox em -7 mV e -350 mV que correspondem aos

picos 1' e 4' respectivamente e um pico irreversível em -680 mV (5'), as reações referidas aos picos estão apresentadas abaixo:

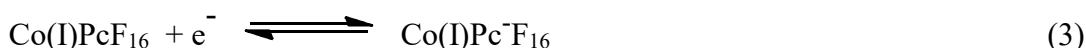
- Picos 2'/3'



- Picos 1'/4'



- Pico 5'



Na presença do íon de cianeto, é possível observar na varredura direta a presença de dois pequenos picos (6 "e 7"), indicando o aparecimento de novas espécies oxidadas, que possivelmente correspondem a oxidação parcial e muito bem conhecida através de dois elétrons de CN^{-} a CNO^{-} em meio alcalino (pH 12) [108, 109].

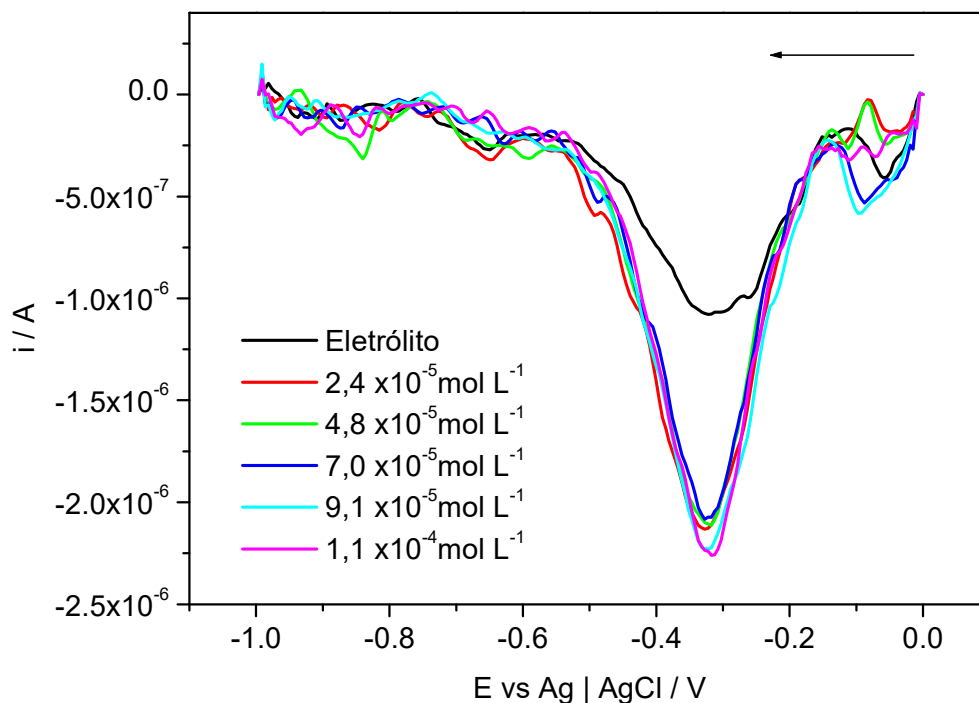
- Picos 6 "e 7"



Na presença de cianeto, **Figura 16(B)** observa-se um aumento da corrente catódica e anódica, evidenciando que houve alguma interação e/ou reação entre o analito e a superfície da pasta modificada com o complexo $[\text{CoPcF}_{16}]$, podendo assim ser usada na determinação deste íon, o cianeto.

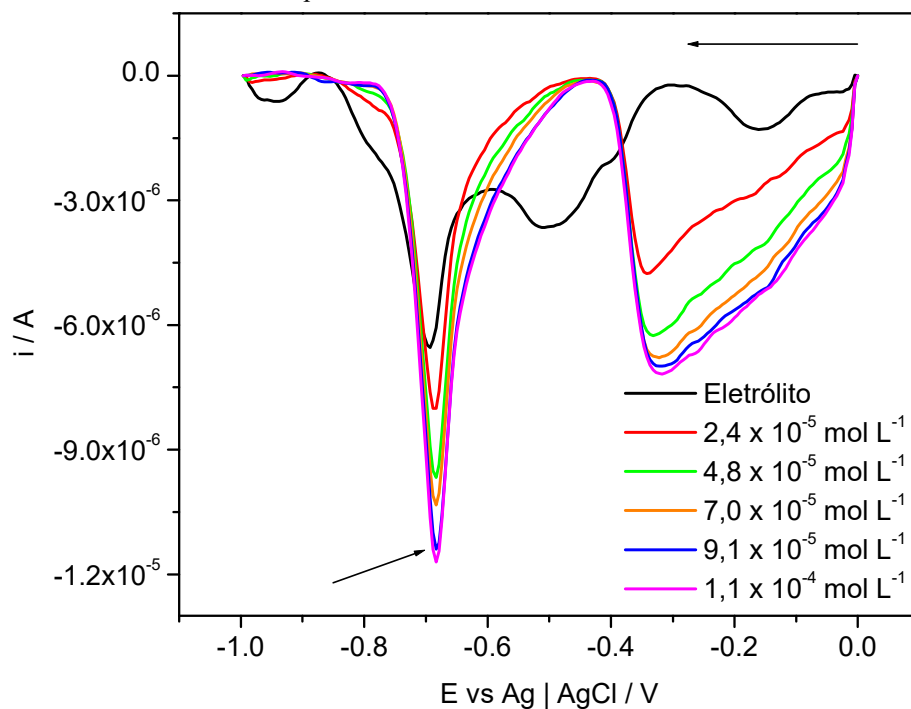
Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente que permitisse quantificar o analito de interesse, a **Figura 17** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de cianeto para pasta de carbono não modificada e na **Figura 18** encontram-se os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de cianeto, porém com o complexo $[\text{CoPcF}_{16}]$. A faixa de potencial utilizada para a realização da voltametria de onda quadra foi de 0,0 V a -1,0 V, pois na faixa de potencial de 0,0 V a +1,0 V não ocorreu formação de pico relativo ao cianeto.

Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada para eletrodo de pasta sem modificação. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte, uma solução de NaOH (pH 10,0), Amplitude: 10 mV, Frequência: 10 Hz e incremento de potencial: 5 mV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono modificada com $[CoPcF_{16}]$. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte, uma solução de NaOH (pH 10,0), Amplitude: 10 mV, Frequência: 10 Hz e incremento de potencial: 5 mV.



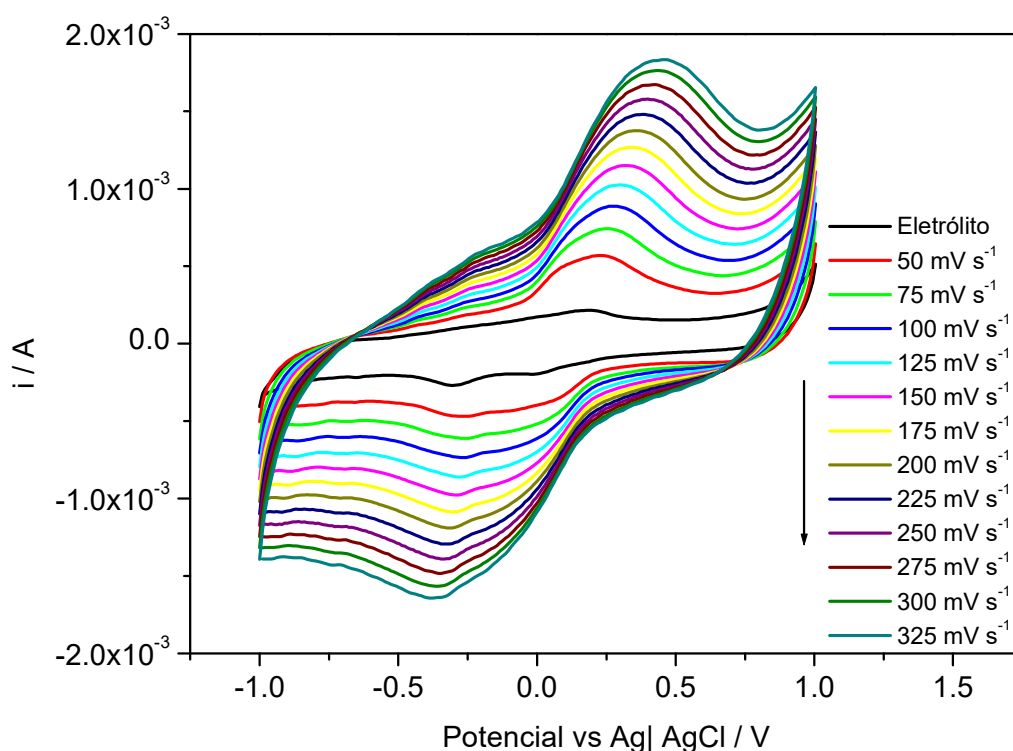
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após analisar os voltamogramas de onda quadrada da pasta sem modificador, pode-se observar que o aumento da corrente não ocorreu de forma linear com aumento da concentração de cianeto, já na pasta modificada com o complexo $[\text{CoPcF}_{16}]$, observa-se a formação de picos em, -0,320 V e -0,680 V. Entretanto, escolheu-se o potencial de -0,680 V para as análises, pois apresentou um melhor perfil, uma vez que houve um aumento linear da corrente com o aumento da concentração do analito no sistema. O pico presente no potencial de -0,320 V pode ser atribuído a alguma impureza presente na pasta, pois surgiu em todas as análises, na presença ou ausência do analito e nas análises com a pasta modificada e sem modificação.

Conforme os resultados obtidos, verificou-se que houve uma relação linear entre a corrente catódica e a concentração de CN^- , o que viabiliza o uso deste sensor à base de 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29 H, 31 H- ftalocianinacobalto (II) $[\text{CoPcF}_{16}]$ para análise quantitativa deste analito.

Em continuidade aos estudos eletroquímicos, foram registrados voltamogramas cíclicos com o sensor para cianeto em diferentes velocidades de varredura de 50 a 325 mV s^{-1} (**Figura 19**) com a finalidade de verificar qual processo ocorre na superfície do sensor.

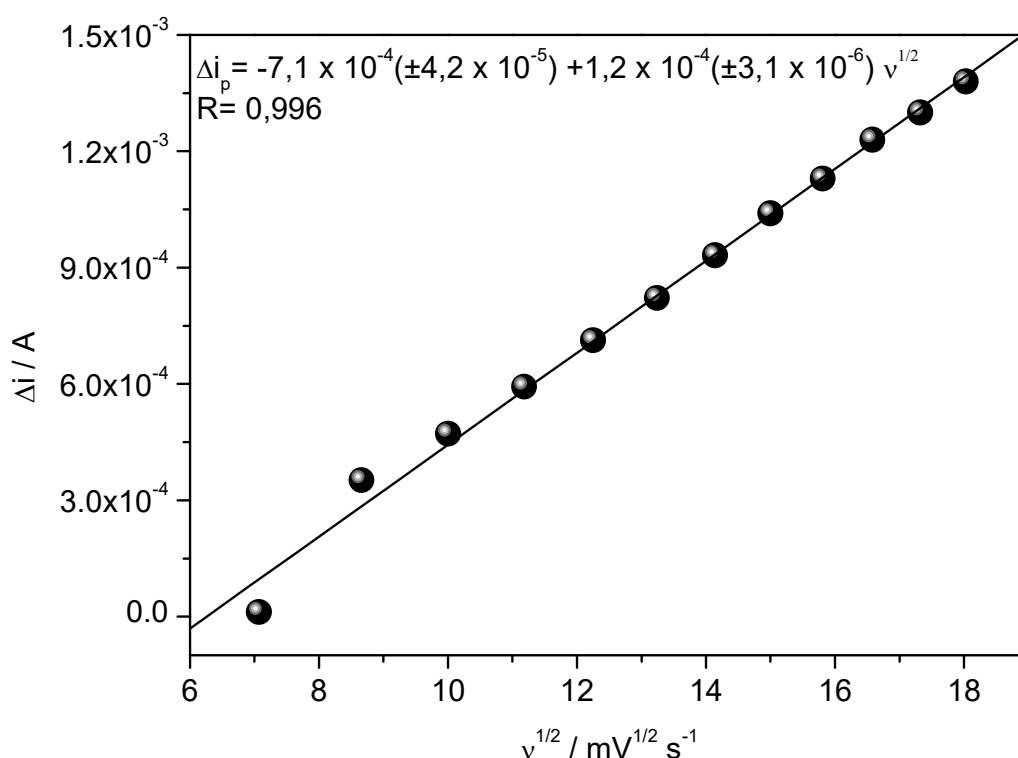
Figura 20. Voltamogramas cíclicos para o sensor em $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto e em diversas velocidades de varredura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com esses experimentos foi possível observar a partir das informações do gráfico que mostram a existência de uma dependência linear entre a corrente de pico catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura em toda a faixa estudada (50 a 325 mV s^{-1}) indicando que a reação na superfície do sensor é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo [110] (**Figura 20**).

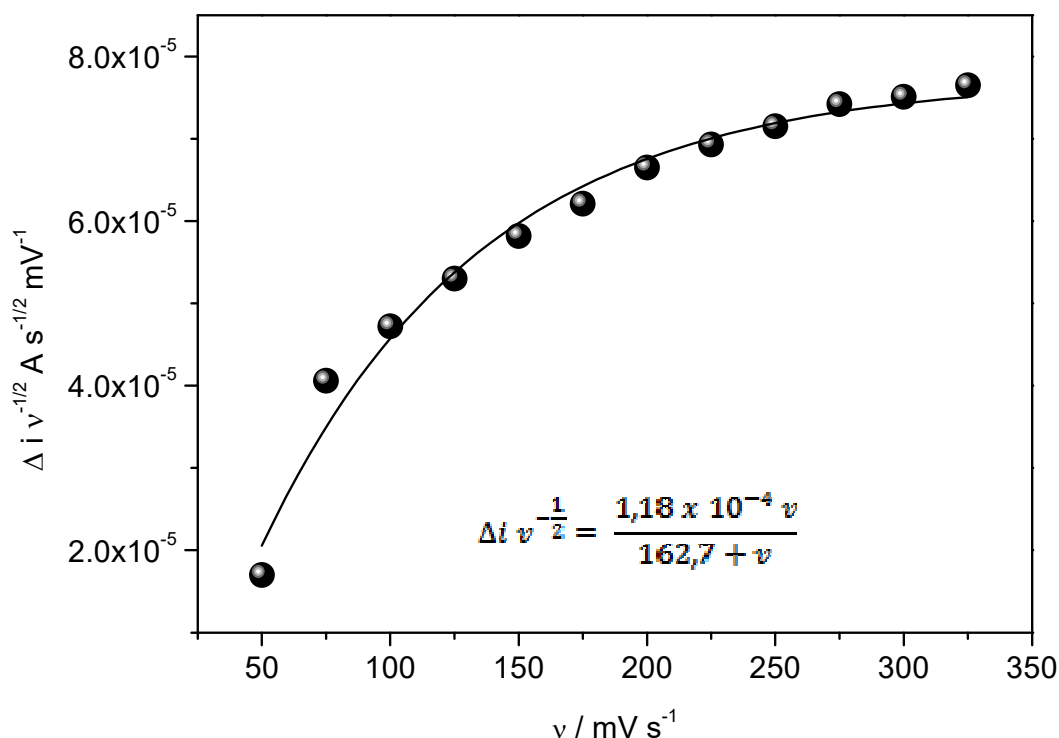
Figura 21. Variação da corrente de pico catódico (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com $[\text{CoPcF}_{16}]$. Contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionalmente, quando construído 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 21**) o perfil obtido sugere que o processo de redução do complexo na presença do cianeto é eletrocatalítico do tipo EC' (*electrochemical/chemical catalytic*), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada ao processo eletroquímico [77], este resultado será importante ao propor um mecanismo de resposta para este sensor.

Figura 22. Variação da corrente de pico catódico normalizada ($(\Delta i_{pc} v^{-1/2})$ vs v Medidas realizadas em uma solução de NaOH, pH 12 contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após verificação da eletroredução catalítica do sensor proposto utilizando a voltametria cíclica, a seguir são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados com o objetivo de otimizar a resposta do sensor para cianeto.

4.1.2. Otimização da resposta do sensor

A otimização é o processo de encontrar as melhores condições para a realização das análises, existindo um conjunto de parâmetros nos quais é decisiva a aplicação de um procedimento de otimização. O tipo de otimização que melhor se adequou para o experimento foi o planejamento univariado, que consiste em variar um único parâmetro e fixar os outros parâmetros. Para isso foram realizadas voltametrias de onda quadrada, onde foram obtidas respostas em função dos valores de variação de corrente, possibilitando construir curvas analíticas e obter valores de sensibilidade para cada experimento executado, sendo os parâmetros escolhidos aqueles que apresentaram os maiores valores de sensibilidades. O

planejamento univariado foi realizado em triplicata para cada um dos parâmetros, sendo esses separados em duas categorias:

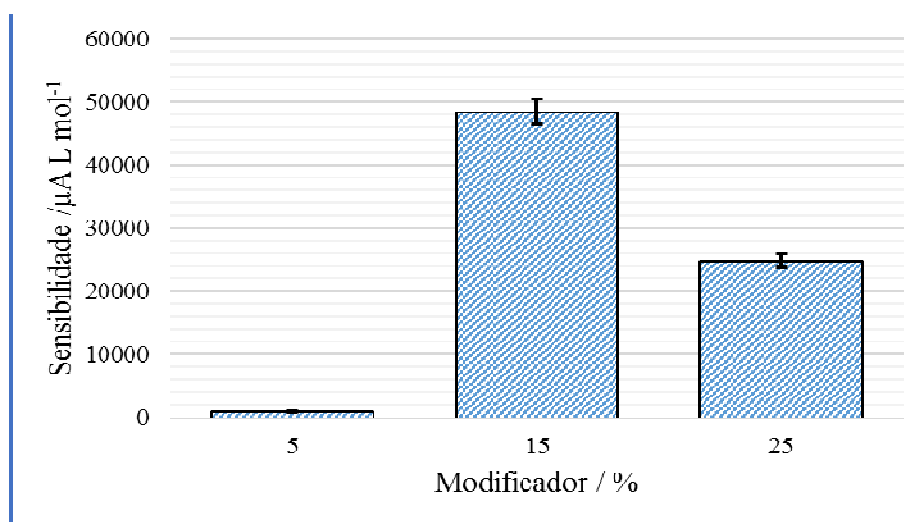
- Parâmetros químicos: Relacionados na preparação do sensor como porcentagem do modificador e a concentração do eletrólito bem como o seu pH.
- Parâmetros eletroquímicos: Parâmetros relacionados a voltametria de onda quadrada como frequência da aplicação do potencial; amplitude de pulso; incremento do potencial.

Parâmetros Químicos

A otimização foi iniciada analisando os parâmetros químicos. Os gráficos abaixo mostram as relações dos parâmetros e a sensibilidade.

O primeiro parâmetro otimizado foi a porcentagem do modificador (**Figura 22**), pode-se perceber que a melhor condição para o parâmetro foi com a utilização de 15% (m/m) do complexo, pois apresentou melhor resposta analítica. A reação entre o analito e o complexo ocorre na superfície do eletrodo e quando utilizado uma maior quantidade de complexo, esse pode ficar no interior na pasta de carbono e assim não contribuir para uma melhora na sensibilidade, além de diminuir a condutividade da pasta com a diminuição da quantidade de grafite.

Figura 23. Relação da porcentagem de modificador e a sensibilidade.

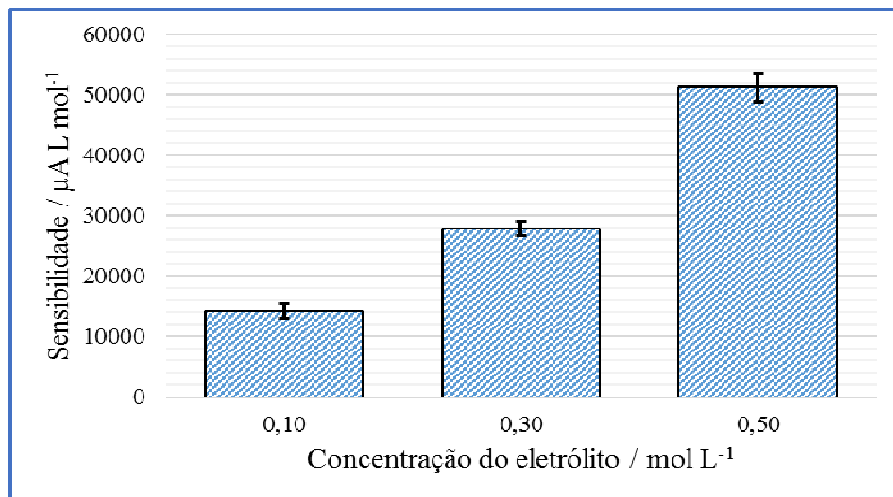


Fonte: Elaborado pelo autor.

O segundo parâmetro otimizado foi a concentração do eletrólito hidróxido de sódio (**Figura 23**), sendo que a melhor condição para o parâmetro foi a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, nessa otimização foram realizados experimentos com o eletrólito em concentrações

0,01 mol L⁻¹, 0,05 mol L⁻¹, 0,08 mol L⁻¹, 0,1 mol L⁻¹, 0,3 mol L⁻¹, 0,5 mol L⁻¹ e 0,8 mol L⁻¹, entretanto alguns dos resultados obtidos não foram satisfatórios para a construção da curva analítica e assim a realização da análise da sensibilidade.

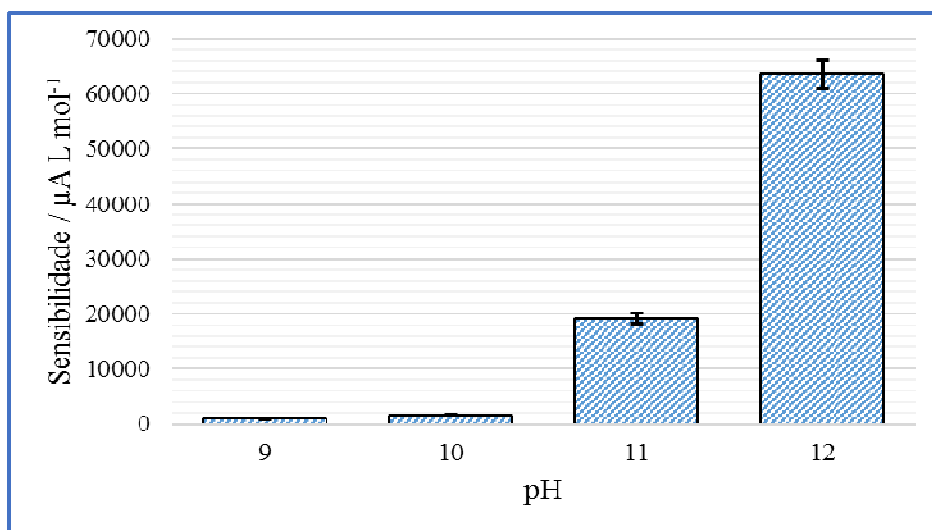
Figura 24. Relação da concentração do eletrólito e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O último parâmetro químico otimizado foi pH (**Figura 24**), sendo que o maior valor de sensibilidade foi obtido no pH 12. Na otimização do pH, os experimentos foram realizados apenas na faixa de pH 9,0 a 12,0, pois em pH abaixo de 9,0 ocorre a formação de ácido cianídrico e assim a geração do gás tóxico.

Figura 25. Relação do pH do eletrólito e a sensibilidade.



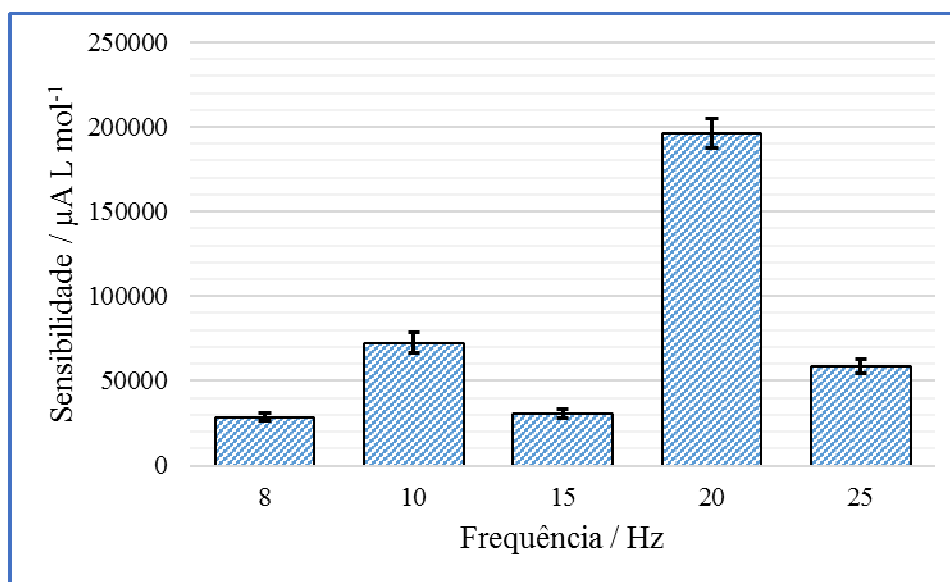
Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetros eletroquímicos

Os parâmetros eletroquímicos estão relacionados com a técnica utilizada para a quantificação do analito, a voltametria de onda quadrada, os parâmetros otimizados foram: a frequência, amplitude e o incremento do potencial.

O primeiro parâmetro otimizado foi a frequência da aplicação do potencial (**Figura 25**), sendo estudadas frequências de 8 Hz a 100 Hz, porém para valores de frequência acima 25 Hz não foram obtidos resultados satisfatórios para a construção da curva analítica e assim a realização da análise da sensibilidade.

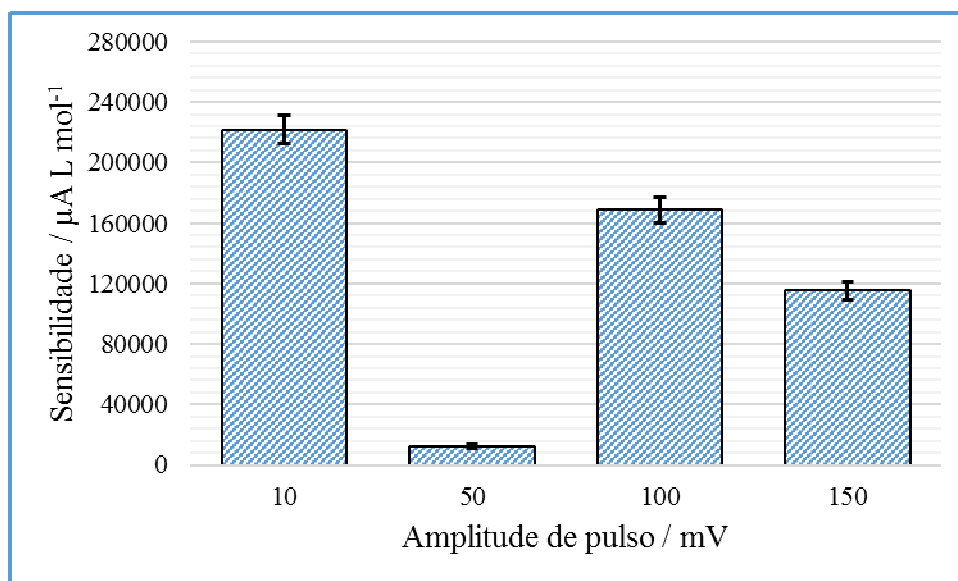
Figura 26. Relação da frequência e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a obtenção de 20 Hz como a melhor frequência para a determinação de cianeto, foi otimizada a amplitude de pulso (**Figura 26**), sendo o maior valor de sensibilidade em 10 mV.

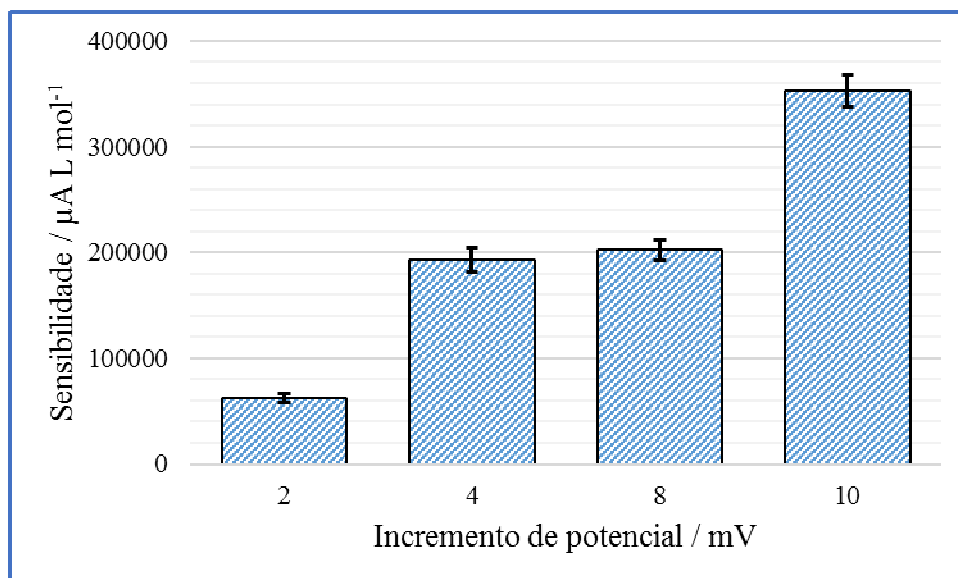
Figura 27. Relação da amplitude de pulso e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O último parâmetro eletroquímico otimizado foi o incremento de potencial (**Figura 27**), sendo o maior valor de sensibilidade obtido em 10 mV.

Figura 28. Relação do incremento de potencial e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após todos os experimentos realizados, as melhores condições obtidas para o experimento podem ser observadas na **Tabela 2** abaixo:

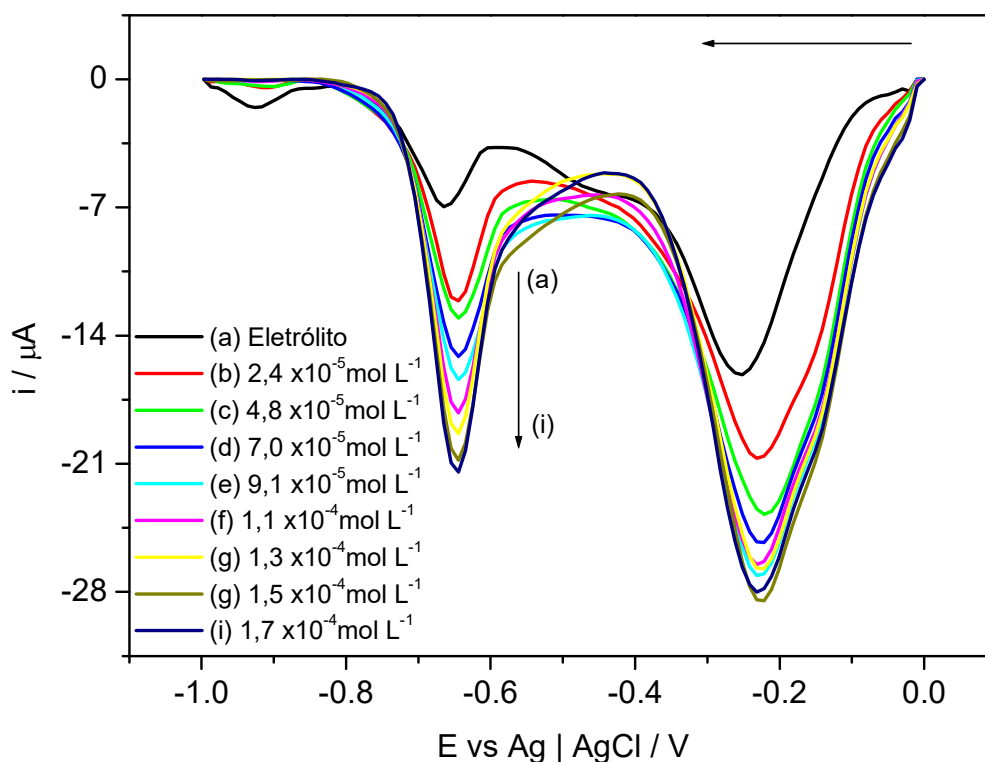
Tabela 6. Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de cianeto.

Variáveis	Melhores condições
Porcentagem de modificador (% m/m)	15
Concentração do eletrólito (mol L ⁻¹)	0,5
pH do eletrólito	12
Frequência (Hz)	20
Amplitude (mV)	10
Incremento de potencial (mV)	10

4.1.3. Perfil de resposta do sensor

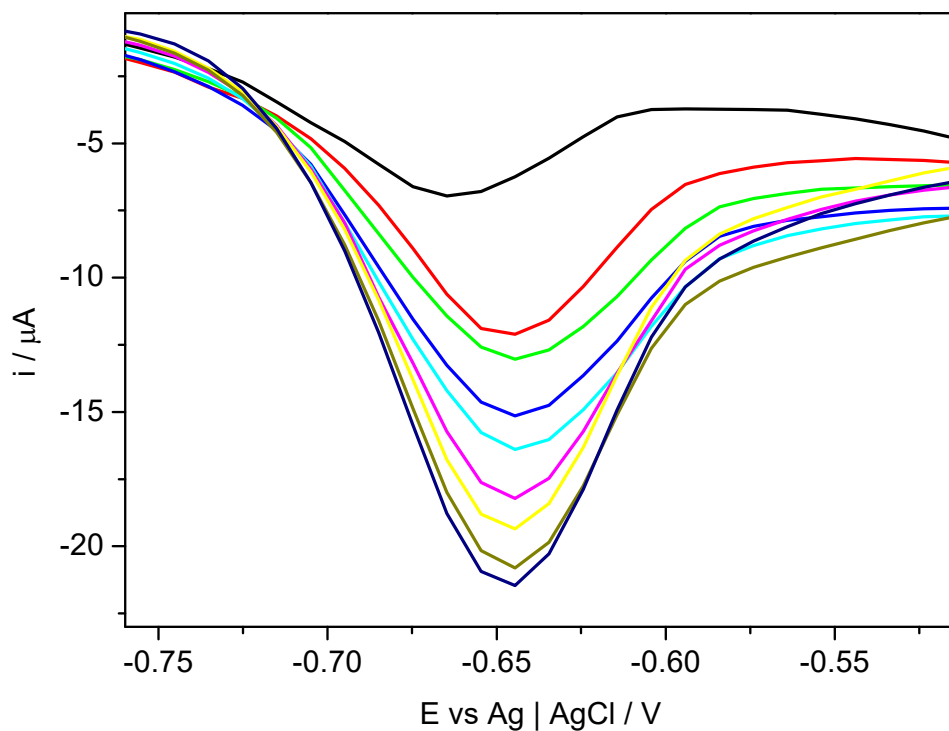
Após a otimização dos parâmetros eletroquímicos e químicos a partir do planejamento univariado, foi realizada a voltametria de onda quadrada (**Figura 28A**) e para melhor visualização, a região de quantificação do íon cianeto foi ampliada (**Figura 28B**) possibilitando a construção da curva analítica, na qual a corrente é medida após cada adição do analito em relação ao eletrólito no potencial de pico de -0,645 V (**Figura 29**).

Figura 29A. Perfil de resposta do sensor para cianeto em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Eletrólito NaOH 0,5 mol L⁻¹, pH 12, amplitude: 10 mV, frequência: 20 Hz e incremento potencial: 10 mV.



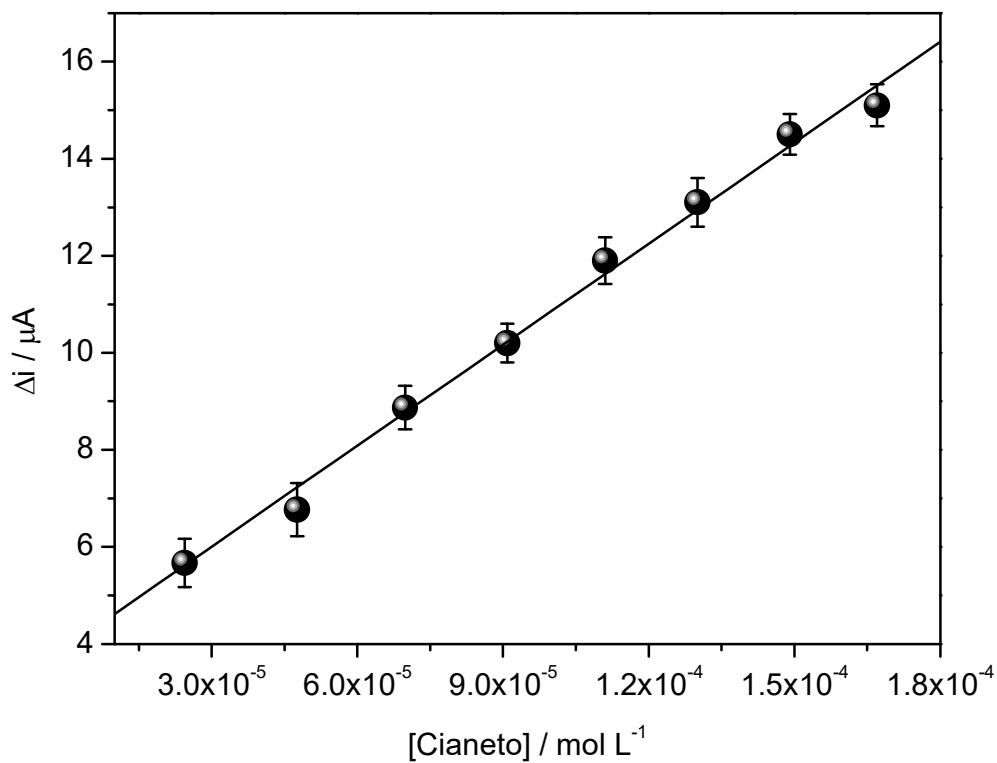
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30B. Ampliação do perfil de resposta do sensor para cianeto em voltametria de onda quadrada relativo a Figura 28A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31. Curva analítica obtida nas condições otimizadas. Eletrólito NaOH 0,5 mol L⁻¹, pH 12, amplitude: 10 mV, frequência: 20 Hz e incremento potencial: 10 mV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A otimização da pasta de carbono e dos parâmetros para realização das medidas voltamétricas permitiu obter uma faixa linear de resposta de $2,4 \times 10^{-5}$ a $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $1,1 \times 10^{-5}$ e $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, os quais foram calculados conforme recomendado pela ANVISA [111]. 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), $3 \times \sigma_a/b$. Já o limite de quantificação (LOQ) [111], foi calculado como 3,3 vezes o valor do LOD ($10 \times \sigma_a/b$).

Uma relação linear ($r = 0,996$) foi obtida pela representação gráfica de Δi versus concentração de cianeto (mol L^{-1}). A equação da reta que representa os dados da Figura 18 é mostrada na **Equação 1**.

$$\Delta i/\mu\text{A} = 3,86 (\pm 0,25) + 69.891 (\pm 2.284) [\text{Cianeto}] \quad \text{Equação 1}$$

Para a verificação da repetibilidade da curva analítica, foram realizados outros experimentos no mesmo dia e em dias diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dia), sendo que os coeficientes de variação obtidos foram de 4,8% e 5,2%, respectivamente. Os resultados apresentados mostraram que as medidas são precisas e satisfatórias por apresentarem bons desvios e um bom coeficiente para a curva analítica. Adicionalmente, foi determinado experimentalmente também o tempo de vida do sensor proposto.

Na **Tabela 7** são mostradas todas as características analíticas apresentadas pelo sensor, avaliado neste trabalho apenas em sistema em batelada.

Tabela 7. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear	$2,4 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Sensibilidade	$69891 \mu\text{A Lmol}^{-1}$
Coeficiente de Correlação (n=8)	0,996
Limite de detecção	$1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
Limite de quantificação	$3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
Repetibilidade intra-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	4,8%
Repetibilidade inter-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	5,2%
Tempo de vida mantendo 95% sinal inicial	5 dias (378 medidas) – 10 curvas/dia

4.1.4. Estudo de seletividade

A seletividade do sensor foi analisada eletroquimicamente por voltametria de onda quadrada e a resposta do sensor proposto foi avaliada para nove íons solúveis em água (Na^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , Pb^{2+} , H_3CCOO^- , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, MoO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^-), sendo os resultados apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Sais analisados para o estudo de possíveis interferentes.

Sal	Sinal Analítico
Acetato de sódio	n.d
Borato de sódio	n.d
Cloreto de cálcio	n.d
Fosfato de potássio bibásico	n.d
Molibdato de amônio	n.d
Nitrato de chumbo II	n.d

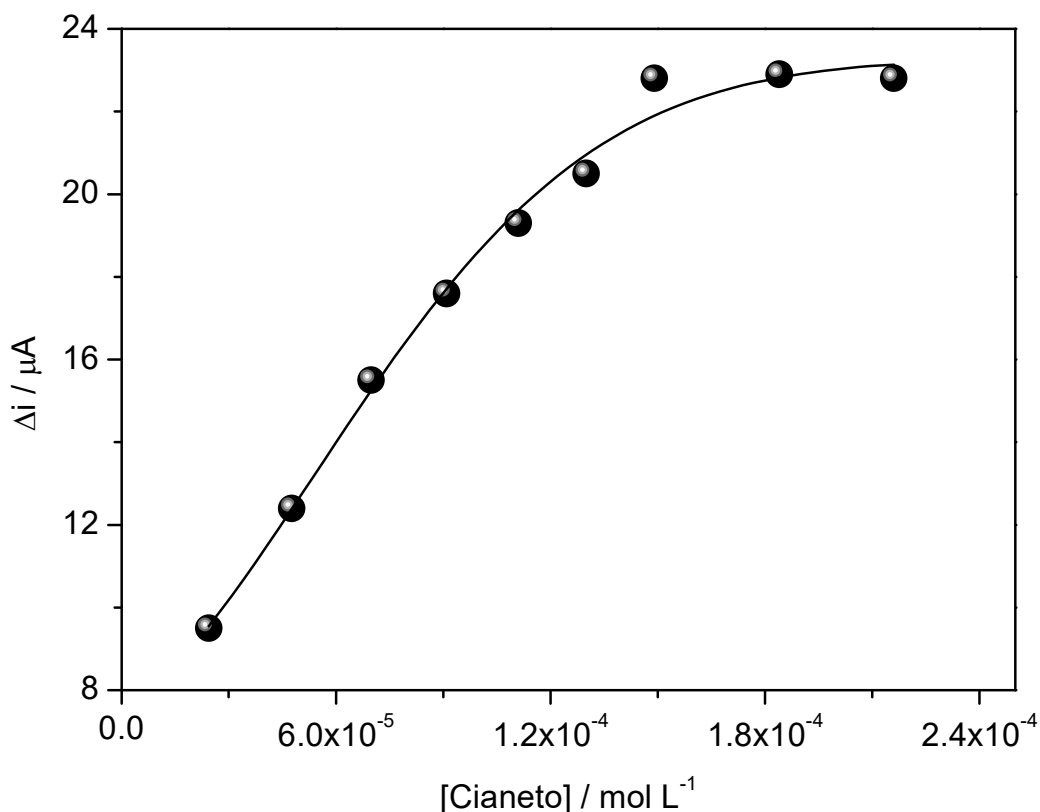
n.d = não detectado

Observa-se que o sensor não apresentou resposta para nenhum dos 9 íons estudados, desta forma estes resultados sugerem que o sensor à base de $[\text{CoPcF}_{16}]$, é seletivo para o íon cianeto em relação a outros íons, tal qual, é esperado para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático. Essa seletividade pode ser atribuída ao complexo e a otimização dos parâmetros químicos e eletroquímicos que favorecem a determinação do íon cianeto.

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 30**.

Figura 32. Perfil hiperbólico do sensor modificado com o complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 - hexadecafluoro - 29H - 31H – ftalocianinacobalto (II).

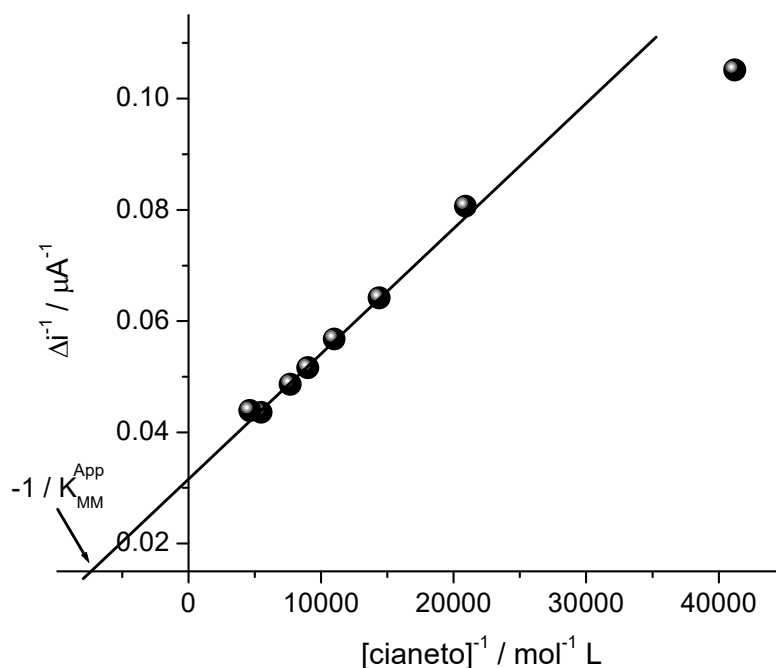


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 30** pode ser verificado um perfil hiperbólico, tal como ocorre no caso dos biossensores enzimáticos, indicando que o complexo na pasta de carbono segue uma cinética do tipo “Michaelis-Menten” [112].

Adicionalmente, ao construir o gráfico de Lineweaver-Burker ou do duplo recíproco (**Figura 31**), foi possível estimar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{App}) [113], a qual apresentou um valor de $4,7 \times 10^{-5} mol L^{-1}$, que é um valor que indica uma forte afinidade [113] do complexo biomimético de cobalto pelo “substrato” cianeto.

Figura 33. Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 30.



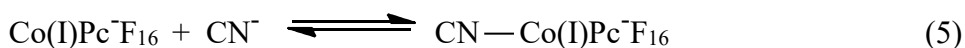
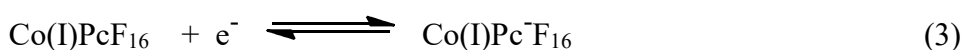
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nos resultados obtidos nas **Figuras 16, 20 e 21** que sugerem que a redução do complexo na presença do cianeto é eletrocatalítica; com base nos resultados obtidos da resposta do sensor em diversos íons, observa-se que o sensor é seletivo; e com base nas **Figuras 30 e 31** que demonstram que a resposta do sensor é hiperbólica e que há uma alta afinidade entre o complexo de cobalto e o cianeto, avaliada pelo valor do K_{MM}^{App} ; pode-se dizer que o sensor construído à base do complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 - hexadecafluoro - 29H - 31H – ftalocianinacobalto (II), trata-se de um sensor biomimético.

4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor

Uma explicação plausível para a resposta do sensor está baseada no fato de que os elementos de transição, cobalto e ferro, formam complexos estáveis com cianeto, pois podem utilizar os seus orbitais d para formar ligações d- π , além da ligação coordenada σ do Co—CN. Essa ligação é semelhante ao que acontece com o grupo carbonilo (CO). A carga negativa sobre o cianeto torna-o melhor doador do que o CO, mas, ao contrário, reduz a eficiência do cianeto como um receptor π [114]. No sensor proposto, já que o CN^- não é reduzido a outras

espécies, o aumento da corrente catódica na presença de CN^- pode ser explicada considerando que no $\text{Co(I)Pc}^-\text{F}_{16}$ (gerado em uma etapa eletroquímica a -680 mV, reação (3)) o centro metálico é altamente suscetível a interagir com doadores de elétrons, como CN^- . Na presença do analito, a reação (etapa química, reação(5)) permitirá a formação da ligação coordenada $\text{Co}-\text{CN}$.



Assim, quando a concentração de cianeto aumenta, ocorre um deslocamento de equilíbrio da reação (5) para a direita, exigindo uma quantidade maior de CoPcF_{16} , sendo assim, ocorre um deslocamento de equilíbrio para a formação de $\text{Co(I)Pc}^-\text{F}_{16}$ da reação (3), ocorrendo o aumento da corrente de redução observada, sendo assim, a determinação de cianeto realizada ocorre de forma indireta.

Metais da primeira série de transição com orbitais d^6 (Co(III)) e d^7 (Co(II)) formam complexos estáveis que não favorecem a formação de ligações coordenada com o cianeto, entretanto, ao realizar a redução do Co(II) para Co(I) essa estabilidade é diminuída, favorecendo a formação da ligação coordenada do cobalto com o íon cianeto [114].

4.1.7. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras ambientais (rios) e de água mineral

Determinados os parâmetros de otimização, as características analíticas e os estudos eletroquímicos, aplicou-se o método desenvolvido em amostras de águas de rios e em água mineral, sendo avaliada a recuperação em amostras enriquecidas com cianeto (**Tabela 9**). As amostras foram enriquecidas para que possuíssem uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto, sendo adicionado 250 μL da amostra na cela eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito. A concentração esperada na recuperação é de $2,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cianeto.

Tabela 9. Dados obtidos na recuperação de cianeto em amostras de águas de rios e em água mineral usando o sensor a base de pasta de carbono modificada com 15% (m/m) do complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 - hexadecafluoro - 29H - 31H – ftalocianinacobalto(II).

Amostras	Sinal Analítico	Recuperação
	$[\text{CN}^-] \times 10^{-5} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	
Rio Jacaré-Pepira	$2,32 \pm 0,5$	95%
Rio Chibarro	$2,49 \pm 0,8$	102%
Água mineral	$2,40 \pm 0,3$	98%

Os resultados encontrados na recuperação de cianeto em amostras de águas de rios e água mineral como pode ser visto na **Tabela 9**, evidenciam que nesses meios analisados praticamente não ocorreu efeito de matriz.

A partir dos dados encontrados na aplicação do sensor nesses tipos de amostras, pode-se dizer que o método proposto apresentou resultados satisfatórios e dessa forma pode ser usado como um método alternativo para a quantificação de cianeto.

4.2. SENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM COMPLEXO PARA DETECÇÃO DE 3,4-DICLOROANILINA.

4.2.1. Caracterização eletroquímica do sensor utilizando estudos voltamétricos

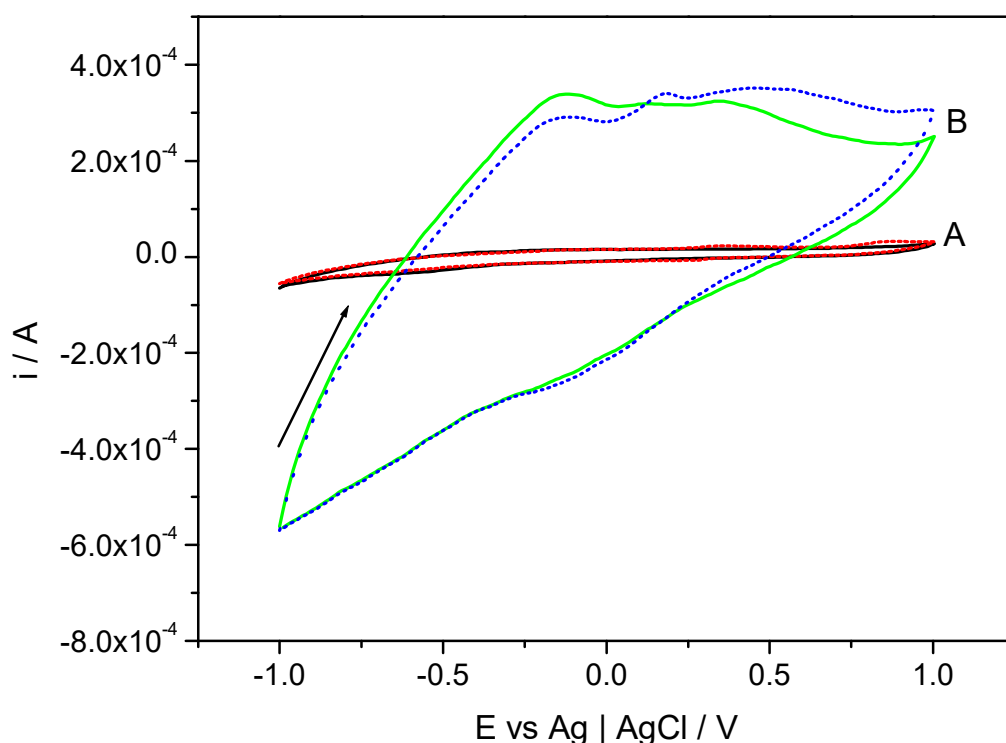
Para o desenvolvimento do sensor biomimético para a determinação do herbicida 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), foram realizados testes preliminares por meio da voltametria cíclica, no qual diversos complexos foram estudados no intuito de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção do 3,4-DCA. Em todas as análises, 10,00 mL da solução tampão BR pH 5,0 foram adicionados na cela eletroquímica e, a seguir, um volume conhecido de uma solução padrão de 3,4-DCA foi adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos, as varreduras do potencial foram feitas entre -1 V e +1 V. Após a adição do analito na cela eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador por cerca de 10 segundos e obtinha-se a leitura da corrente pelo potenciostato. Entretanto, dos onze complexos avaliados, dez não apresentaram um sinal analítico e apenas um apresentou aumento de corrente na presença de 3,4-DCA, que foi a pasta de carbono modificada com o complexo ftalocianinacobre(II) [Cu(II)Pc] (**Tabela 10**), o qual já é reconhecido como catalisador biomimético da enzima P450, em reações de eletro-oxidação [97,98-102].

Tabela 10. Complexos analisados como modificadores na presença de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3,4-DCA utilizando solução tampão BR (pH 5,0).

Complexos analisados	Sinal
ftalocianinaferro(III)-clorada	Sem sinal
Hemina	Sem sinal
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H-ftalocianinacobre(II)	Sem sinal
5,10,15,20 – Tetraquis (4-metoxifenil) 21H, 23H – porfirinaferro(III)-clorada	Sem sinal
5, 10, 15, 20 – Tetrafenil – 21H, 23H – porfirinaferro(III)-clorada	Sem sinal
Protoporfirina IX	Sem sinal
5, 9, 14, 28, 23, 27, 32, 36 – octabutoxi – 2,3 – naftalocianiniquel(II)	Sem sinal
5,10,15, 20 – Tetraquis (4 – metoxifenil) – 21 H, 23 H – porfirinacobalto(II)	Sem sinal
ftalocianinacobre(II)	Aumento da corrente
ftalocianinaferro(II)-bis(piridina)	Sem sinal
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25 – hexadecafluoro – 29H, 31H – ftalocianinacobalto(II)	Sem sinal

Para verificar se a modificação da pasta com o complexo [Cu(II)Pc] traria algum ganho em relação à pasta de carbono sem modificação na detecção do 3,4-DCA, foram realizados estudos empregando a voltametria cíclica, cujos resultados são mostrados na **Figura 32**.

Figura 34. Perfis eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica, sendo (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) Cu(II)Pc, com (---) adição de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3,4-DCA. Medições realizadas utilizando solução tampão BR (pH 5,0).



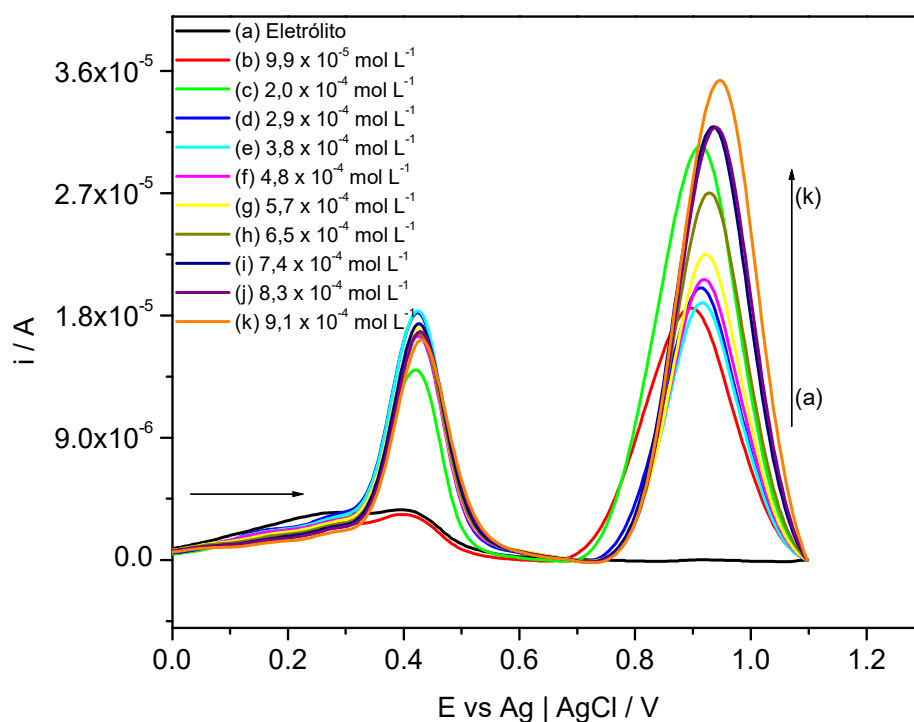
Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar na **Figura 32(A)**, que na ausência do complexo não há formação de picos e quando adicionado o 3,4-DCA na cela eletroquímica, o voltamograma praticamente não se altera, mostrando apenas um pequeno aumento da corrente próximo de +850 mV, provavelmente originado pelo processo redox do herbicida na superfície do eletrodo. Por outro lado, na presença do complexo, **Figura 32(B)**, é observado que a condutividade do eletrodo aumenta, esse aumento pode ser explicado considerando que o complexo possui íons eletroquimicamente ativos (Cu^{2+}) e grupos funcionais da ftalocianina, sendo esse comportamento esperado para sensores baseados nesta classe de macromoléculas [103-105].

Na presença de 3,4-DCA, **Figura 32(B)** observa-se um aumento da corrente anódica, evidenciando que houve alguma interação e/ou reação entre o analito e a superfície da pasta modificada com o complexo $[\text{Cu(II)Pc}]$, podendo assim ser usada na determinação do herbicida, 3,4-dicloroanilina.

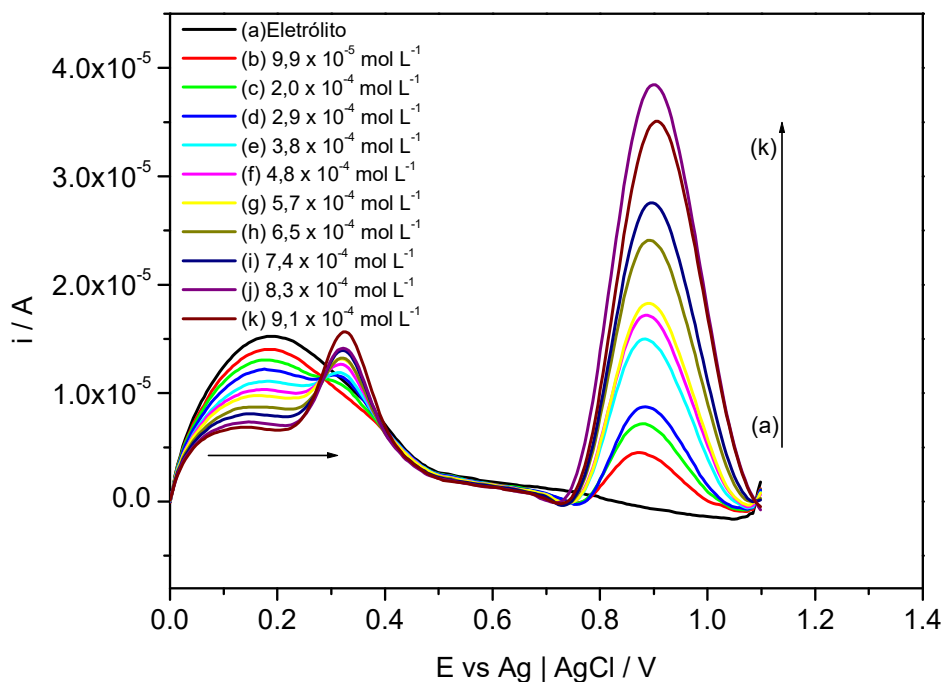
Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente que permitisse quantificar o analito de interesse, a **Figura 33** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de 3,4-DCA para pasta de carbono não modificada e na **Figura 34** encontram-se os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações do analito, porém com o complexo $[\text{Cu(II)Pc}]$.

Figura 35. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono não modificada. Medidas realizadas usando solução tampão BR (pH 5,0), Amplitude:10 mV, Frequência:10 Hz e Incremento de potencial: 5 mV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo de pasta de carbono modificada com [Cu(II)Pc]. Medidas realizadas usando solução tampão BR (pH 5,0), Amplitude:10 mV, Frequência:10 Hz e Incremento de potencial: 5 mV.



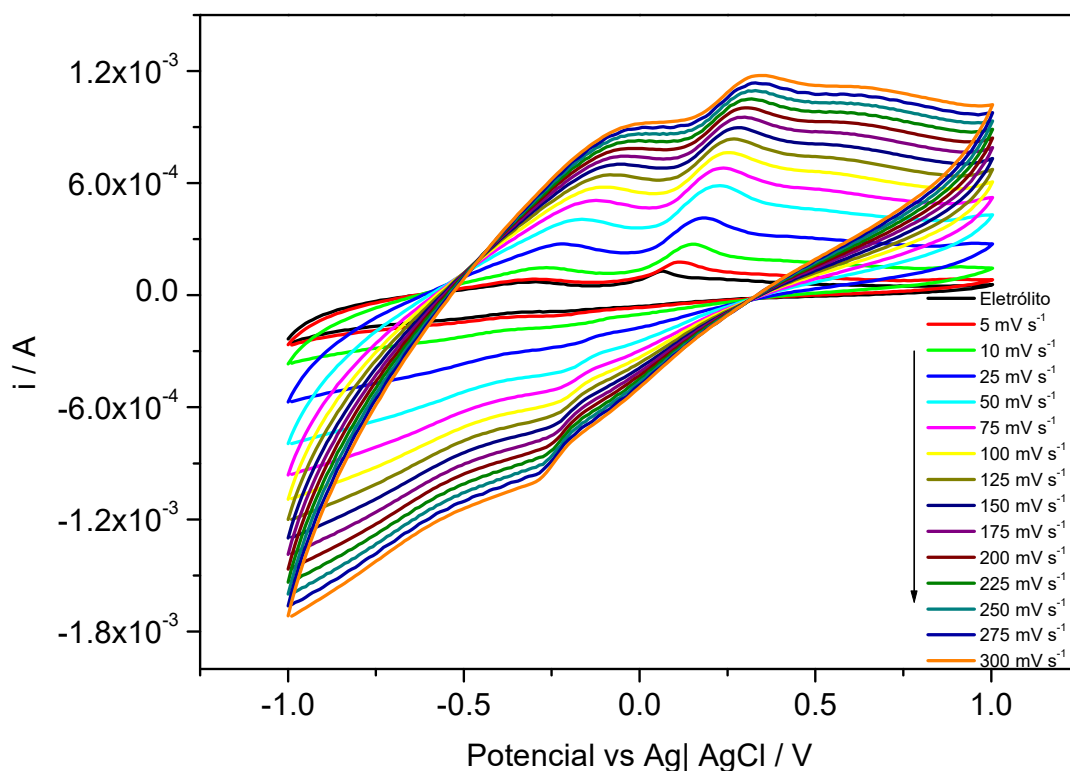
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após analisar os voltamogramas de onda quadrada da pasta sem modificador, pode-se observar que o aumento da corrente não ocorreu de forma linear com aumento da concentração de 3,4-DCA, já na pasta modificada com o complexo [Cu(II)Pc], observa-se a formação de picos em, +0,320 V e +0,900 V. Entretanto, escolheu-se o potencial de +0,900 V para as análises, pois apresentou um melhor perfil, uma vez que houve um aumento linear da corrente com o aumento da concentração do analito no sistema.

Conforme os resultados obtidos, verificou-se que houve uma relação linear entre a corrente anódica e a concentração de 3,4-DCA, o que viabiliza o uso deste sensor à base de ftalocinana de cobre(II) [Cu(II)Pc] para análise quantitativa deste analito.

Em continuidade aos estudos eletroquímicos, foram registrados voltamogramas cíclicos com o sensor para o herbicida em diferentes velocidades de varredura de 5 a 300 mV s⁻¹ (**Figura 35**) com a finalidade de verificar qual processo que ocorre na superfície do sensor.

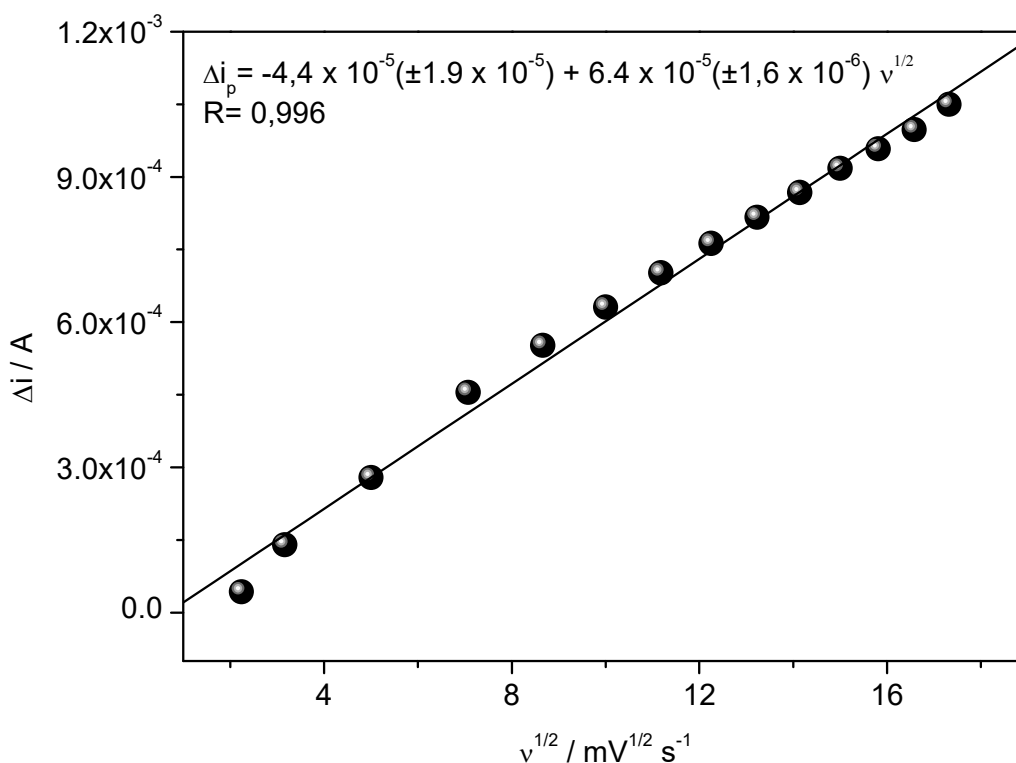
Figura 37. Voltamogramas cíclicos para o sensor em $4,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de cianeto e em diversas velocidades de varredura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com esses experimentos foi possível observar a partir das informações do gráfico que mostram a existência de uma dependência linear entre a corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura em toda a faixa estudada (5 a 300 mV s^{-1}) indicando que a oxidação do 3,4-DCA na superfície do sensor é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo [110] (**Figura 36**).

Figura 38. Variação da corrente de pico anódica (Δi vs $v^{1/2}$) no sensor à base de pasta de carbono modificada com [Cu(II)Pc]. Contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 3,4-DCA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após verificação da eletrooxidação catalítica do sensor proposto utilizando a voltametria cíclica, são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados com o objetivo de otimizar a resposta do sensor para o metabolito 3,4-DCA.

4.2.2. Otimização da resposta do sensor

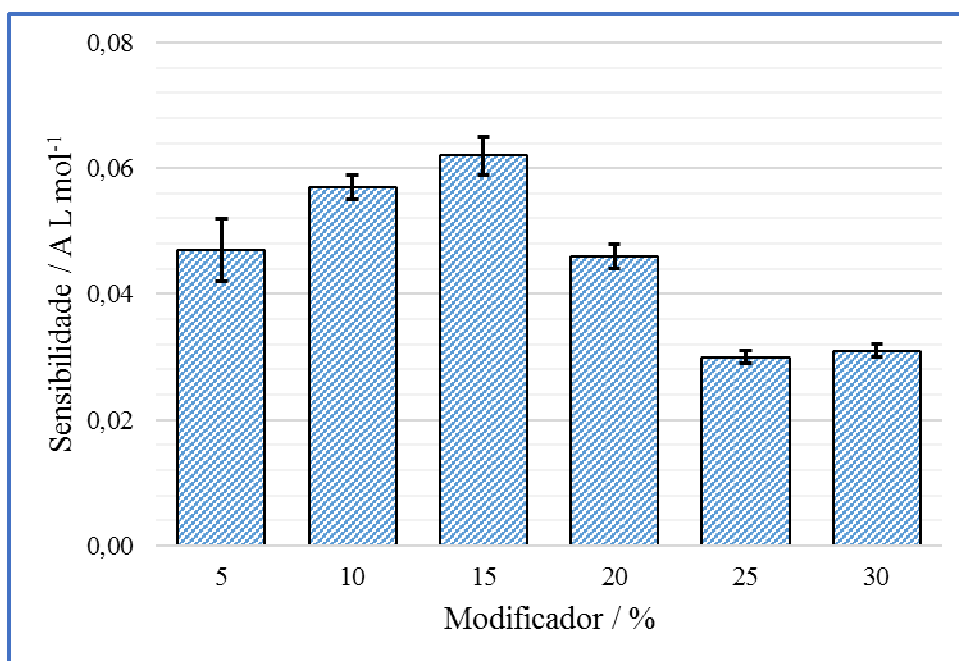
A otimização do sensor para determinação da 3,4-dicloroanilina ocorreu utilizando o planejamento univariado, sendo realizadas as medidas variando apenas um parâmetro enquanto os outros foram fixados. O planejamento univariado foi realizado em triplicata para cada um dos parâmetros, sendo esses separados em duas categorias:

- Parâmetros químicos: Relacionados a preparação do sensor como porcentagem do modificador, a concentração e a natureza da solução tampão bem como o seu pH.
- Parâmetros eletroquímicos: Parâmetros relacionados a voltametria de onda quadrada como frequência da aplicação do potencial; amplitude de pulso; incremento do potencial.

Parâmetros Químicos

O primeiro parâmetro otimizado foi a porcentagem do modificador (**Figura 37**), pode-se perceber que a melhor condição para o parâmetro foi com a utilização de 15% (m/m) do complexo, pois apresentou melhor resposta analítica, assim esta quantidade de complexo foi usada em todos os experimentos posteriores. As maiores porcentagens de modificador não apresentaram uma melhora na sensibilidade na presença do analito, pois com o aumento ocorreu a diminuição do material condutor (grafite), interferindo na sensibilidade da análise.

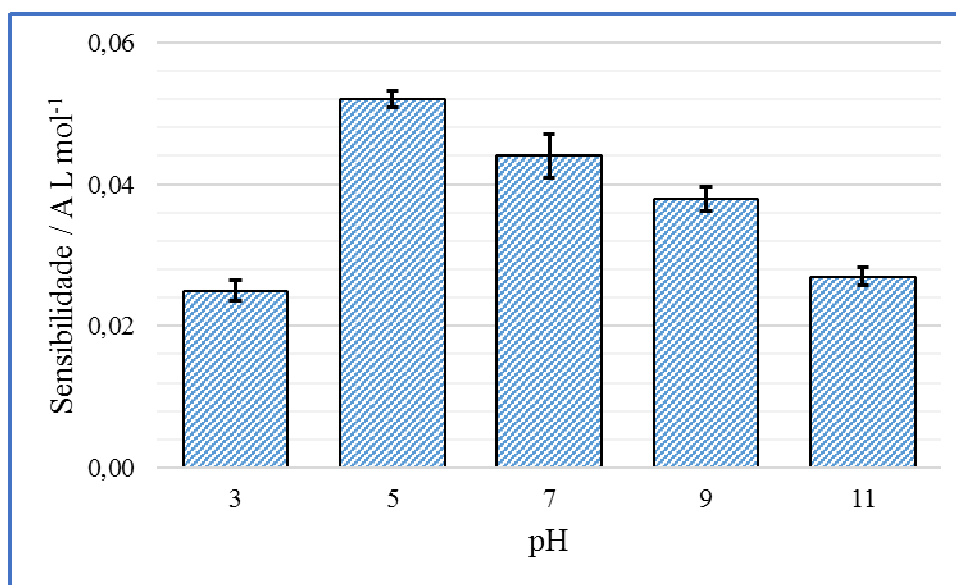
Figura 37. Relação da porcentagem de modificador e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O segundo parâmetro otimizado foi o pH da solução tampão BR com concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 38**), sendo que o maior valor de sensibilidade foi obtido no pH 5,0. Esse valor de pH a reação de dimerização do analito na superfície do eletrodo [49,115].

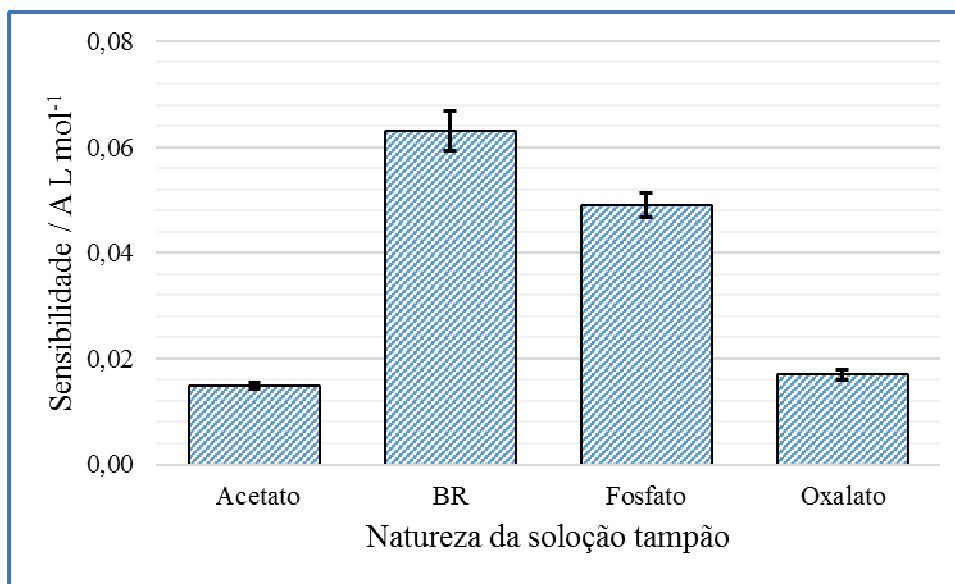
Figura 38. Relação do pH da solução tampão Brittom-Robinson e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O terceiro parâmetro otimizado foi a natureza da solução tampão (**Figura 39**), sendo que foram analisadas as soluções tampão Acetato, Fosfato, Oxalato e Britton-Robinson. O maior valor de sensibilidade obtido foi quando utilizado a solução tampão Britton-Robinson.

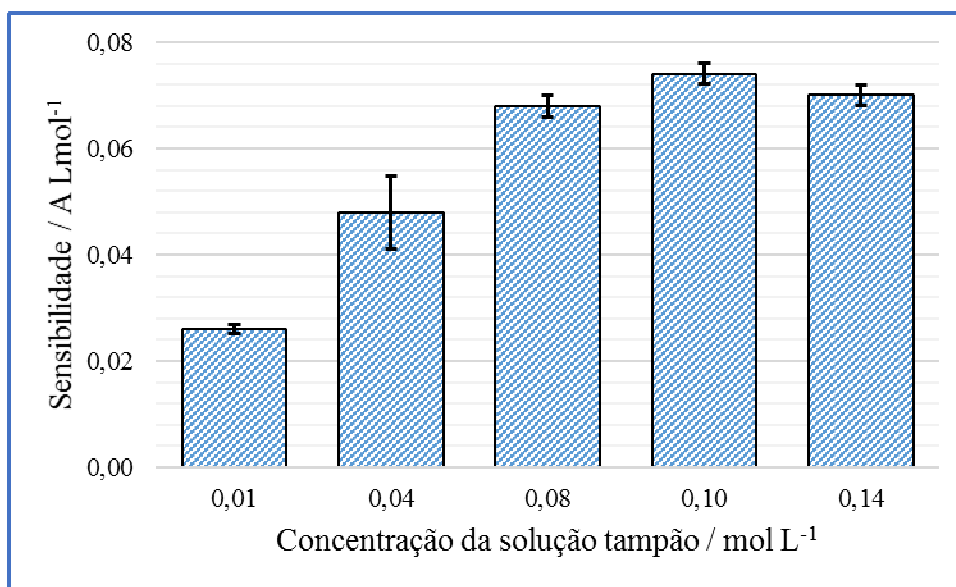
Figura 39. Relação da natureza do eletrólito e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O último parâmetro químico otimizado foi a concentração do tampão Britton-Robinson (**Figura 40**), sendo que a melhor condição para o parâmetro foi a concentração de 0,1 mol L⁻¹.

Figura 40. Relação da concentração da solução tampão Britton-Robinson e a sensibilidade.



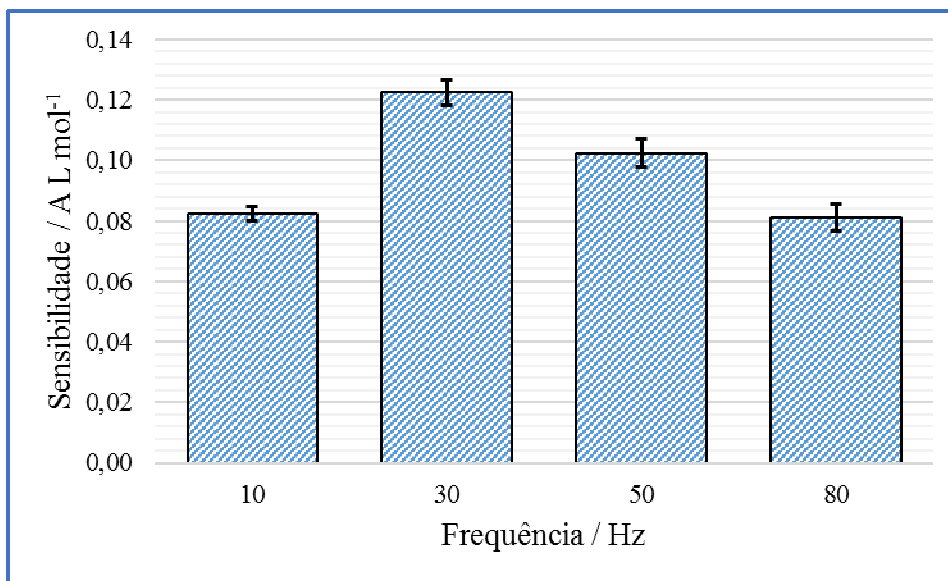
Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetros eletroquímicos

Os parâmetros eletroquímicos estão relacionados com a técnica utilizada para a quantificação do analito, na voltametria de onda quadrada, os parâmetros otimizados foram: a frequência, amplitude e o incremento do potencial.

O primeiro parâmetro otimizado foi a frequência da aplicação do potencial (**Figura 41**), sendo estudadas frequências de 10 Hz a 80 Hz, onde o maior valor de sensibilidade foi obtido com 30 Hz de frequência.

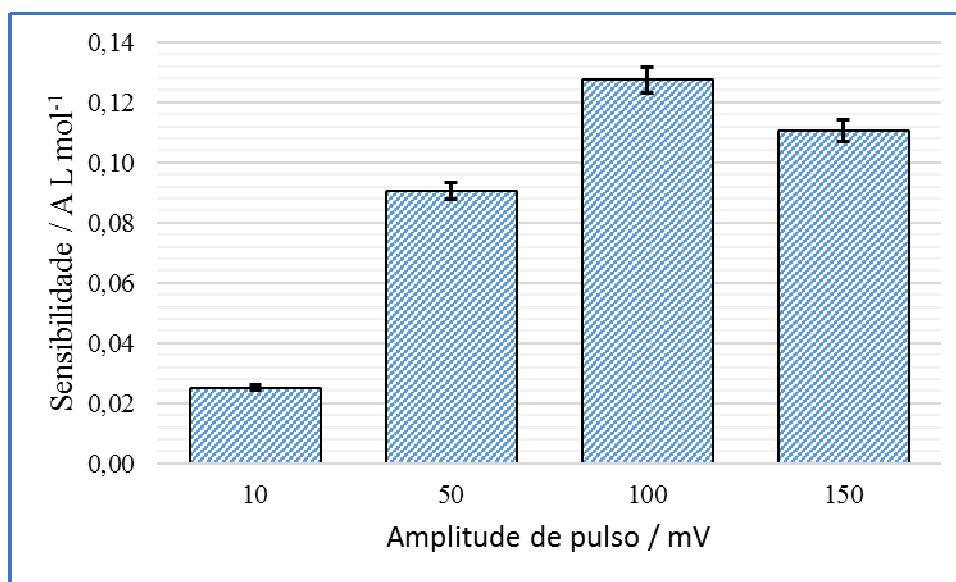
Figura 41. Relação da frequência e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O segundo parâmetro eletroquímico otimizado foi a amplitude de pulso (**Figura 42**), sendo o melhor resultado obtido quando utilizado 100 mV de amplitude.

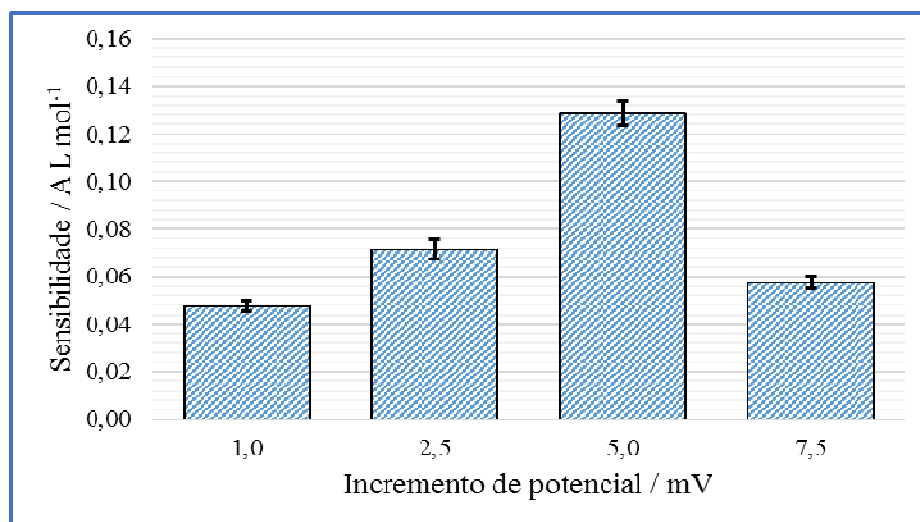
Figura 42. Relação da amplitude de pulso e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O último parâmetro eletroquímico otimizado foi o incremento de potencial (**Figura 43**), sendo o maior valor de sensibilidade obtido em 5,0 mV.

Figura 43. Relação do incremento de potencial e a sensibilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após todos os experimentos realizados, as melhores condições obtidas para o experimento podem ser observadas na **Tabela 11** abaixo:

Tabela 11. Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de 3,4-dicloroanilina.

Variáveis	Melhores condições
Porcentagem de modificador (% m/m)	15
Natureza da solução tampão	Britton-Robinson
Concentração do eletrólito (mol L ⁻¹)	0,1
pH do eletrólito	5,0
Frequência (Hz)	30
Amplitude (mV)	100
Incremento de potencial (mV)	5,0

4.2.3. Perfil de resposta do sensor

Após a otimização dos parâmetros eletroquímicos e químicos a partir do planejamento univariado, foi realizada a voltametria de onda quadrada (**Figura 44**) possibilitando a construção da curva analítica, na qual a corrente é medida após cada adição do analito em relação ao branco no potencial de pico de + 0,900 V (**Figura 45**).

Figura 44. Perfil de resposta do sensor para 3,4-DCA em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento de potencial: 5,0 mV.

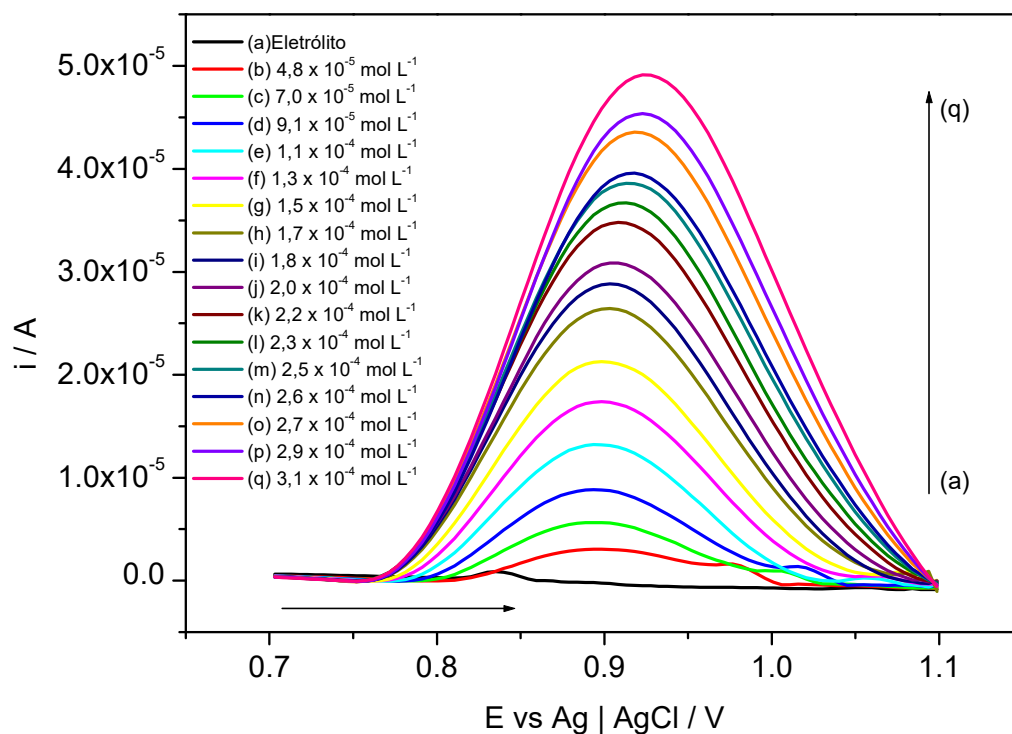
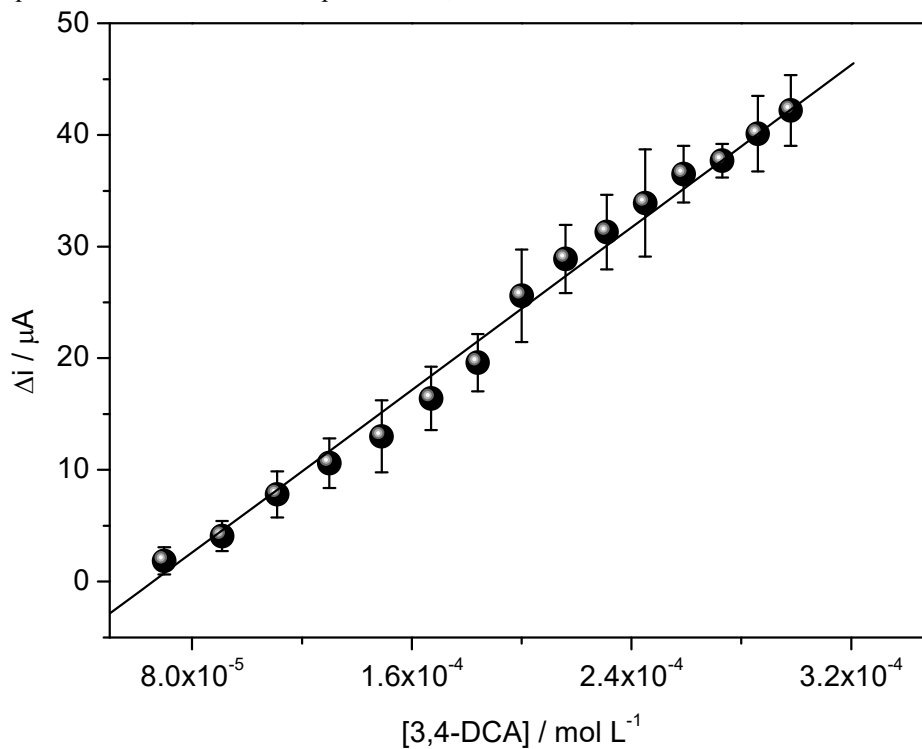


Figura 45. Curva analítica obtida nas condições otimizadas. Solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento potencial: 5,0 mV.



A otimização da pasta de carbono e dos parâmetros para realização das medidas voltamétricas permitiu obter uma faixa linear de resposta de $4,8 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e limites de detecção e quantificação de $1,1 \times 10^{-5}$ e $3,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, os quais foram calculados conforme recomendado pela ANVISA [111]. 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), $3 \times \sigma_a/b$. Já o limite de quantificação (LOQ) [111], foi calculado como 3,3 vezes o valor do LOD ($10 \times \sigma_a/b$).

Uma relação linear ($r = 0,997$) foi obtida pela representação gráfica de Δi versus concentração de 3,4-DCA (mol L⁻¹). A equação da reta que representa os dados da Figura 46 é mostrada na **Equação 2**.

$$\Delta i/\mu A = 12,0 (\pm 0,65) + 181960 (\pm 3660) [3,4 - DCA] \quad \text{Equação 2}$$

Para a verificação da repetibilidade da curva analítica, foram realizados outros experimentos no mesmo dia e em dias diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dia), sendo que os coeficientes de variação obtidos foram de 1,2% e 1,9%, respectivamente. Os resultados apresentados mostraram que as medidas são precisas e satisfatórias por apresentarem bons desvios e um bom coeficiente para a curva analítica. Adicionalmente, foi determinado experimentalmente também o tempo de vida do sensor proposto.

Na **Tabela 12** são mostradas todas as características analíticas apresentadas pelo sensor, avaliado neste trabalho apenas em sistema em batelada.

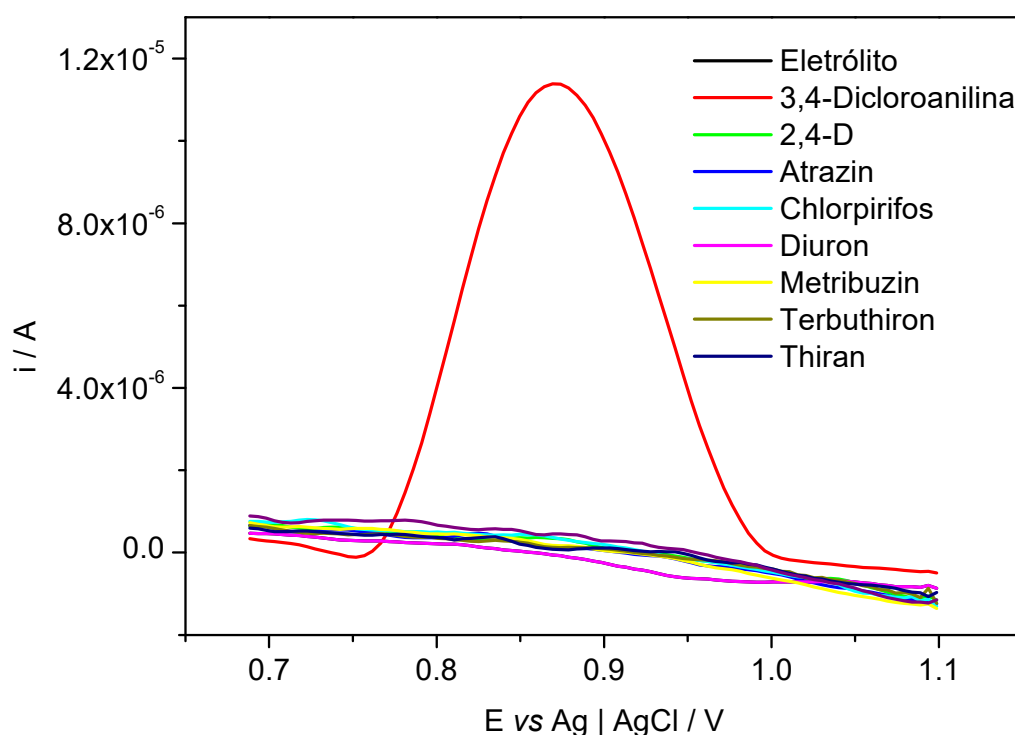
Tabela 12. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação em sistema de batelada.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear	$2,8 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Sensibilidade	$181960 \mu\text{A Lmol}^{-1}$
Coefficiente de Correlação (n=8)	0,997
Limite de detecção	$1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
Limite de quantificação	$3,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
Repetibilidade intra-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	1,2%
Repetibilidade inter-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	1,9%
Tempo de vida mantendo 95% sinal inicial	7 dias (107 medidas)

4.2.4. Estudo de seletividade

Para realizar este estudo, a resposta voltamétrica do sensor foi avaliada para 7 agrotóxicos (**Figura 46**), com diversas estruturas e classificações, além do metabólito do herbicida, 3,4-dicloroanilina. Observa-se que no potencial de medida do analito, nenhum dos 7 compostos estudados apresentaram sinal analítico (**Tabela 13**) e em todas as análises pode-se observar a formação de um pico em + 200 mV, que pode ser atribuído a alguma impureza contida no pó de grafite, pois o surgimento do pico ocorre na pasta sem o complexo, com o complexo e apenas no eletrólito.

Figura 46. Perfil de resposta do sensor para os possíveis interferentes do herbicida 3,4-DCA em voltametria de onda quadrada nas condições otimizadas. Solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, amplitude: 100 mV, frequência: 30 Hz e incremento potencial: 5,0 mV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13. Agrotóxicos analisados para o estudo de possíveis interferentes.

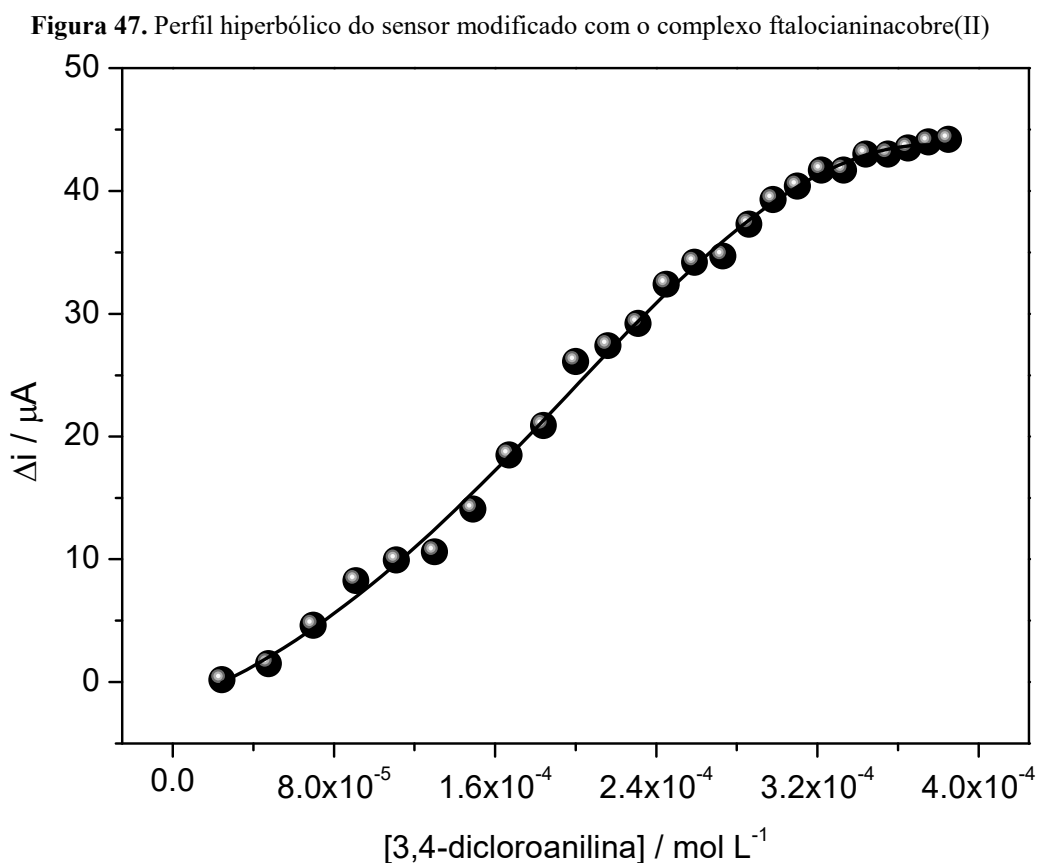
Agrotóxico	Sinal Analítico
2,4-D	n.d
Atrazina	n.d
Clorpirifós	n.d
Diuron	n.d
Metribuzin	n.d
Terbutiron	n.d
Thiran	n.d

n.d = não detectado

Desta forma, estes resultados sugerem que o sensor à base de ftalocianinacobre(II), é seletivo para 3,4-DCA em relação a outros agrotóxicos, tal qual, é esperado para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático. Essa seletividade pode ser atribuída ao complexo e a otimização dos parâmetros químicos e eletroquímicos que favorecem a determinação do 34-DCA.

4.2.5. 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 47**.

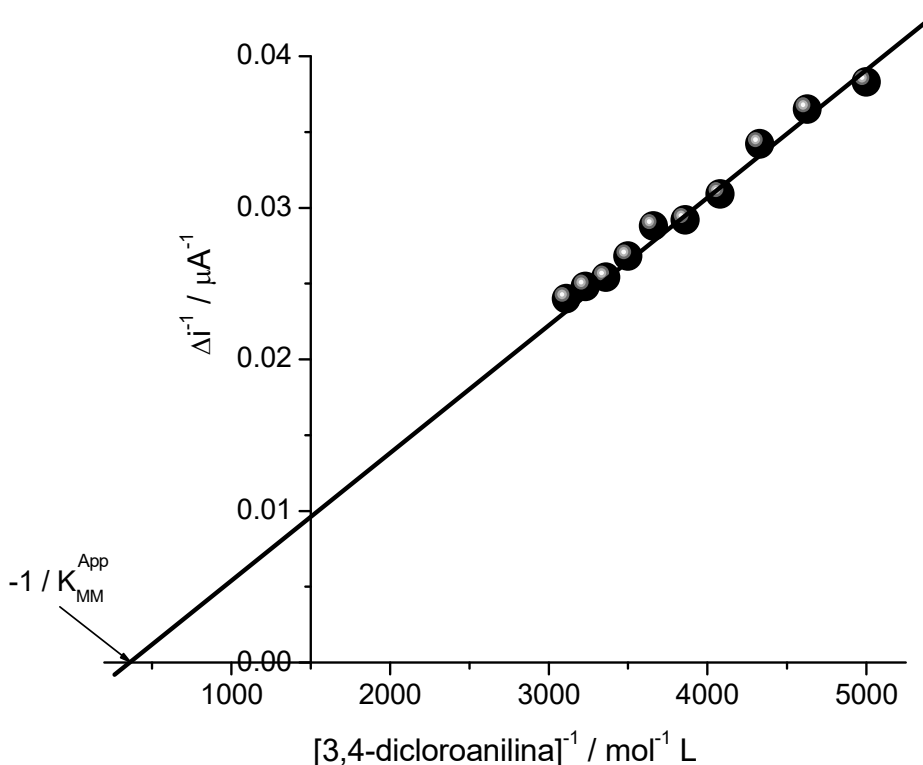


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 47** pode ser verificado um perfil hiperbólico, tal como ocorre no caso dos biossensores enzimáticos, indicando que o complexo na pasta de carbono segue uma cinética do tipo “Michaelis-Menten” [112].

Adicionalmente, ao construir o gráfico de Lineweaver-Burker ou do duplo recíproco (**Figura 48**), foi possível estimar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{App}) [113], a qual apresentou um valor de $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, que é um valor que indica uma forte afinidade [113] do complexo biomimético de cobre pelo “substrato” 3,4-dicloroanilina.

Figura 48. Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 48.

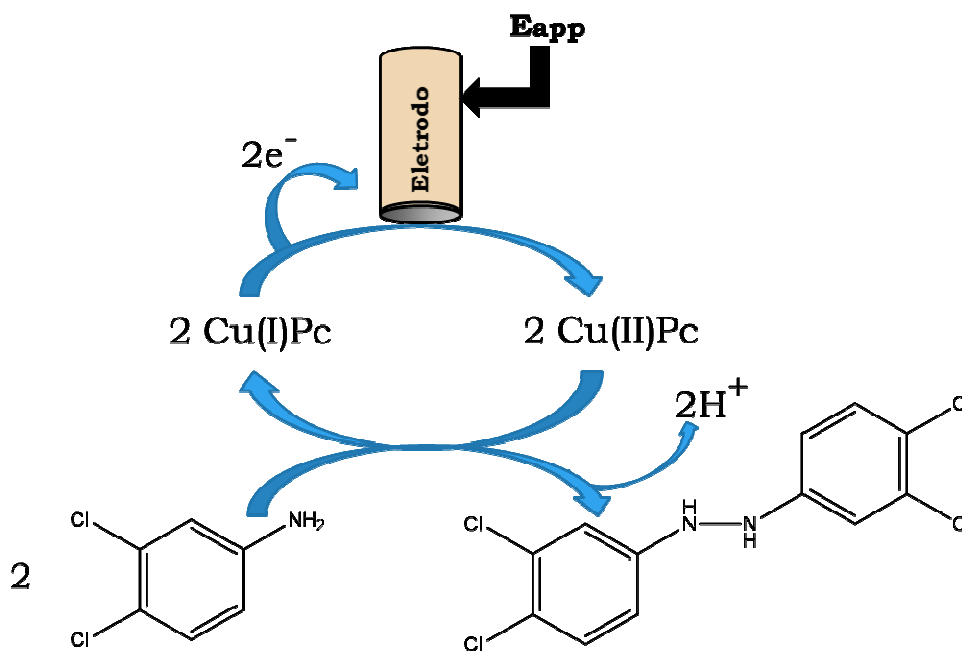


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor

Assim, com base nos resultados obtidos, foi possível propor um mecanismo para o sensor biomimético. Inicialmente, há reação química (etapa química) entre a 3,4-dicloroanilina e o complexo em seu estado oxidado $[\text{Cu(II)Pc}]$, promovendo a oxidação do 3,4-DCA, formando um dímero do 3,4-DCA [49, 115], e a redução de cobre do complexo utilizado como modificador. Na etapa eletroquímica acoplada à química, a oxidação do metal (Cu^+ para Cu^{2+}) sobre a superfície do eletrodo, obtendo-se a corrente observada em função da presença de 3,4-DCA na cela de medida. A **Figura 49** apresenta o mecanismo proposto de forma esquemática.

Figura 49. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.7. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras ambientais (rios)

Determinados os parâmetros de otimização, as características analíticas e os estudos eletroquímicos, aplicou-se o método desenvolvido em amostras de águas de rios. Com o objetivo de avaliar efeitos de matriz foram realizados testes de adição de padrão. Foram construídos gráficos de Δi vs. $[3,4\text{-dicloroanilina}]_{\text{padrão}}$ adicionado, sendo a concentração do herbicida diluída analisada pela extrapolação da curva, na interseção com o eixo das abscissas no lado negativo. O resultado é expresso em mol L^{-1} .

E com o objetivo de validar os resultados obtidos na determinação de 3,4-DCA pelo sensor biomimético proposto, as amostras foram analisadas por um método comparativo baseado em cromatografia líquida de alta eficiência[116]. Na **Tabela 14** estão apresentados os resultados obtidos na análise, pelo sensor proposto e o método comparativo de análise.

Tabela 14. Dados obtidos na recuperação de 3-,4-dicloroanilina em amostras de águas de rios.

Amostras de rios	Método proposto		Método de referência		Teste t ^b
	[3,4-DCA] x 10 ⁻⁴ (mol L ⁻¹) ^a	Recuperação (%)	[3,4-DCA] x 10 ⁻⁴ (mol L ⁻¹) ^a	Recuperação (%)	
Chibarro	1,10 ± 7,8 x 10 ⁻³	92	1,19 ± 1,1 x 10 ⁻⁵	96	1,07
Jacaré Pepira	1,17 ± 7,0 x 10 ⁻⁵	97	1,24 ± 1,1 x 10 ⁻⁶	104	0,83

^a Desvio padrão de três replicatas.

^b Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%, t_{tabelado} = 2,776 (n= 3). Valores obtidos considerando o valor fornecido pelo método comparativo como o verdadeiro.

Para todas as amostras analisadas, os resultados obtidos pelo método comparativo e pelo método proposto foram comparados aplicando-se teste t, com nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de t calculados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa entre os métodos com relação à precisão e exatidão. Os resultados encontrados na recuperação do 3,4-dicloroanilina em amostras de águas de rios, como pode ser visto na **Tabela 14**, 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 para a quantificação do 3,4-dicloroanilina.

5. CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido mostrou eficiência na determinação do íon cianeto, pois apresentou uma faixa linear de resposta de $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, limites de detecção e de quantificação de $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente e resultados satisfatórios em relação a sua sensibilidade, estabilidade e seletividade quando utilizado o complexo $[\text{CoPcF}_{16}]$.

O método analítico para a determinação do metabólito 3,4-dicloroanilina apresentou resultados satisfatórios, com a faixa linear de resposta de $2,8 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, limites de detecção e de quantificação de $11 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente e eficiência em relação a sua sensibilidade, estabilidade e seletividade quando utilizado o complexo $[\text{CuPc}]$.

Os sensores biomiméticos tem-se se tornado uma metodologia de análise vantajosa quando comparado aos biossensores, pois permite monitorar diretamente o analito em uma determinada matriz, apresentando boa eficiência analítica. Ambos os métodos desenvolvidos quando comparados aos métodos convencionais, também apresentaram características vantajosas, como a possibilidade de construção de sensores portáteis a um baixo custo, que o torna bastante viável, além da robustez, seletividade, sensibilidade e estabilidade. Os dois métodos desenvolvidos são interessantes do ponto de vista da Química Verde, pois oferecem vantagens relacionadas principalmente à simplicidade, rapidez e baixo consumo de reagentes e solventes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ Sintetizar o polímero impresso com íon (IIP) para o íon cianeto e sintetizar o polímero molecularmente impresso (MIP) para o metabólito 3,4-Dicloroanilina;
- ❖ Otimizar a síntese do IIP e do MIP;
- ❖ Realizar os estudos de religação, seletividade e aplicação em amostras de interesse ambiental do IIP e MIP;
- ❖ Imobilizar os polímeros desenvolvidos em fibras ópticas;
- ❖ Acoplar as fibras ópticas desenvolvidas ao espectrofotômetro para o desenvolvimento dos sensores ópticos;
- ❖ Verificar eficácia do sensor biomimético óptico com IIP e MIP imobilizados na aplicação em amostras de interesse ambiental.

Referências

- 1 AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil - 2013**. Brasília, DF, 2013, 434 p.
- 2 AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil - informe 2016**. Brasília, DF, 2016, 97 p.
- 3 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 357 de 17 março de 2005. A classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://portalpnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20357.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2017.
- 4 FIELD, J. A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3897-3902, 1997.
- 5 CIMINELLI, V. S. T.; GOMES, A. D. G. Princípios da cianetação. In: TRINDADE, R. B. E.; BARBOSA FILHO, O. (Ed.). **Extração do ouro: princípios, tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2002. Cap. 3, p. 51-82.
- 6 POMBO, F. R. **Eletrorrecuperação de cobre e oxidação de cianeto de efluentes cianídricos diluídos**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- 7 SOUZA, V. P.; LINS, F. A. F. **Recuperação do ouro por amalgamação e cianetação: problemas ambientais e possíveis alternativas**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 1989. 26 p. (Tecnologia mineral, 44).
- 8 MA, J.; DASGUPTA, P. K. Recent developments in cyanide detection: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, p. 117-125, 2010.
- 9 PETTERSEN, J. C.; COHEN, S. D. The effects of cyanide on brain mitochondrial cytochrome oxidase and respiratory activities. **Journal of Applied Toxicology**, v. 13, p. 9-14, 1993.
- 10 PONCE, M. J. S. G. **Determinação cinética de cianeto livre pelo monitoramento espectrofotométrico da reação de o-dinitrobenzeno com p-nitrobenzaldeído**. 2004. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 11 JACOBS, M. B. **The analytical of toxicology of industrial poisons**. New York: Interscience, 1967. 943 p.
- 12 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 430 de 13 maio de 2011. Padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 11 jul. 2017.

- 13 MA, J.; DASGUPTA, P. K. Recent developments in cyanide detection: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, p. 117-125, 2010.
- 14 WANG, Y.; XU, X.; LONG, J.; LUO, Y. The determination of cyanide in water by automatic distillation pretreatment. **Zhongguo Huanjing Jiance**, v. 32, p. 94-97, 2016.
- 15 SUN, J.; ZHANG, Y.; HU, E. Determination of cyanide in oily wastewater by hexane extraction and continuous flow spectrophotometry. **Huaxue Fenxi Jiliang**, v. 24, p. 68-71, 2015.
- 16 SURLEVA, A.; ZAHARIA, M.; PINTILIE, O.; GRADINARU, R. Improved ninhydrin-based reagent for spectrophotometric determination of ppb levels of cyanide. **Environmental Forensics**, v. 17, p. 48-58, 2016.
- 17 CAI, X.; ZHONG, L. K.; DING, J. G. Improvement of the preparation method of chloramine T for determination of cyanide in water. **Zhongguo Weisheng Jianyan**, v. 25, p. 600-601, 2015.
- 18 YU, H. Discussion on the error and improvement of determination of cyanide in water by isonicotinic acid-barbituric acid spectrophotometry. **Guangdong Huagong**, v. 41, p. 215-217, 2014.
- 19 DESTANOGLU, O.; GUMUS-YILMAZ, G. Determination of cyanide, thiocyanate, cyanate, hexavalent chromium, and metal cyanide complexes in various mixtures by ion chromatography with conductivity detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 39, p. 465-474, 2016.
- 20 LU, Y. T. Determination of cyanide in plating waste water by ion chromatography with electrochemical detector. **Guangzhou Huagong**, v. 42, p. 156-158, 2014.
- 21 LI, H.; SUZUKI, T.; FUJISAWA, K. Determination of cyanide in wastewater by ion chromatography. **Kogyo Yosui**, v. 621, p. 70-74, 2013.
- 22 LONG, S. Q.; ZHONG, Z. J.; HUI, Y. Q.; ZHENG, C. X.; LIANG, X. Determination of cyanide in water by ion chromatography with direct amperometric detector. **Huanjing Yu Jiankang Zazhi**, v. 26, p. 719-720, 2009.
- 23 HAN, S.; WANG, J.; JIA, S. Turn-off-on chemiluminescence determination of cyanide. **Luminescence**, v. 30, p. 38-43, 2015.
- 24 GAVRILOV, A. V.; DRUZHININ, A. A.; ZAKHAROV, K. I.; ISHUTIN, V. A.; NEMKOV, S. A.; PUSHKIN, I. A. Chemiluminescence determination of cyanide ions. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1029-1034, 2005.
- 25 MIRMOHSENI, A.; ALIPOUR, A. Construction of a sensor for the determination of cyanide in industrial effluents: a method based on quartz crystal microbalance. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 84, p. 245-251, 2002.

- 26 NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; HOSSEINI, S. N. Indirect determination of cyanide by single-line flow injection analysis-flame atomic absorption spectrometry using zinc carbonate solid-phase reactor. **Chemia Analityczna**, v. 51, n. 2, p. 285-293, 2006.
- 27 GHANAVATI, M.; AZAD, R. R.; MOUSAVI, S. A. Amperometric inhibition biosensor for the determination of cyanide. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 190, p. 858-864, 2014.
- 28 NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A. Determination of cyanide in wastewaters using modified glassy carbon electrode with immobilized silver hexacyanoferrate nanoparticles on multiwall carbon nanotube. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 255-261, 2011.
- 29 ABBASPOUR, A.; ASADI, M.; GHAFFARINEJAD, A.; SAFAEI, E. A selective modified carbon paste electrode for determination of cyanide using tetra-3,4-pyridinoporphyrazinatocobalt(II). **Talanta**, v. 66, p. 931-936, 2005.
- 30 SAFAVI, A.; MALEKI, N.; SHAHBAAZI, H. R. Indirect determination of cyanide ion and hydrogen cyanide by adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 213-221, 2004.
- 31 SHAMSIPUR, M.; KARIMI, Z.; TABRIZI, M. A. A novel electrochemical cyanide sensor using gold nanoparticles decorated carbon ceramic electrode. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 485-489, 2017.
- 32 UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World population prospects: the 2017, key findings and advance tables. New York, 2017. Working paper nº ESA/P/WP/248. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- 33 ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **FAO DISCUTE DEMANDA MUNDIAL POR ALIMENTOS**. DISPONÍVEL EM: <<http://www.fao.org.br/FAOddma.asp>>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- 34 RAGSDALE, N. N. The impact of the food quality protection act on the future of plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 577-596, 2000.
- 35 RICE, P. J.; RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5367-5376, 2007.
- 36 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 Chemistry**, v. 107, p. 1342-1347, 2008.

- 37 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 Additives & Contaminants**, v. 25, p. 444-457, 2008.
- 38 D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.
- 39 PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**. 4. ed. Campinas: Millennium, 2013. 283 p.
- 40 BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 319 p.
- 41 BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petropolis: Vozes; Oxfam; Fase, 1986. 235 p.
- 42 PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-31, 2012
- 43 BRASIL. Ministério do meio ambiente. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 29 jul. 2017.
- 44 BRASIL. Ministério do meio ambiente. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, BRASÍLIA, DF, 12 DE JUL. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 29 jul. 2017.
- 45 MOREIRA, F. P. J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. 384 p.
- 46 CANTARUTTI T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- 47 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVAVEIS. **Portaria normativa nº 84, de 15 out. de 1996**. Brasília, DF, 1996. Disponível em: <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2017.
- 48 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diurom**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/d25.pdf/d2fba0ca-e882-4264-a50e-57077bdd58ea>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

49 WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H,31H-phthalocyanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 83-88, 2013.

50 RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**: contribuição para o uso em plantio direto e convencional. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 2005. 468 p.

51 OLIVEIRA JUNIOR, R. S. **Biologia e o manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. 348 p.

52 BACIGALUPO, M. M. A.; MERONI, G. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3823-3828, 2007.

53 CEDERLUND, H.; BORJESSON, E.; ONNEBY, K.; STENSTROM, J. Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 39, p. 473-484, 2007.

54 FERDANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F.; KEMPINAS, W. G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, n. 23, p. 106-112, 2007.

55 FREITAS, J. S.; KUPSCO, A.; DIAMANTE, G.; FELICIO, A. A.; ALMEIDA, E. A.; SCHLENK, D. Influence of temperature on the thyroidogenic effects of diuron and its metabolite 3,4-DCA in tadpoles of the american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 23, p. 13095-13104, 2016.

56 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 838 p.

57 MARUYAMA, M. Determination of trace amounts of 3,4-dichloroaniline by high-performance liquid-chromatography with amperometric detection and its application to pesticide-residue analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 343, p. 890-892, 1992.

58 MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Otimização de um método de extração ultra-sônica e análise por CLAE para determinação de diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.

59 MULLER, L.; FATTORE, E.; BENFENATI, E. Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 791, p. 221-230, 1997.

60 WITTKE, K.; HAJIMIRAGHA, H.; DUNEMANN, L.; BEGEROW, J. Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 755, p. 215-228, 2001.

- 61 HORI, Y.; NAKAJIMA, M.; FUJISAWA, M.; SHIMADA, K.; HIROTA, T.; YOSHIOKA, T. Simultaneous determination of propanil, carbaryl and 3,4-dichloroaniline in human serum by HPLC with UV detector following solid phase extraction. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 122, p. 247-251, 2002.
- 62 WEISS, T.; ANGERER, J. Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 778, p. 179-192, 2002.
- 63 GATIDOUA, G.; KOTRIKLAA, A.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKASA, T. D. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, p. 89-99, 2005.
- 64 PENG, J. F.; LIU, J. F.; JIANG, G. B.; TAI, C.; HUANG, M. J. Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 3-6, 2005.
- 65 YOUNG, A.; LAI, G.; HUNG, B.; YUEN, A.; HE, Y. Determination of trace chloroanilines in environmental water samples using hollow fiber-based liquid phase microextraction. **Chromatographia**, v. 74, p. 83-88, 2011.
- 66 MARAGOU, N. C.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A. Optimization and comparison of ESI and APCI LC-MS/MS methods: a case study of irgarol 1051, diuron, and their degradation products in environmental samples. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1826-1839, 2011.
- 67 FELICIO, A. L. S. M.; MONTEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. B.; MADEIRA, T. B.; NIXDORFAND, S. L.; YABE, M. J. S. Validation of a liquid chromatography ultraviolet method for determination of herbicide diuron and its metabolites in soil samples. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1235-1241, 2016.
- 68 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Journal Pure and Applied Chemistry**, v. 63, p. 1247-1250, 1991.
- 69 ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- 70 WANG, J. **Analytical electrochemistry** 3rd. ed. Hoboken: Wiley-VCH, 2006. 272 p.
- 71 GRUNDLER, P. **Chemical sensors: an introduction for scientists and engineers**. Berlin: Springer, 2007. 274 p.
- 72 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

- 73 CRESPILO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, 2004.
- 74 PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- 75 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 8. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 1124 p.
- 76 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- 77 BARD, A. J.; FAULKNER, R. D. **Electrochemical methods**: fundamental and applications. 2nd ed. NewYork: Wiley, 2001. 833 p.
- 78 FREIRE, R. S.; DURÁN, N. L.; KUBOTA, T.; Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, v. 54, p. 681-686, 2001.
- 79 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 2, p. 215-223, 2002.
- 80 CHOU, L. C. S.; LIU, C. C. Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection. **Sensors and Actuators B**, v. 110, p. 204-208, 2005.
- 81 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Tris (2,2'-bipyridil) copper(II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in amperometric sensor construction. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 855-865, 2003.
- 82 YE, L.; HAUPT K. Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1887-1897, 2004.
- 83 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a nafion membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 536, n. 1, p. 71-81, 2002.
- 84 KATAKY, R.; MORGAN, E. E. Potential of enzyme mimics in biomimetic sensors: a modified-cyclodextrin as a dehydrogenase enzyme mimic. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 1407-1417, 2003.
- 85 BATISTA, L. 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 carbono paste with iron tetrapyridinoporphyrazine. **Analyst**, v. 133, n. 12, p. 1692-1699, 2008.

- 86 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. *Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos*. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.
- 87 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L.T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors**. New York: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195-210.
- 88 GU, Y.; YAN, X.; LIU, W.; LI, C.; CHEN, R.; TANG, L.; ZHANG, Z.; YANG M. Biomimetic sensor based on copper-poly(cysteine) film for the determination of metronidazole. **Electrochimica Acta**, v. 152, p. 108-116, 2015.
- 89 LING, P.; HAO, Q.; LEI, J.; JU, H. Porphyrin functionalized porous carbon derived from metal-organic framework as biomimetic catalyst for electrochemical biosensing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 1335-1341, 2015.
- 90 SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2841-2887, 1996.
- 91 KALGUTKAR, A. S.; OBACH, R. S.; MAURER, T. S. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interaction and idiosyncratic adverse drug reactions. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 407-447, 2007.
- 92 ABASS, K.; TURPEINEN, M.; RAUTIO, A.; HAKKOLA, J.; PELKONEN, O. Metabolism of pesticides by human cytochrome P450 enzymes in vitro - a survey. In: PERVEEN, F. (Ed.). **Insecticides: advances in integrated pest management**. Rijeka: InTech, 2012. Chap. 8, p. 165-194.
- 93 ABASS, K.; REPONEN, P.; TURPEINEN, M.; JALONEN, J.; PELKONEN, O. Characterization of diuron N-demethylation by mammalian hepatic microsomes and cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 9, p. 1634-1641, 2007.
- 94 ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1576, 1958.
- 95 CRESPILOHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, 2004.
- 96 SHAIDAROVA, L. G.; ZIGANSHINA, S. A.; MEDYANTSEVA, E. P.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric cholinesterase biosensors with carbon paste electrodes modified with cobalt phthalocyanine. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 241-248, 2004.
- 97 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.

- 98 SHIH, Y.; ZEN, J. M.; KUMAR, A. S.; CHEN, P. Y. Flow injection analysis of zinc pyrrhione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, v. 62, p. 912-917, 2004.
- 99 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. **Analytical Letters**, v. 41, n. 6, p. 1010-1021, 2008.
- 100 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. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 654, n. 1/2, p. 8-12, 2011.
- 101 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. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 1, p. 3988-3995, 2011.
- 102 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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 8, p. 3103-3111, 2010.
- 103 RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Electroanalytical determination of bumetanide employing a biomimetic sensor for detection of doping in sports, **Analytical Methods**, v. 6, p. 5792-5798, 2014.
- 104 BONI, A. C.; SOTOMOMAYOR, M. D. P. T.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Application of a biomimetic sensor based on iron phthalocyanine chloride: 4-methylbenzylidene-camphor detection, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1377-1383, 2010.
- 105 GOBATTO, D. F.; WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v. 3, p. 98-107, 2010.
- 106 OUYANG, J.; SHIGEHARA, K.; YAMADA, A.; ANSON, F. C.; Hexadecafluoro- and octacyano phthalocyanines as electrocatalysts for the reduction of dioxygen. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 291, p. 489-498, 1991.
- 107 SONG, C.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; WILKINSON, D. P.; BAKER, R. Temperature dependence of oxygen reduction catalyzed by cobalt fluoro-phthalocyanine adsorbed on a graphite electrode. **Fuel Cells**, v. 1, p. 9-15, 2007.
- 108 SAPLING LEARNING, **Standard reduction potentials at 298 K**. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/chempendix/potentials>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

- 109 ARELLANO, M. T. C. **Tratamento de efluentes contendo cianeto por oxigênio singlete gerado através da reação de peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- 110 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 93, n. 2, p. 163-168, 1978.
- 111 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução -RE nº 899, de 29 de maio de 2003. 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: 18 ago. 2017.
- 112 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 975 p.
- 113 BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J.; GRABL, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3. ed. Weinheim: Chemie, 1983. v. 1, 86 p.
- 114 LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 1999. 544 p.
- 115 MUGADZA, T.; NYOKONG, T. Facile electrocatalytic oxidation of diuron on polymerized nickel hydroxo tetraamino-phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 81, p. 1373-1379, 2010.
- 116 FRANCO, S. **Otimização, validação e aplicação de método para análise de diuron e seus metabólitos em urina de ratos utilizando SPE e HPLCDAD**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.