



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**GRUPO DE ELETROQUÍMICA E CORROSÃO**

**FRANCISCO WIRLEY PAULINO RIBEIRO**

**SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS: FERRAMENTAS VERSÁTEIS**  
**PARA A DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS**

**FORTALEZA**

**2014**

FRANCISCO WIRLEY PAULINO RIBEIRO

SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS: FERRAMENTAS VERSÁTEIS PARA  
A DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Tese de Doutorado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia

**FORTALEZA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- R369s      Ribeiro, Francisco Wirley Paulino.  
              Sensores e biossensores eletroquímicos: ferramentas versáteis para a determinação de  
contaminantes ambientais / Francisco Wirley Paulino Ribeiro. – 2014.  
              209 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de  
Química Analítica e Físico-Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.  
              Área de Concentração: Química Analítica.  
              Orientação: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia.
1. Pesticidas. 2. Monitoramento ambiental. 3. Química analítica. I. Título.

---

CDD 545

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

*Francisco Wirley Paulino Ribeiro*  
Francisco Wirley Paulino Ribeiro

Tese aprovada em: **30/07/2014**

*Adriana Nunes Correia*  
Dra. Adriana Nunes Correia  
(Orientadora - UFC)

*Djenaine de Souza*  
Dra. Djenaine de Souza  
(UFU)

*Helena Becker*  
Dra. Helena Becker  
(UFC)

*Lúcia Helena Mascaro*  
Dra. Lúcia Helena Mascaro  
(UFSCar)

*Pedro de Lima Neto*  
Dr. Pedro de Lima Neto  
(UFC)

Dedico este trabalho à minha esposa, Tatiane, minha Mãe, Eliane, irmã, Arlene, e ao meu sobrinho Ray, pelo amor, carinho, atenção, abraços e sorrisos, oferecidos a mim espontaneamente.

## AGRADECIMENTOS

Ao SENHOR DEUS por ter sido fiel em minha vida e por nunca ter me deixado só, tanto em dias bons como em dias de grandes tempestades. Por ter feito por mim o que ninguém neste mundo poderia fazer (*Então, respondeu Jó ao SENHOR e disse: Bem sei eu que tudo podes, e nenhum dos teus pensamentos pode ser impedido. Jó 42.1,2*).

À minha esposa, Tatiane Santos Rocha Ribeiro por confiar, acreditar em mim e por ser a maior incentivadora para que eu pudesse ter chegado até aqui, e por continuar me apoiando para seguir em frente.

À minha mãe, Maria Eliane Paulino Ribeiro que sempre foi uma guerreira, pois diante de todas as adversidades não baixou sua cabeça, mas sempre lutou com vigor pelo o melhor para mim. Ao meu pai, José Arlei Façanha Ribeiro, na sua presença sorri, em sua ausência chorei e sofri, mas também aprendi a lutar, acreditar e sonhar. (*“Pai, Você foi meu herói, meu bandido, Hoje é mais, muito mais que um amigo...”*).

À minha irmã, Maria Arlene e ao meu sobrinho Carlos Ray que me fizeram sentir como um pai.

À Profa. Dra. Adriana Nunes Correia (minha mãe científica), pela orientação, ensinamentos, conselhos, oportunidades, apoio e confiança. Sempre serei grato por sua dedicação e por acreditar que eu tinha potencial para chegar longe profissionalmente, pois viu meus passos acadêmicos, conhece um pouco da minha história de vida. Muito obrigado!!!

Ao Prof. Dr. Pedro de Lima Neto pela confiança, amizade e pelos ricos ensinamentos transmitidos ao longo destes anos, tanto no GELCORR, como em sala de aula, pois considerando graduação e pós-graduação fui seu aluno em 7 disciplinas.

Ao órgão CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil, processo: 142663/2010-7), pelo apoio financeiros concedido, na modalidade doutorado no país. Aos órgãos CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) e FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia - Portugal) pelo apoio financeiro concedido, na modalidade doutorado sadiúche, por meio do projeto CAPES/FCT nº 313/11.

A todos do Grupo de Reacções de Análises Químicas (GRAQ), que foram bastante atenciosos comigo no período que estive no Instituto Superior de Engenharia do Porto, em especial, à minha orientadora em Portugal, Profa. Dra. Simone Barreira Morais, pela receptividade, amizade e valiosos ensinamentos.

À Profa. Dra. Cristina Delerue-Matos, bem como à pós-doutoranda Maria de Fátima Barroso, que prestaram grande contribuição ao desenvolvimento e aprimoramento das minhas pesquisas, amizade, conselhos e atenção. Ao pesquisador Dr. Subramanian Viswanathan pelas discussões científicas.

Aos amigos que fiz em Portugal (Marta, José Luiz, Paulinha, Elizabeth, Fátima, Luisa, Isabel Silva, Isabel, Idalina, Filipa, Hélder, Nélia, Nelson, Maria Freitas, Henri, Andréia, Rebeca, Simão, Ivo, Ivone, Abel, Visu, Alexandra, Virgínia, Suzana Machado e Tomás), por todo o apoio, companherismo, amizade e sorrisos.

Às Profas. Dra. Helena Becker e Dra. Elisane Longhinotti pelas críticas e sugestões aos meus trabalhos, bem como pelas novas parcerias estabelecidas.

À Profa. Dra. Djenane de Souza, por todas as lições sobre Eletroanalítica, pela amizade, incentivo, apoio e grande contribuição aos meus trabalhos.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, que sempre esteve disponível para o esclarecimento de dúvidas.

Ao Laboratório de Química Ambiental da Universidade Federal do Ceará e em especial à Profa. Dra. Helena Becker pelas medidas de UV-Vis.

Ao Laboratório de Análises de Traços da Universidade Federal do Ceará e em especial ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, bem como ao doutorando André Gadelha pelas medidas de CLAE.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da Universidade Federal de São Carlos e em especial à Profa. Dra. Lúcia Helena Mascaro, bem como ao doutorando Francisco Willliam de Souza Lucas pelas medidas de MEV-EC e de espectroscopia Raman.

A todos os amigos que conheci no GELCORR: Alan, Allan Nilson, Amanda, Andressa, Artur, Alexander, Avelino, Célia, Cristiane, Dejane, Diego, Évilyn, Fernandes, Gerson, Gisele, Gustavo, Jammile, Jefferson, Josenir, Júnior, Kammyla, Leandro, Lemuel, Leonardo, Luanna, Milton, Moisés, Nathalie, Othon, Naftali, Rafael, Ramon, Regilany, Régis, Roger, Sâmeque, Sanderlir, Thiago, Thisiania, Vanessa e Willian. E em especial aos amigos Rafael e Naftali, pela grande amizade.

Aos meus colegas de turma da graduação, que são bons amigos: J.Junior, Leandro, Paulo, Luciana, Bárbara, Cleane e Gilmara.

A todos os meus professores da Escola Oscar de Azevedo e Sá, Flávio Portela Marcílio e Osmira Eduardo de Castro (Ensino Fundamental), José Alexandre (Ensino Médio) e Universidade Federal do Ceará (Graduação e Pós-Graduação) que contribuíram para minha formação.

Aos Profs. Adalberto Vieira dos Anjos e Francisco José Martins Filho, que me ajudaram, apoiaram e incentivaram quando decidi prosseguir meus estudos.

Aos Presbíteros José Levi, Moisés Bezerra e Francisco Soares, que sempre me ensinaram a confiar no Senhor em todos os momentos e andar conforme ensina a palavra de Deus. A todos os meus irmãos na fé da Assembleia de Deus que sempre oraram por mim.

À amiga e quase mãe Antonieta por ter sido a pessoa que muito ajudou a mim e à minha família, bem como ao amigo David de Oliveira por todas as palavras de incentivo.

A todos as pessoas da comunidade onde moro, que me deram palavras de incentivo. Além do mais, adotaram a minha trajetória de vida e conquistas como exemplo de motivação para lutarem pelos seus objetivos e sonhos.

*Filho meu, não te esqueças da minha lei, e o teu coração guarde os meus mandamentos. Porque eles aumentarão os teus dias e te acrescentarão anos de vida e paz. Não te desamparem a benignidade e a fidelidade; ata-as ao teu pescoço; escreve-as na tábua do teu coração. E acharás graça e bom entendimento aos olhos de teu DEUS e do homem. Confiar no SENHOR de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas. Não seja sábio a teus próprios olhos; teme ao SENHOR e aparta-te do mal.*

*Provérbios 3.1-7*

Feliz o ser humano que admite: preciso aprender! Isso traz alívio à sua alma. Feliz o ser humano, que depois de admitir, busca aprender...

Viver significa subir uma escada rolante pelo lado que desce... Ficar parado significa retroceder. Então, primeiramente, temos que lutar para ficarmos na mesma posição da escada, mas sempre olhando para o alto, e com muita força, dedicação, humildade, trabalho e com fé chegar ao próximo nível.

*“Sonhe! Ouse sonhar!*

*Você nunca irá além dos seus sonhos.”*

Pr. Marcos Feliciano

*“Temos de ser fortes e corajosos, fazer tudo*

*que tiver ao nosso alcance e confiar em Deus”*

Anne Frank

*“Na emoção que estou sentindo, Eu vejo a mão  
de Deus, Em saber que estão me ouvindo, Eu  
vejo a mão de Deus, Vejo a mão de Deus.*

*O sol nasceu, o sol se pôs, Fica a mão do Mestre  
O ano vem, o ano vai, Fica a mão do Mestre  
Sobre nós a proteger, Sobre todos posso ver  
Vejo a mão de Deus, Sinto a mão de Deus.”*

Cristina Mel

## RESUMO

No presente trabalho apresentou-se o emprego de sensores e de biossensores eletroquímicos para a determinação dos pesticidas endossulfam (EDS), tiabendazol (TBZ) e cloridrato de formetanato (FMT) em amostras de cana-de-açúcar, tomate, manga, uva e águas naturais. Além disso, informações acerca do mecanismo redox dos pesticidas EDS, TBZ e FMT também foram apresentadas. Os sensores consistiram em eletrodos de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*), de diamante dopado com boro (EDDB) e de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados e ftalocianina de cobalto (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%). Para os biossensores, a enzima Lacase (Lac) foi imobilizada pelo método de ligações cruzadas sobre ouro previamente modificado com nanopartículas de ouro (Au/NpAu/Lac-Glu.2%) e sobre eletrodo modificado com NTCPMF-FcCo (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%). A redução do EDS foi regida por processo quase-reversível. TBZ sofreu oxidação irreversível sobre EDDB e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%. FMT sobre EDDB apresentou oxidação irreversível do tipo químico-eletroquímico. No entanto, mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico foi observado para FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, totalizando quatro processos de oxidação (um irreversível, dois quase-reversíveis e um reversível). Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados foram: LD = 0,121 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,406 mg kg<sup>-1</sup> (EDS sobre HMDE), LD = 0,074 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,247 mg kg<sup>-1</sup> (EDS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%), LD = 0,052 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,177 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ sobre EDDB), LD = 0,019 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,064 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%), LD = 0,094 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,311 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%), LD = 0,094 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,314 mg kg<sup>-1</sup> (FMT sobre EDDB), LD = 0,025 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,083 mg kg<sup>-1</sup> (FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%), LD = 0,088 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,299 mg kg<sup>-1</sup> (FMT sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2%). Estes valores estão de acordo com os limites máximos de resíduos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para os pesticidas EDS, TBZ e FMT (0,01 a 10,0 mg kg<sup>-1</sup>). Os valores dos percentuais de recuperação calculados variaram de 70,89 a 117,32%, com desvio padrão relativo entre 0,18 e 7,58%. Portanto, os resultados obtidos comprovaram que as metodologias eletroanalíticas desenvolvidas podem ser consideradas alternativas promissoras para a determinação de pesticidas em matrizes alimentares e ambientais.

**Palavras-chave:** Pesticidas, Sensores, Biossensores, Eletroanalítica, Alimentos, Águas naturais.

## ABSTRACT

The present work emphasized the use of electrochemical sensors and biosensors for the determination of endosulfan (EDS, organochlorine), thiabendazole (TBZ, benzimidazole) and formetanate hydrochloride (FMT, carbamate) pesticides in sugar cane, tomato, mango, grape and natural waters samples. Furthermore, insights of redox mechanistic of EDS, TBZ and FMT pesticide were also presented. The hanging mercury drop electrode (HMDE), boron-doped diamond electrode (BDDE) and cobalt phthalocyanine with functionalized multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode (Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE) sensors were used. For biosensors, Laccase enzyme (Lac) was imobilized via cross-linking onto a gold electrode previously modified with gold nanoparticles (Glu.2%-Lac-AuNp/Au) and onto a PcCo-fMWCNT modified electrode (Glu.2%-Lac/Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE). EDS was reduced by quase-reversible process. TBC was oxidized by an irreversible process on a BDDE and Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE. The electrochemical response of FMT on a BDDE showed the irreversible oxidation mechanism of the type chemical-electrochemical. However, the electrochemical-chemical-electrochemical mechanism was observed for FMT at Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE with four oxidation process (one irreversible, two quase-reversible and one reversible processes). The detection limits (DL) and quantification limits (QL) calculated values were: DL = 0.121 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.406 mg kg<sup>-1</sup> (EDS at HMDE), DL = 0.074 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.247 mg kg<sup>-1</sup> (EDS at Glu.2%-Lac/Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE), DL = 0.052 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.177 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ at BDDE), DL = 0.019 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.064 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ at Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE), DL = 0.094 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.311 mg kg<sup>-1</sup> (TBZ at Glu.2%-Lac/Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE), DL = 0.094 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.314 mg kg<sup>-1</sup> (FMT at BDDE), DL = 0.025 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.083 mg kg<sup>-1</sup> (FMT at Naf.0.5%-PcCo-fMWCNT/GCE), DL = 0.088 mg kg<sup>-1</sup> and QL = 0.299 mg kg<sup>-1</sup> (FMT at Glu.2%-Lac-AuNp/Au). These values are according to maximum residue limits established by National Health Surveillance Agency for EDS, TBZ and FMT pesticides (0.01 a 10.0 mg kg<sup>-1</sup>). The calculated recovery percentages varied from 70.89 to 117.32% with relative standard desviation from 0.18 to 7.58%. Thus, electrochemical sensors and biosensors can be considered as an alternative tool for pesticides determination in foods and environmental matrices.

**Keywords:** Pesticides, Sensor, Biosensors, Electroanalysis, Food, Natural waters.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Visão geral dos diferentes caminhos e destinos dos pesticidas após a sua aplicação no meio ambiente .....	35
Figura 2 –	Representação esquemática do princípio de trabalho empregando biossensor enzimático baseado no fenômeno de inibição.....	40
Figura 3 –	Estrutura química do endossulfam.....	42
Figura 4 –	Estrutura química do tiabendazol.....	50
Figura 5 –	Estrutura química do cloridrato de formetanato.....	54
Figura 6 –	Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para EDS $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR sobre HMDE com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , e as respectivas barras de erros calculadas.....	69
Figura 7 –	Voltamogramas de onda quadrada com a indicação das componentes de corrente para EDS $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre HMDE com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ em meio de tampão BR (A) pH 4,0 e (B) pH 11,0.....	70
Figura 8 –	Relação entre razão corrente de pico/raiz quadrada da frequência e inverso da frequência obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para EDS $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 sobre HMDE. Valores de frequência no intervalo de 25 a $400 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	73
Figura 9 –	(A) Representação dos orbitais LUMO para a molécula do EDS. (B) Distribuição da densidade eletrônica para a molécula de EDS após a remoção do primeiro elétron. Carbono (cinza), hidrogênio (branco), oxigênio (vermelho), cloro (verde) e enxofre (amarela).....	76
Figura 10 –	Proposta de mecanismo de redução do EDS sobre HMDE em meio de tampão BR 4,0 .....	77
Figura 11 –	Proposta de mecanismo de redução do EDS sobre HMDE em meio de tampão BR 11,0.....	78

- Figura 12 – Voltamogramas de onda quadrada para EDS em meio de tampão BR pH 4,0 sobre HMDE, com  $f = 200 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$  e concentrações de EDS variando de  $1,54 \times 10^{-7}$  a  $1,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro. 79
- Figura 13 – Voltamogramas cíclicos para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Naf.2% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 85
- Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com unidades da enzima Lac variando de 13,6 a 272,0 mU, em tampão BR pH 5,0 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ..... 87
- Figura 15 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR no intervalo entre 4,0 e 6,0, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU. Na inserção, a influência do eletrólito de suporte (tampão BR e fosfato) em pH 5,0 sobre corrente de pico e largura de meia-altura..... 88
- Figura 16 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS no intervalo de  $4,97 \times 10^{-5}$  a  $1,07 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a relação entre corrente de pico e concentração de ABTS com as respectivas barras de erro..... 90
- Figura 17 – Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ..... 91

Figura 18 –	Diagramas de Nyquist para ABTS $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0, com aplicação de 0,52 V, intervalo de frequência de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV.....	92
Figura 19 –	(A) Influência do tempo de desaeração com $\text{N}_{2(\text{g})}$ nos perfis voltamétricos para ABTS $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Relação entre corrente de pico e tempo de desaeração com as respectivas barras de erro.....	94
Figura 20 –	(A) Mecanismo de oxidação para ABTS na ausência da enzima Lac ou ausência de oxigênio. (B) Representação da reação enzimática entre ABTS e enzima Lac., com redução eletroquímica do ABTS radicalar formado na superfície do biossensor.....	96
Figura 21 –	Curva analítica para EDS construída a partir do percentual de inibição e concentração de EDS entre $2,36 \times 10^{-7}$ e $7,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% na presença de ABTS $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 5,0.....	99
Figura 22 –	Influência do eletrólito de suporte em pH 3,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB com $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Tampões: BR, McIlvaine e Sorensen.....	104
Figura 23 –	Relação entre potencial de pico, corrente de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em tampão BR com $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	104
Figura 24 –	(A) Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para TBZ. (B) Estruturas químicas das espécies formadas em diferentes valores de pH.....	105

Figura 25 –	(A) Diagramas de Nyquist para TBZ $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em tampão BR no intervalo de pH entre 2,2 e 6,0, variação de frequência de 40 kHz a 4 mHz e amplitude de 10 mV. (B) Relação entre $k_{ap}$ e pH para TBZ a partir dos experimentos de EIE.....	107
Figura 26 –	Voltamogramas cíclicos para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0 a 20 $\text{mV s}^{-1}$ por cinco ciclos consecutivos.....	108
Figura 27 –	Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em tampão BR pH 3,0 com $f = 20 \text{ s}^{-1}$ , $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .....	111
Figura 28 –	(A) Representação dos orbitais HOMO acompanhada da densidade eletrônica distribuída sobre a molécula TBZH <sup>+</sup> . (B) Estrutura da espécie TBZH <sup>+</sup> . Carbono (cinza), hidrogênio (branca), nitrogênio (azul) e enxofre (amarela).....	112
Figura 29 –	Proposta de mecanismo de oxidação do TBZ.....	114
Figura 30 –	Voltamogramas de onda quadrada para TBZ no intervalo de $4,98 \times 10^{-7}$ a $1,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0, com $f = 20 \text{ s}^{-1}$ , $a = 20 \text{ mV}$ , $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro.....	114
Figura 31 –	Voltamogramas de onda quadrada para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF/FcCo em tampão BR pH 3,0 com $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , preparado a partir de suspensão contendo NTCPMF e FcCo, ambos a $1 \text{ mg mL}^{-1}$ em DMF com percentuais de Nafion <sup>®</sup> variando de 0,0 a 1,0% .....	119
Figura 32 –	Voltamogramas de onda quadrada para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcM-Naf.0,5% para $M = \text{Co}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Ni}^{2+}$ em meio de tampão BR pH 3,0 com $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	121
Figura 33 –	Imagens por MEV-EC de NTCPM (A) não funcionalizados, (B) funcionalizados e (C) CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% .....	124
Figura 34 –	Espectros Raman obtidos a partir do laser de íon argônio com $\lambda = 514,5 \text{ nm}$ para NTCPM, NTCPMF e NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%.....	125

Figura 35 –	Representação esquemática das interações entre NTCPMF e FcCo.....	127
Figura 36 –	Voltamogramas cíclicos obtidos para $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre CV/Naf.0,5%, CV/NTCPM-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	128
Figura 37 –	Diagramas de Nyquist para TBZ $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV, CV-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 2,2, intervalo de frequência de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV.....	129
Figura 38 –	Voltamogramas de onda quadrada para TBZ no intervalo de $9,98 \times 10^{-8}$ a $2,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 2,2 com $f = 30 \text{ s}^{-1}$ , $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro.....	131
Figura 39 –	Curva analítica para TBZ entre $2,36 \times 10^{-7}$ e $1,68 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% na presença de ABTS $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 5,0.....	136
Figura 40 –	Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em tampão BR com $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro.....	140
Figura 41 –	Voltamogramas cíclicos para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0 a $50 \text{ mV s}^{-1}$ por cinco ciclos consecutivos.....	141
Figura 42 –	Voltamogramas de onda quadrada para FMT no intervalo de $4,98 \times 10^{-7}$ a $1,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0, com $f = 20 \text{ s}^{-1}$ , $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro.....	143
Figura 43 –	Diagramas de Nyquist para $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com intervalo de frequência de 60 kHz a 100 mHz e amplitude de 5 mV.....	147

Figura 44 –	Voltamogramas cíclicos para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 a $50 \text{ mV s}^{-1}$ por cinco ciclos consecutivos.....	149
Figura 45 –	Relações entre (A) corrente de pico e pH e (B) potencial de pico e pH obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em tampão BR com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro.....	150
Figura 46 –	Influência do eletrólito de suporte em pH 5,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .	152
Figura 47 –	Relação entre (○) corrente de pico e potencial de acumulação com $t_a = 15 \text{ s}$ e (■) corrente de pico e tempo de acumulação com $E_a = 1,55 \text{ V}$ obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 5,0 sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, empregando $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro.....	153
Figura 48 –	Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com $E_a = 1,55 \text{ V}$ , $t_a = 5 \text{ s}$ , $a = 50 \text{ mV}$ , $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e (A) $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , (B) $f = 50 \text{ s}^{-1}$ e (C) $f = 100 \text{ s}^{-1}$ .....	155
Figura 49 –	Relação entre razão corrente de pico/frequência e frequência obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com $E_a = 1,55 \text{ V}$ , $t_a = 5 \text{ s}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Valores de frequência no intervalo de 20 a $300 \text{ s}^{-1}$ .....	157
Figura 50 –	Voltamogramas de onda quadrada para FMT no intervalo de $9,80 \times 10^{-8}$ a $3,92 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com $E_a = 1,55 \text{ V}$ , $t_a = 5 \text{ s}$ , $f = 100 \text{ s}^{-1}$ , $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro.....	159

Figura 51 –	Relação entre corrente de pico e tempo de eletrodeposição das NpAu sobre Au com aplicação de $-0,2$ V obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a $1,0 \times 10^{-3}$ mol $L^{-1}$ , em meio de KCl $0,1$ mol $L^{-1}$ com $f = 100$ $s^{-1}$ , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	163
Figura 52 –	Influência do eletrólito de suporte em pH 5,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para 4-AF.HCl $5,83 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% com $f = 40$ $s^{-1}$ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	165
Figura 53 –	Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para 4-AF.HCl $5,83 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com $f = 40$ $s^{-1}$ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV, com as respectivas barras de erro.....	166
Figura 54 –	Voltamogramas de onda quadrada para diferentes substratos fenólicos $5,83 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com $f = 40$ $s^{-1}$ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	167
Figura 55 –	Voltamogramas cíclicos obtidos para 4-AF.HCl $5,83 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ sobre Au e sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 a $10$ mV $s^{-1}$ por um ciclo.....	168
Figura 56 –	Representação esquemática de preparação do biossensor baseado na enzima Lac.....	169
Figura 57 –	Voltamogramas cíclicos para 4-AF.HCl $5,83 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na presença e ausência de oxigênio a $10$ mV $s^{-1}$ por um ciclo.....	170
Figura 58 –	(A) Representação do mecanismo de reação para 4-AF.HCl na ausência da enzima Lac. (B) Representação da reação enzimática entre 4-AF.HCl e a enzima lacase, com redução eletroquímica da iminoquinona formada na superfície do biossensor.....	171

- Figura 59 – (A) Diagramas de Nyquist para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com frequência no intervalo de 100 kHz a 100 mHz e amplitude de 10 mV. (B) Voltamogramas de onda quadrada para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ..... 172
- Figura 60 – Curva analítica para FMT construída a partir do percentual de inibição e logaritmo da concentração de FMT entre  $9,43 \times 10^{-7}$  e  $1,13 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na presença de 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições da VOQ:  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com barras de erro..... 174

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reagentes utilizados no trabalho, com suas respectivas fórmulas químicas, procedência e pureza.....	59
Tabela 2 –	Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0.....	81
Tabela 3 –	Determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE em amostras de cana-de-açúcar, tomate e água natural proveniente do açude Pacajus.....	82
Tabela 4 –	Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE e sobre biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0.....	100
Tabela 5 –	Determinação eletroanalítica de EDS sobre biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em amostras de cana-de açúcar e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio.....	101
Tabela 6 –	Cargas de Mülliken obtidas para TBZ, considerando o estado protonado da molécula.....	113
Tabela 7 –	Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre EDDB empregando VOQ, UV-Vis e CLAE.....	115
Tabela 8 –	Determinação eletroanalítica de TBZ sobre EDDB em amostras de cana-de-açúcar, de manga e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio.....	117
Tabela 9 –	Parâmetros e condições otimizadas no desenvolvimento do eletrodo modificado com NTPMF e FcCo para a determinação eletroanalítica do TBZ.....	122
Tabela 10 –	Parâmetros obtidos a partir dos experimentos de EIE para os eletrodos CV, CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%.....	130
Tabela 11 –	Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% empregando VOQ, UV-Vis e CLAE.....	132

Tabela 12 –	Determinação eletroanalítica de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em amostras de cana-de-açúcar, manga e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio.....	133
Tabela 13 –	Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% empregando VC, UV-Vis e CLAE.....	137
Tabela 14 –	Determinação eletroanalítica de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em amostras de cana-de-açúcar e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio.....	138
Tabela 15 –	Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de FMT sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0.....	144
Tabela 16 –	Determinação eletroanalítica de FMT sobre EDDB em amostras de manga e de uva.....	146
Tabela 17 –	Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e sobre EDDB em meio de tampão BR pH 5,0.....	160
Tabela 18 –	Determinação eletroanalítica de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em amostras de manga e de uva.....	161
Tabela 19 –	Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de FMT sobre EDDB, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e Au/NpAu/Lac-Glu.2%.....	175
Tabela 20 –	Biossensores baseados em oxirredutases para a determinação de carbamatos.....	176
Tabela 21 –	Determinação de FMT sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em amostras de manga e de uva.....	178

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABTS	2,2"-Azino-bis (3-etilbenzetiazolino-6-sulfônico)
PSA	Amina Primária-Secundária ( <i>Primary-Secundary Amine</i> )
BR	Britton-Robinson
CV	Carbono Vítreo
4-AF.HCl	Cloridrato de 4-aminofenol
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
CG-DCE	Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons
CG-EM/EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa Sequencial
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa Sequencial
CLUF-EM/EM	Cromatografia Líquida de Ultraeficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil)etano
DFT	Teoria do Funcional da Densidade ( <i>Density Functional Theory</i> )
DPR	Desvio Padrão Relativo
DMF	Dimetilformamida
DEDTC	Dietilditiocarbamato
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica ( <i>Electron paramagnetic resonance</i> )
ECC	Eletrodo de Carbono Cerâmico
EDDB	Eletrodo de Diamante Dopado com Boro
EPC	Eletrodo de Pasta de Carbono
EI	Eletrodo Impresso
ECE	Eletroquímico-Químico-Eletroquímico
EDS	Endossulfam
UV-Vis	Espectrofotometria na Região do Ultravioleta e do Visível
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
FMT	Formetanato

FRA	Analisador de Resposta em Frequência ( <i>Frequency Response Analysis</i> )
FcCo	Ftalocianina de Cobalto
FcM	Ftalocianina Metálica
GPES	<i>General Purpose Electrochemical System</i>
GGA	Aproximação de Gradiente Generalizado ( <i>Generalized gradient approximation</i> )
Glu	Glutaraldeído
HMDE	Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio ( <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i> )
Lac	Lacase
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MCV	McIlvaine
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-EC	Microscopia Eletrônica de Varredura de Efeito de Campo
Naf	Nafion <sup>®</sup>
NpAu	Nanopartículas de Ouro
NTC	Nanotubos de Carbono
NTCPM	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
NTCPMF	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Funcionalizados
NTCPS	Nanotubos de Carbono de Paredes Simples
LUMO	Orbital Molecular Não-ocupado de Mais Baixa Energia ( <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia ( <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
PFO	Polifenol oxidase
POP	Poluente orgânico persistente
QuEChERS	Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro ( <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> )
RL	Região de Linearidade

SAM	Monocamadas Alto-Organizadas ( <i>Self-Assembly Monolayer</i> )
SOR	Sörensen
TBZ	Tiabendazol
TBZ <sup>-</sup>	Tiabendazol Desprotonado
TBZ <sub>n</sub>	Tiabendazol Neutro
TBZH <sup>+</sup>	Tiabendazol Protonado
ITO	Óxido de Índio Dopado com Estanho ( <i>Tin-doped indium oxide</i> )
Tir	Tirosinase
UNECE	Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa ( <i>United Nations Economic Commission for Europe</i> )
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente ( <i>United Nations Economic Environment Programme</i> )
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada

## LISTA DE SÍMBOLOS

$C_0$	Concentração inicial do produto antes da inibição enzimática
$S_0$	Sinal inicial antes da inibição enzimática
$C$	Concentração após a inibição enzimática
$S$	Sinal após a inibição enzimática
®	Marca registrada
°C	Graus Celcius
$m/z$	Razão massa/carga
$E_p$	Potencial de pico
$I_p$	Corrente de pico
V	Volt
R	Coefficiente de correlação
v	Volume
$E_a$	Potencial de acumulação
$t_a$	Tempo de acumulação
$f$	Frequência de aplicação dos pulsos de potencial
$a$	Amplitude dos pulsos de potencial
$\Delta E_s$	Incremento de potencial
C18	Octadecil
$\lambda$	Comprimento de onda
rpm	Rotações por minuto
$t_r$	Tempo de retenção
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$\Omega$	Ohm
$A_{geo}$	Área geométrica
Au	Ouro
$\alpha$	Coefficiente de transferência de carga
$\Psi_{p1}$	Corrente de pico da componente da voltametria de onda quadrada a potencial mais negativo

$\Psi_{p2}$	Corrente de pico da componente da voltametria de onda quadrada a potencial mais positivo
$\nu$	Velocidade de varredura
$I_r$	Corrente de pico da componente resultante da voltametria de onda quadrada
$f_{m\acute{a}x}$	Máximo quase-reversível
$k_s$	Constante de transferência de carga
$\kappa_{max}$	Parâmetro cinético crítico
$K$	Parâmetro cinético adimensional
$S_{x/y}$	Desvio padrão da regressão linear
$b$	Inclinao da curva analítica
$y_i$	Resposta em funo da concentrao
$\bar{y}$	Resposta estimada pela curva analítica
$n_i$	Número de pontos
$IC_a$	Intervalo de confiança do intercepto
$IC_b$	Intervalo de confiança da inclinao
$S_a$	Desvio padrão do intercepto
$S_b$	Desvio padrão da inclinao
$t$	t de Student
$\Delta E_{p/2}$	Largura de meia altura
$\Delta E_p$	Diferença de potencial de pico
$Z_{imaginária}$	Impedância imaginária
$Z_{real}$	Impedância real
$R_{tc}$	Resistência de transferência de carga
$k_{ap}$	Constante aparente de velocidade da reao de transferência de carga
$R$	Constante universal dos gases
$T$	Temperatura
$n$	Número de elétrons
$F$	Constante de Faraday

A	Área
C	Concentração
% Inib.	Percentual de inibição
I	Corrente de pico após a adição de pesticida
$I_0$	Corrente de pico antes da adição de pesticida
$pK_a$	Constante de dissociação ácida
$E^0$	Potencial padrão
$k^0$	Constante de velocidade
D	Coefficiente de difusão
$I_D$	Intensidade da banda D do Raman
$I_G$	Intensidade da banda G do Raman
$E_{p/2}$	Potencial de meia-onda
$E_{p,d}$	Potencial de pico da componente direta
$E_{p,r}$	Potencial de pico da componente reversa
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
Pt	Platina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>1.1</b>	<b>Pesticidas: aspectos gerais</b> .....	33
<b>1.2</b>	<b>Os pesticidas no cenário brasileiro</b> .....	37
<b>1.3</b>	<b>Métodos empregados na determinação de pesticidas</b> .....	38
<b>1.4</b>	<b>Pesticidas organoclorados: Endossulfam</b> .....	41
<b>1.4.1</b>	<i>Determinação de endossulfam baseada em métodos eletroquímicos</i> .....	46
<b>1.5</b>	<b>Pesticidas benzimidazólicos: Tiabendazol</b> .....	50
<b>1.5.1</b>	<i>Determinação de tiabendazol baseada em métodos eletroquímicos</i> .....	52
<b>1.6</b>	<b>Pesticidas carbamatos: Cloridrato de formetanato</b> .....	54
<b>1.6.1</b>	<i>Determinação de formetanato baseado em métodos eletroquímicos</i> .....	56
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	58
<b>2.1</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	58
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	58
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	59
<b>3.1</b>	<b>Reagentes e soluções</b> .....	59
<b>3.2</b>	<b>Instrumentação</b> .....	61
<b>3.2.1</b>	<i>Sistema eletroquímico</i> .....	62
<b>3.2.2</b>	<i>Eletrodos</i> .....	62
<b>3.3</b>	<b>Preparação dos sensores eletroquímicos</b> .....	63
<b>3.3.1</b>	<i>Eletrodo de diamante dopado com boro</i> .....	63
<b>3.3.2</b>	<i>Eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas</i> .....	63
<b>3.3.3</b>	<i>Preparação do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas</i> .....	64
<b>3.3.4</b>	<i>Preparação do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase e nanopartículas de ouro</i> .....	64
<b>3.4</b>	<b>Metodologia</b> .....	65
<b>3.5</b>	<b>Aplicação da metodologia eletroanalítica</b> .....	66

3.5.1	<i>Determinação de endossulfam em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais.....</i>	66
3.5.2	<i>Determinação de tiabendazol em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais.....</i>	67
3.5.3	<i>Determinação de formetanato em amostras de manga e de uva.....</i>	67
3.6	<i>Estudos químico-computacionais.....</i>	68
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	69
4.1	<b>Estudo eletroanalítico de endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio.....</b>	69
4.1.1	<i>Comportamento eletroquímico do endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio e influência do pH do meio.....</i>	69
4.1.2	<i>Estudos dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....</i>	73
4.1.3	<i>Proposta de mecanismo de redução do endossulfam .....</i>	74
4.1.4	<i>Curvas analíticas para endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio.....</i>	79
4.1.5	<i>Determinação de endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais.....</i>	81
4.2	<b>Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto para a determinação do pesticida endossulfam.....</b>	83
4.2.1	<i>Parâmetros que influenciam a resposta do biossensor eletroquímico baseado na lacase.....</i>	84
4.2.2	<i>Curvas analíticas para endossulfam sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase.....</i>	97
4.2.3	<i>Determinação de endossulfam sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar e águas naturais.....</i>	101
4.3	<b>Estudo eletroanalítico do tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</b>	102
4.3.1	<i>Caracterização física do eletrodo de diamante dopado com boro.....</i>	102
4.3.2	<i>Comportamento eletroquímico de tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</i>	102

4.3.3	<i>Estudos dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....</i>	110
4.3.4	<i>Proposta de mecanismo de oxidação de tiabendazol.....</i>	112
4.3.5	<i>Curvas analíticas para tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</i>	114
4.3.6	<i>Determinação de tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais.....</i>	116
4.4	<b>Estudo eletroanalítico de tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas.....</b>	118
4.4.1	<i>Otimização da construção do eletrodo modificado e do procedimento eletroanalítico para determinação de tiabendazol.....</i>	118
4.4.2	<i>Caracterização física dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas de cobalto.....</i>	123
4.4.3	<i>Ensaio de espectroscopia de impedância eletroquímica para as etapas de construção do eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianina de cobalto.....</i>	129
4.4.4	<i>Curvas analíticas para tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto.....</i>	131
4.4.5	<i>Determinação de tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais.....</i>	133
4.5	<b>Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto para a determinação de tiabendazol.....</b>	135
4.5.1	<i>Determinação de tiabendazol sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais.....</i>	137
4.6	<b>Estudo eletroanalítico do formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</b>	139
4.6.1	<i>Comportamento eletroquímico do formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</i>	139
4.6.2	<i>Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....</i>	142

4.6.3	<i>Curvas analíticas para tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro.....</i>	143
4.6.4	<i>Determinação de formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro em amostras de manga e uva.....</i>	145
4.7	<b>Estudo eletroanalítico do formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto.....</b>	147
4.7.1	<i>Espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto.....</i>	147
4.7.2	<i>Comportamento eletroquímico do formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto.....</i>	148
4.7.3	<i>Influência do tempo e potencial de acumulação.....</i>	153
4.7.4	<i>Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....</i>	154
4.7.5	<i>Curvas analíticas para formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto.....</i>	158
4.7.6	<i>Determinação de formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de manga e uva.....</i>	161
4.8	<b>Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase para a determinação do pesticida formetanato.....</b>	162
4.8.1	<i>Obtenção das nanopartículas de ouro.....</i>	162
4.8.2	<i>Parâmetros que influenciam a resposta do biossensor eletroquímico baseado na lacase.....</i>	164
4.8.3	<i>Caracterização do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase.....</i>	172
4.8.4	<i>Curvas analíticas para formetanato sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase.....</i>	174
4.8.5	<i>Determinação de formetanato sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase em amostras de manga e de uva.....</i>	177
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	179
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	180
	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	205

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Pesticidas: aspectos gerais

O mundo moderno tem assistido ao intenso crescimento tecnológico, científico e populacional. No entanto, a intensificação da poluição causada por substâncias químicas das mais variadas classes também está presente no cenário mundial do século XXI. (1-3) Como consequência, os seres humanos e o meio ambiente são afetados direta e indiretamente, pois solo, água, ar, seres vivos e alimentos são os alvos da contaminação por poluentes químicos. O aumento da contaminação é decorrente do crescimento populacional, com estimativas sugerindo elevação significativa. (3-5)

Diante destas circunstâncias, a nova demanda mundial por alimentos e água potável se torna importante tópico de discussão. (6) O aumento da produção de alimentos em função do crescimento populacional deve vir acompanhado de qualidade e não comprometimento da segurança alimentar/ambiental. (7) Todavia, isso está muito distante de ser observado, porque uma das mais poderosas ferramentas empregadas para assegurar a provisão de alimentos é o uso de substâncias químicas conhecidas como pesticidas, que nada mais são que os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Esses compostos podem alterar a composição da flora e/ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, assim como as substâncias e os produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (8) Os pesticidas são, sem sombra de dúvidas, um benefício para garantir elevada produtividade de produtos agrícolas, porém, ao mesmo tempo, são responsáveis pelos impactos negativos sobre a biodiversidade, o meio ambiente, a qualidade dos alimentos e a saúde humana. Atualmente, estima-se que entre 1,0 e 2,5 milhões de toneladas de pesticidas são utilizadas por ano, sendo que o marco inicial do grande consumo dessas substâncias foi a aplicação de compostos organoclorados sintéticos na primeira metade do século XX. (9)

Com o passar dos anos, novos compostos foram sintetizados e agrupados em diferentes grupos de pesticidas, de acordo com as classes químicas, tais como: azóis, benzimidazóis,

carbamatos, derivados de ácido carboxílicos, amidas, nitrilas e piridinas, fenóxiherbicidas, formamidas, neonicotinóides, nitrilas, organoclorados, organofosforados, organometálicos, pirazóis, piretróides, sais de amônio quartenários, tiocianatos, triazinas e ureias. (10) Os pesticidas são classificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com seus efeitos toxicológicos nos seres humanos, sendo dividido em quatro classes: Classe I - compostos extramamente tóxicos; Classe II - compostos altamente tóxicos; Classe III - compostos moderadamente tóxicos; Classe IV - compostos pouco tóxicos. (11)

Além do mais, a exaustiva aplicação dos pesticidas na agricultura foi impulsionada por um movimento mundial, iniciado em 1944 no México, conhecido como revolução verde (*Green Revolution*). O movimento tinha por objetivo principal aumentar a produção de grãos no mundo, pois na época já se discutia os problemas de abastecimento para atender a demanda da população que estava em plena explosão demográfica. Assim, uma das estratégias para garantir a elevada produtividade foi incentivar o uso intenso dos pesticidas. (12,13)

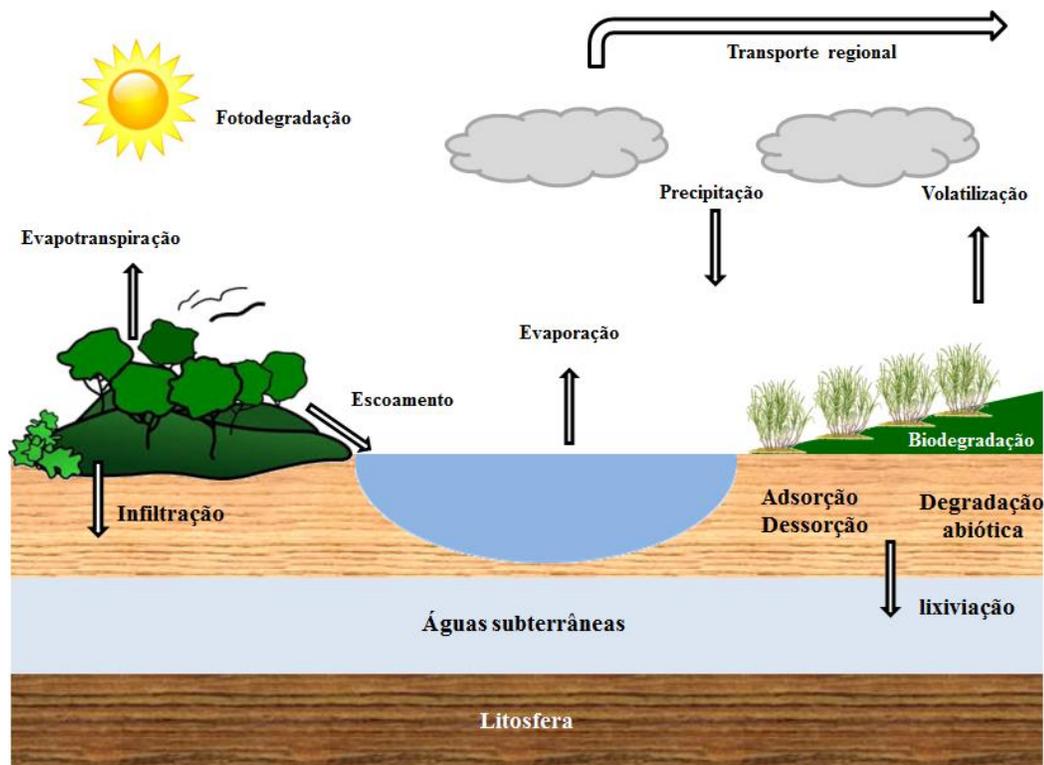
Os efeitos causados por pesticidas têm sido objeto de pesquisas, resultando na expansão do número de trabalhos publicados nas últimas duas décadas, ou seja, foram mais de 10.000 publicações acumuladas em 2012 e as dez principais classes químicas de pesticidas estudadas incluem organofosforados, organoclorados, carbamatos, triazinas, piretróides, ureias, fenóxiherbicidas, neonicotinóides, benzimidazóis e sais de amônio quartenários. (14)

Em função do exposto, surge o dilema: o melhor é manter o uso desenfreado de pesticidas para garantir a elevada produtividade e, conseqüentemente, garantir os suprimentos alimentícios da demanda da sociedade moderna? Ou é melhor evitar o uso de pesticidas e preservar o meio ambiente e a saúde humana? Não há como apontar uma resposta absoluta, pois, de fato, o uso dos pesticidas desempenha papel importante na produção de alimentos. No entanto, os impactos negativos sobre a saúde dos seres humanos, resultantes da contaminação por pesticidas, consistem em efeitos adversos sobre o sistema nervoso, imunológico, defeitos congênitos, desenvolvimento de células tumorais, distúrbios do sistema endócrino, entre outros. (15-17) No meio ambiente, a contaminação se estende ao solo, ar e biota aquática, prejudicando o ecossistema. Portanto, o que pode ser feito é prover ações que diminuam a contaminação por pesticidas, tais como educação ambiental dos agricultores, controle mais rígido da comercialização dos pesticidas, evitando principalmente o mercado paralelo, desenvolvimento de estratégias de remediação e disponibilização de métodos analíticos rápidos e mais acessíveis

para o monitoramento de pesticidas. Essas ações proporcionariam condições para a implementação de métodos práticos para fiscalização e controle de pesticidas no meio ambiente e nos alimentos.

Os pesticidas têm sido encontrados em níveis detectáveis no meio ambiente, na atmosfera e em águas superficiais, lençóis freáticos, solo, animais, vegetais e alimentos. (10,18) Especificamente, os pesticidas empregados em culturas agrícolas podem ser transformados metabolicamente ou por reações de degradação. A Figura 1 apresenta de forma ilustrativa a visão geral dos diferentes caminhos e destinos dos pesticidas no meio ambiente.

Figura 1 – Visão geral dos diferentes caminhos e destinos dos pesticidas após a sua aplicação no meio ambiente



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de adaptação da referência (10).

No entanto, uma fração inalterada da quantidade de pesticida aplicada no tratamento inicial de cada cultura agrícola pode permanecer de forma inalterada nos frutos após a sua colheita, com níveis acima do limite máximo de resíduos (LMR). (19,20) Frutas e vegetais são os que recebem as mais altas doses de pesticidas e podem, assim, conter elevados níveis de resíduos. Além de contaminar diretamente os produtos agrícolas, os pesticidas podem seguir

diferentes caminhos após a sua aplicação, incluindo transformação/degradação, sorção/dessorção, volatilização, escoamento para as águas superficiais, infiltração no solo podendo chegar até os reservatórios de águas subterrâneas e migrando para outras regiões devido às intempéries climáticas. (20)

Os pesticidas estão sujeitos a duas classes de degradação no meio ambiente: abiótica e biótica. (10) A degradação abiótica consiste nos processos de oxidação do pesticida. Este processo é afetado por fatores ambientais, incluindo concentração de oxigênio, íons metálicos, natureza e quantidade de matéria orgânica e pH do meio. Os processos de hidrólise que consistem na reação entre pesticida e moléculas de água catalisada por íons hidrônio, hidroxila e metálicos também desempenham papel importante nas transformações dos pesticidas, sendo que as reações de hidrólise seguem cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de degradação é proporcional à concentração do composto e os fatores que influenciam a reatividade são estrutura química, grupos funcionais, temperatura e pH. Por último, os pesticidas podem ser degradados via reações de fotólise.

As moléculas do pesticida podem utilizar a fotoenergia de dois modos: indiretos, em que (outros compostos podem receber energia e formar espécies reativas que vão atacar os pesticidas) a energia é transmitida a partir de outros compostos que absorvem a fotoenergia, ou diretos, quando o pesticida recebe energia da radiação ultravioleta, passando para o nível excitado, podendo ocorrer quebra ou formação de ligações menos estáveis. Os processos de fotodegradação dependem da presença de catalisadores, exposição da radiação, matéria orgânica, pH, aeração do meio e propriedades físico-químicas do pesticida. A segunda classe é a degradação biótica em que as moléculas podem ser metabolizadas por microorganismos, tais como fungos e bactérias. Os processos de biodegradação são caracterizados usualmente pelo tempo de meia-vida. A velocidade do processo depende da quantidade e da natureza do pesticida presente no solo, da população dos microorganismos e das condições que influenciam a atividade microbiana, tais como temperatura, pH, umidade do solo, aeração e o teor de matéria orgânica. (12)

Apesar dos pesticidas estarem sujeitos aos processos abióticos e bióticos, relatos comprovam que esses compostos apresentam elevada resistência aos processos de degradação e, como consequência, acumulam-se no meio ambiente e nos produtos agrícolas, acarretando problemas à saúde humana. Neste contexto, registra-se o desenvolvimento de processos para a

eliminação dos pesticidas do ambiente aquático (21,22), com as ferramentas analíticas desempenhando papel fundamental para a identificação e a determinação de pesticidas em matrizes ambientais (*e.g.* águas naturais) e em produtos agrícolas (*e.g.* frutas).

## 1.2 Os pesticidas no cenário brasileiro

A produção de alimentos de origem agrícola é responsável por cerca de 70 a 80% do uso total de pesticidas. (10) O Brasil, devido à sua vasta extensão geográfica e ao seu crescente desenvolvimento econômico, tem sido responsável por quase 20% da utilização global de pesticidas, sendo o maior consumidor da América Latina desde 2008. (23,24) E tudo indica que esta posição irá perdurar, pois dados apontam para acelerado ritmo de expansão do mercado brasileiro de consumo de agrotóxicos. (25)

A preocupação com os impactos negativos gerados pela contaminação da água pode ser ainda mais alarmante em determinados locais. Por exemplo, para o semiárido nordestino essa preocupação é ainda maior em virtude da deficiência hídrica. A redução dos níveis de precipitação nessa região é refletida na diminuição dos níveis de água dos açudes. Adicionalmente, os principais usos da água nessa região, principalmente no Estado do Ceará, são para consumo humano e irrigação e as principais fontes desse recurso são os açudes e as águas subterrâneas. A relevância desse tópico é exemplificada por Gama e colaboradores, onde é apresentado um inventário de agrotóxicos e o risco de contaminação das águas naturais no Ceará. Esses autores expressam que há necessidade de se conhecer a qualidade dos recursos hídricos e que um programa de monitoramento da qualidade das águas é o meio pelo qual podem ser discutidos os impactos negativos causados pelos pesticidas e implementadas políticas de segurança alimentar e de qualidade de meio ambiente. (25)

Além disso, vale ressaltar que no nordeste brasileiro, onde o clima é seco e com elevado nível de exposição solar, são cultivadas frutas tropicais e subtropicais, todas com boa produtividade e lucratividade. Assim, a relação entre o uso dos pesticidas nas regiões produtoras de frutas tropicais e as elevadas taxas de exportação para mercados estrangeiros é um importante aspecto a ser observado. Dados do Programa de Promoção das Exportações das Frutas e Derivados indicaram que em 2011 foram exportados mais de 661 mil toneladas de frutas frescas, o que equivale a US\$ 633 milhões, sendo que a União Europeia foi o comprador

majoritário das frutas brasileiras, absorvendo 77 % das exportações (isso sem considerar a contribuição das frutas processadas). (26) Por exemplo, a exportação de frutas produzidas no Ceará é uma das principais agendas comerciais da Câmara Brasil-Portugal. No primeiro semestre do ano de 2013, o Ceará foi considerado o maior exportador de frutas do Nordeste e o segundo maior exportador do Brasil. Os principais itens com as respectivas arrecadações foram melão (US\$ 24 milhões), abacaxi (US\$ 15 milhões), banana (US\$ 8,2 milhões), manga (US\$ 1,9 milhões), melancia (US\$ 1,4 milhões), mamão (US\$ 412 mil) e coco (US\$ 30 mil). (27)

Por isto, há necessidade de se disponibilizar métodos analíticos rápidos e mais acessíveis para o monitoramento de pesticidas, para o controle de diferentes tipos de pesticidas no meio ambiente, e também em frutas tropicais, objetos de intensa comercialização interna e externa, geração de emprego e renda.

### **1.3 Métodos empregados na determinação de pesticidas**

A análise de pesticidas tem as técnicas cromatográficas como metodologia recomendada. (28,29) As vantagens oferecidas por estas técnicas, tais como sensibilidade, precisão, baixos limites de detecção, análise de multirresíduos, acoplamento com diferentes tipos de detectores etc., fizeram com que fossem reconhecidas como técnicas tradicionais de análise. No entanto, as desvantagens dos métodos cromatográficos, que incluem elevado custo, necessidade de etapas laboriosas de derivatização de amostra em alguns casos, tempo de análise e impossibilidade de realização de medidas em campo, foram fatores preponderantes para o desenvolvimento de pesquisas voltadas à busca de metodologias alternativas. Os requisitos exigidos para novos métodos analíticos são precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade, além de baixo custo e possibilidade de adaptação para medidas em campo. (12)

É nesta perspectiva que as técnicas eletroanalíticas se apresentam como poderosa ferramenta para análises de pesticidas, pois possuem como características: versatilidade, baixo custo, rapidez e sensibilidade comparáveis às das técnicas tradicionais. (30- 32) Além do mais, as técnicas eletroanalíticas podem prover informações importantes acerca da cinética e do mecanismo redox do composto em estudo. (33,34)

O alicerce da eletroanálise se deve à utilização de eletrodos à base de mercúrio. (35) Entretanto, o uso convencional da polarografia gera elevadas quantidades de resíduos de

mercúrio, prejudicando seu emprego em análises de rotina. Assim, a implementação de modernas técnicas voltamétricas promoveram a substituição das tradicionais técnicas polarográficas, reduzindo consideravelmente os resíduos tóxicos e diminuindo o tempo de análise. Procedimentos e orientações destinados à minimização da quantidade de resíduo gerado permitem o emprego do mercúrio como eletrodo de trabalho em aplicações analíticas. (36,37)

Tomando como base a utilização dos sensores eletroquímicos não-modificados, o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) se destaca na análise de contaminantes ambientais, devido às suas características, tais como amplo intervalo de potencial em meio aquoso e não aquoso, condutividade, baixa corrente residual, robustez mecânica, estabilidade em meios ácidos e básicos, resistência à corrosão e minimização dos problemas de passivação devido à presença de carbonos  $sp^3$  do diamante. (38 -40)

O emprego de eletrodos modificados alcançou posição de destaque em Eletroanalítica, com a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação sendo realçadas, devido a fenômenos de eletrocatalise e de exclusão de interferentes. (41) Os eletrodos modificados foram considerados como integrantes dos métodos emergentes para análise de pesticidas. (12)

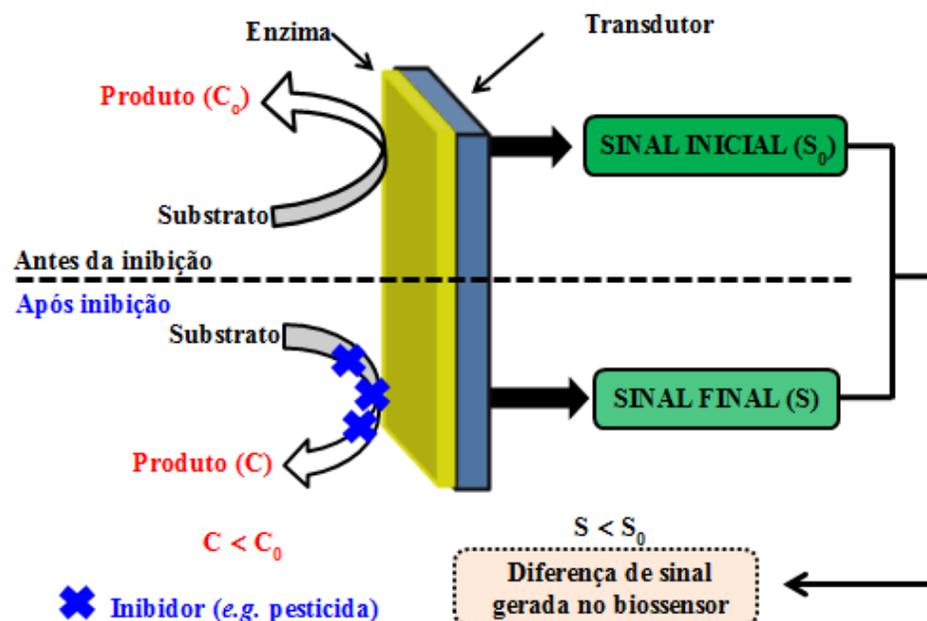
Neste contexto, nanotubos de carbono (NTC) encontraram aplicabilidade em muitas áreas, *e.g.*, construção de sensores eletroquímicos. Em função de sua forma estrutural, NTC são classificados como: 1) nanotubos de carbono de paredes simples (NTCPS) e nanotubos de carbono com paredes múltiplas (NTCPM). (42) O sucesso na utilização dos NTC se deve principalmente às suas propriedades, tais como elevada área superficial, resistência mecânica, estabilidade química e elevada condutividade elétrica. (43) Além dos NTC, outros mediadores de transferência de elétrons podem ser incorporados à sua estrutura a fim de intensificar a atividade eletrocatalítica. Pode ser encontrado na literatura que as ftalocianinas metálicas (FcM) aliadas aos NTC promovem efeito sinérgico, garantindo maior sensibilidade, tornando-os adequados para aplicações analíticas. (44) Portanto, a junção de FcM e de NTC pode fornecer mais sensibilidade às metodologias eletroanalíticas.

Vale ressaltar aqui as estratégias baseadas na imobilização de material biológico, como enzimas, sobre a superfície de um transdutor (*e.g.*, eletrodo previamente modificado) para a construção de dispositivos analíticos denominados de biossensores enzimáticos. As configurações dos biossensores são as mais diversas possíveis, mas, para pesticidas, tem predominado a utilização da enzima acetilcolinesterase. (45) Contudo, enzimas pertencentes à

classe das fenol-oxidases, *e.g.*, tirosinase (Tir) e lacase (Lac), têm sido aplicadas como componente principal para a determinação de pesticidas carbamatos. (46,47) A enzima Lac tem a capacidade de catalisar a reação de redução de oxigênio até a formação de água, com a participação de quatro elétrons e a concomitante oxidação de inúmeros compostos, tais como orto, meta e para-difenóis, fenol, aminofenóis, aril diaminas e outros, e os produtos da reação enzimática podem ser orto, meta e para-quinona ou espécies radicalares. (48,49) A utilização da Lac como constituinte de biossensores eletroquímicos é viabilizada devido à sua estabilidade e ao seu baixo custo.

Em contraste com o acompanhamento direto do analito, a principal aplicação dos biossensores enzimáticos está na inibição da atividade enzimática causada pela presença de um composto com esta característica, que promove elevada sensibilidade às determinações. (50,51) A Figura 2 apresenta ilustração demonstrando o princípio de análise indireta baseada no fenômeno de inibição enzimática.

Figura 2 – Representação esquemática do princípio de trabalho empregando biossensor enzimático baseado no fenômeno de inibição



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de adaptação da referência (50).

Quando o substrato entra em contato com a enzima imobilizada no transdutor, na ausência do inibidor (*e.g.*, pesticida), ocorre a reação catalisada pela enzima produzindo, inicialmente, uma determinada quantidade de produto ( $C_0$ ), responsável pelo sinal inicial ( $S_0$ ) do biossensor, como pode ser visto na região superior à linha tracejada da Figura 2. Este sinal pode ser a corrente elétrica, no caso de biossensores eletroquímicos. (48) No entanto, após a exposição da enzima à espécie inibidora, a extensão da reação de catálise enzimática é prejudicada, pois o agente inibidor pode se ligar ao sítio ativo da enzima, resultando na formação de uma quantidade de produto ( $C$ ), menor que  $C_0$ . Assim, conseqüentemente, o sinal do biossensor após a inibição ( $S$ ) é menor que  $S_0$ . A ocorrência do fenômeno de inibição enzimática é empregada para fins analíticos, pois a diminuição da atividade da proteína pode ser relacionada com a concentração do inibidor. (50)

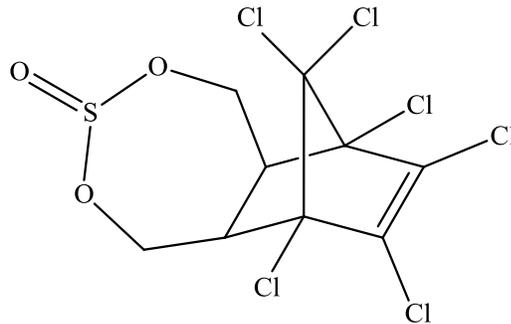
O desempenho dos biossensores depende do ambiente no qual a biomolécula está imobilizada. Por exemplo, os materiais nanoestruturados, tais como NTC e nanopartículas metálicas, têm recebido atenção devido ao fato de proporcionarem melhor desempenho aos biossensores. (52) Para tal, verificou-se na literatura que nanopartículas de ouro (NpAu) são um dos materiais com potencialidade para tal fim. (53) Essa capacidade está relacionada com as propriedades oferecidas pelas NpAu, tais como condutividade, estabilidade superficial para imobilização da enzima, capacidade eletrocatalítica, biocompatibilidade e facilidade de transferência de carga entre proteínas e superfícies eletródicas. (53,54) NTC, em função das suas propriedades e biocompatibilidade, são material promissor para aplicações biotecnológicas incluindo biossensores e biocélulas à combustível. Além disso, outras vantagens dos NTC provêm da sua anisotropia química e da possibilidade de realizar funcionalizações químicas (covalentes e não-covalentes), facilitadas pelas curvaturas da sua superfície, que podem ser usadas para modificações químicas seletivas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. (41)

#### **1.4 Pesticidas organoclorados: Endossulfam**

Os pesticidas organoclorados são conhecidos por serem classificados como poluentes orgânicos persistentes (POP) e desreguladores endócrinos. (10) O principal exemplo de organoclorado é o DDT. No entanto, essa classe de pesticidas também tem como membro o

endossulfam, 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexa-hidro-6,9-metano-2,4,3-benzo-dioxatiepina-3-óxido (EDS), representado na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química do endossulfam



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os produtos comerciais do EDS consistem na mistura dos isômeros  $\alpha$ -EDS: $\beta$ -EDS na proporção (70:30). (55) EDS é um inseticida e acaricida com amplo espectro de atuação aplicado nas culturas de algodão, cereais, cana-de-açúcar e café com valores de LMR entre 0,01 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup>. (56) As formulações comerciais à base de EDS cadastradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento são Dissulfan EC<sup>®</sup>, Endosulfan AG<sup>®</sup>, Endosulfan Nortox 350 EC<sup>®</sup>, Endosulfan 350 EC Milenia<sup>®</sup> e Thionex 350 EC<sup>®</sup>. (57) Segundo a ANVISA, este pesticida pertence à classe toxicológica I, classe que abrange os compostos considerados extremamente tóxicos para seres humanos. (56)

EDS tem sido empregado por mais de cinco décadas e cumpre todos os critérios para ser considerado um POP pelos protocolos da Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa (UNECE, do inglês *United Nations Economic Commission for Europe*) e pela convenção do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP, do inglês *United Nations Environment Programme*) de Estocolmo. (18) Além disso, seus espectros toxicológicos incluem genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, desregulação endócrina e neurotoxicidade. (10) Estudos têm indicado que o EDS já foi encontrado em amostras de águas superficiais implicando em risco à saúde humana e ao meio ambiente. (58) Os danos causados pelo EDS à biota aquática foram registrados em 2008 com a mortalidade de milhares de toneladas de peixes em função do despejo acidental de 8 mil litros de EDS no rio Paratinga-RJ.

(11) O acidente também colocou em risco a população daquela região que dependia diretamente da água do rio para consumo e atividade pesqueira.

O amplo espectro toxicológico do EDS levou muitos países a banirem o seu uso. No Brasil, o plano original era a gradativa descontinuidade do EDS, para que em 2013 ele fosse banido. No entanto, em decorrência da comercialização de pesticidas no mercado paralelo, o uso desse pesticida pode perdurar por muitos anos. Reforçando essa ideia, ressalta-se que o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com a produção estimada entre 2011/2012 de 588,915 milhões de toneladas. (59) Portanto, o risco de contaminação das águas naturais e do caldo de cana-de-açúcar, que é bastante consumido *in natura* nas cidades brasileiras, por EDS é potencialmente possível.

Vagi e colaboradores empregaram cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) operando a 300 °C para determinação de 17 pesticidas organoclorados (incluindo  $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS e sulfato de EDS) em amostras de sedimento marinho, utilizando extração com diclorometano empregando ultrassom. (60) Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida com fluxo de hélio a 2,2 mL min<sup>-1</sup> como gás de arraste. Na programação de aquecimento da coluna, inicialmente, a temperatura foi mantida a 80 °C por 1 minuto, seguido por aquecimento a 30 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, depois 200 °C a 5 °C min<sup>-1</sup> e depois aumentando até 260 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>; finalmente, a temperatura permaneceu constante por 6 minutos. Os valores de limite de detecção (LD) variaram entre 0,1 e 0,5 ng g<sup>-1</sup> e os percentuais de recuperação das amostras fortificadas estavam entre 91,63 e 108,89% com desvio padrão relativo (DPR) variando de 0,83 a 13,55%.

Mollahosseini e colaboradores analisaram 20 pesticidas organoclorados ( $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS) em amostras de água empregando CG-DCE aliado à microextração em fase sólida. (61) O gás de arraste foi hélio com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A coluna foi submetida a uma rampa de aquecimento para facilitar a separação de todos os analitos estudados. O injetor e o detector foram ajustados para 280 °C e 300 °C, respectivamente. Os valores de LD calculados foram 0,015 e 0,17 pg mL<sup>-1</sup> para  $\alpha$ -EDS e  $\beta$ -EDS, respectivamente. Os percentuais de recuperação ficaram entre 82 e 110% com DPR entre 4,5 e 11,8%.

A etapa de extração do analito da matriz em estudo representa uma etapa crucial dos procedimentos cromatográficos. Assim, inúmeras metodologias têm sido desenvolvidas para garantir a eficiência do método de análise. Assim, o procedimento conhecido como rápido,

fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (QuEChERS, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) tem sido aplicado com êxito para a extração de compostos pertencentes a diferentes classes de pesticidas. (62,63) No caso dos organoclorados, a abordagem realizada por Forlani e colaboradores apresentou a eficiência do método QuEChERS empregando acetonitrila,  $MgSO_4$ , NaCl e *clean-up* com amina primária-secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) para a extração de 7 pesticidas organoclorados ( $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS e sulfato de EDS) em amostras de cana-de-açúcar. (64) Os experimentos foram realizados por CG-DCE. A coluna foi de sílica fundida com 5% de fenil-metilpolisiloxano e o nitrogênio como gás de arraste a  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura do detector foi de  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  e a duração da corrida foi de 35 minutos. Os valores de LD alcançados ficaram entre  $0,003$  a  $0,006 \text{ mg L}^{-1}$  e os percentuais médios de recuperação foram de 64,5 a 99,8% com DPR de 5,1 a 17,6%, demonstrando a eficiência do método de extração.

Pesticidas organoclorados possuem capacidade de bioacumulação e já foi desenvolvido procedimento de determinação em amostras de tecido pulmonar provenientes de indivíduos levados à autópsia empregando CG-DCE e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), utilizado razões massa/carga iguais a 339, 341 e 279  $m/z$  ( $\alpha$ -EDS e  $\beta$ -EDS) e 272, 387 e 389  $m/z$  (sulfato de EDS). A investigação foi realizada por Rallir e colaboradores que empregaram dispersão da matriz em fase sólida como método de extração. (65) Realizou-se análises em amostras coletadas de 6 indivíduos e em três deles foi detectado EDS entre 1,84 e  $4,04 \text{ ng g}^{-1}$ , evidenciando a capacidade de bioacumulação.

A distribuição de pesticidas em amostras de águas naturais e de sedimento foi o agente motivador do trabalho de Kuranchie-Mensae e colaboradores que empregaram CG-DCE e extração por Soxhlet e líquido-líquido para determinar resíduos de pesticidas organoclorados, incluindo EDS. (66) As concentrações de EDS determinadas estavam entre  $0,010 \pm 0,04$  e  $0,185 \pm 0,097 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de águas naturais e entre  $0,180 \pm 0,06$  e  $1,613 \pm 0,30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  em amostras de sedimento.

Andrade e colaboradores também empregaram o método QuEChERS para a extração de resíduos de pesticidas organoclorados ( $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS e sulfato de EDS), organofosforados (monocrotofós), carbamatos (carbofurano) e tiadizinas (buprofezina) em amostras de tomate. (67) As análises foram realizadas por CG-EM (com analisador *ion trap*). O intervalo linear para todos os pesticidas foi de  $0,250$  a  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os limites de quantificação (LQ) para os

pesticidas organoclorados foram calculados entre  $0,0127 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,0362 \text{ mg kg}^{-1}$ . Nas amostras não foram encontrados resíduos dos pesticidas e os ensaios de recuperação considerando a contaminação artificial resultaram em percentuais entre 70 e 99%, com DPR entre 6 e 15%.

Boonjob e colaboradores empregaram cromatografia gasosa com espectrometria de massas sequencial (CG-EM/EM) aliada à microextração sortiva com barra de agitação magnética revertida com polidimetilsiloxano com sistema de injeção automática para a determinação de 8 pesticidas organoclorados em amostras de águas de torneira, rio, afluentes e efluentes de estação de tratamento. (68)  $\alpha$ -EDS apresentou tempo de retenção ( $t_r$ ) de 23,4 minutos e os valores de LD ficaram entre 0,3 e  $1,1 \text{ ng L}^{-1}$ . Os percentuais de recuperação calculados apresentaram valores entre  $103 \pm 7$  e  $112 \pm 5\%$ . Os autores afirmaram que o procedimento de extração não foi exaustivo e que custos elevados são fatores preponderantes.

Li e colaboradores desenvolveram procedimento de extração fundamentado na microextração líquido-líquido com dispersão da matriz em meio aquoso com surfactantes aliada à CG-DCE para analisar pesticidas organoclorados em amostras de água do mar e de córregos. (69) O menor valor de LD calculado para  $\alpha$ -EDS foi  $1 \text{ ng L}^{-1}$  ao utilizar o 2-dodecanol. As amostras reais estavam livres de pesticidas e os ensaios de recuperação com as amostras fortificadas resultaram em valores entre 95,4 e 108,6% com DPR entre 1,4 e 6,4%. As principais vantagens consideradas pelos autores foram: ausência de efeito matriz, baixa toxicidade do material empregado na extração, tempo de preparo da amostra reduzido e baixos valores de LD.

Zhou e colaboradores analisaram o conjunto composto por 8 pesticidas organoclorados incluindo  $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS e sulfato de EDS em amostras de águas de águas naturais provenientes de lago, rio e efluentes. (70) Empregou-se microextração em fase sólida com nanotubos de  $\text{TiO}_2$  juntamente com CG-DCE. Os valores de LD calculados foram 0,074, 0,04 e  $0,018 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para  $\alpha$ -EDS,  $\beta$ -EDS e sulfato de EDS, respectivamente. Os percentuais de recuperação resultaram entre  $75,4 \pm 4,3$  e  $100,0 \pm 1,4\%$ . Apesar da inovação no material para o procedimento de extração, o trabalho ficou marcado pelo uso de solvente altamente tóxico (diclorometano), elevado tempo de preparo da amostra e corrida cromatográfica no total de 65 minutos por análise.

No trabalho de Shaik e colaboradores foram desenvolvidas fibras para microextração em fase sólida baseadas em *core-shell* com polímeros de impressão molecular para analisar os isômeros de EDS em amostras de águas de rio e de efluentes sintéticos. (71) A técnica cromatográfica empregada foi CG-DCE e os valores de LD calculados para  $\alpha$ -EDS e  $\beta$ -EDS foram  $2 \text{ ng L}^{-1}$  e  $3 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente. Os percentuais de recuperação para as amostras de efluentes simulados calculados ficaram entre 99 e 104%. No entanto, nas águas de rio foram calculados valores entre 108 e 124%. Os autores sugeriram que os maiores percentuais de recuperação nas amostras de rio foram devido à lixiviação de EDS das áreas de cultivo das fazendas agrícolas pela água da chuva e também devido às plantações (não mencionadas pelos autores) se localizarem às margens do rio.

Materiais nanoestruturados também se apresentam promissores para a aplicação em procedimentos de extração. Por exemplo, He e colaboradores utilizaram CG-DCE e nanopartículas magnéticas para a extração em fase sólida de pesticidas triazínicos e organoclorados de amostras de águas subterrâneas, rios e reservatórios. (72) Os valores de LD calculados foram de  $1,4$  e  $2,34 \text{ ng L}^{-1}$  para  $\alpha$ -EDS e  $\beta$ -EDS, respectivamente. Os resultados indicaram que as amostras não estavam contaminadas e os percentuais de recuperação calculados variaram entre 63 e 97,4% com DPR entre 0,3 e 10,5%. O procedimento de extração utilizou volume reduzido de solvente (3 mL) e tempo de extração de 5 minutos, sendo um método eficiente para a etapa de pré-concentração nas análises de traços de pesticidas em amostras de águas naturais.

#### ***1.4.1 Determinação de endossulfam baseada em métodos eletroquímicos***

A primeira metodologia eletroanalítica para a determinação de EDS foi apresentada por Garcia e colaboradores, que empregaram polarografia de pulso diferencial. (73) O estudo também foi realizado para outros dois organoclorados, sulfato de endossulfam e dieldrin, em meio de tampão Britton-Robinson (BR)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo 0,2% dos surfactantes hiamine 2389 e triton X-405 a  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . A variação de pH entre 1,5 e 12,0 não revelou dependência entre potencial de pico ( $E_p$ ) e pH, indicando que etapa química envolvendo próton não faz parte do mecanismo de redução do EDS. A corrente de pico ( $I_p$ ) permaneceu praticamente constante até pH 8,0, com diminuição para valores desprezíveis em pH 11,0, sendo este comportamento

devido à hidrólise do EDS em meio básico. Para fins analíticos, selecionou-se pH 6,0. Observou-se, por voltametria cíclica (VC) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  em pH 6,0, a presença de um processo de redução irreversível em torno de  $-0,8 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$  em meio de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$  e pelos experimentos de coulometria a potencial controlado foi determinado que dois elétrons estão envolvidos na redução de EDS. A linearidade foi observada em duas regiões de concentração:  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (coeficiente de correlação (R), sensibilidade e intercepto sendo iguais a 0,999;  $7,3 \times 10^5 \text{ nA L mol}^{-1}$  e  $-0,23 \text{ A}$ , respectivamente) e  $1,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (com 0,999;  $7,6 \times 10^5 \text{ nA L mol}^{-1}$  e  $-2,1 \text{ A}$ , respectivamente). O valor de LD calculado foi de  $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Na sequência, Raviejo e colaboradores empregaram sistema similar ao mencionado para determinar os pesticidas dieldrin, heptacloro e EDS em amostras de maçã e os percentuais de recuperação para EDS foram calculados entre  $84 \pm 5$  e  $93 \pm 3\%$ . (74)

Prabu e colaboradores (75) empregaram voltametria de onda quadrada (VOQ) com etapa de pré-concentração para propor metodologia para análise de EDS em amostras de solo. Os estudos foram realizados em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ /acetonitrila (50:50, v/v) em pH 1,0 sobre eletrodo de carbono vítreo (CV) com potencial de acumulação ( $E_a$ ), tempo de acumulação ( $t_a$ ), frequência de aplicação dos pulsos de potencial ( $f$ ), amplitude dos pulsos de potencial ( $a$ ) e incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) sendo  $-0,2 \text{ V}$ ,  $300 \text{ s}$ ,  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $150 \text{ mV}$  e  $4 \text{ mV}$ , respectivamente. O voltamograma de onda quadrada apresentou um processo de redução considerado como irreversível em torno de  $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$  em meio de  $\text{NaCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . No entanto, as componentes direta e reversa apresentaram sinal eletroquímico. Segundo os autores, um processo de oxidação em torno de  $0,6 \text{ V}$  foi observado na componente reversa, que foi atribuído unicamente ao efeito do eletrólito de suporte. O mecanismo de redução proposto envolveu a remoção do átomo de cloro com a participação de um elétron formando uma espécie radicalar, sendo esta a etapa determinante da reação. Em seguida, ocorreu a adição do átomo de hidrogênio e de mais um elétron. A linearidade entre  $I_p$  e concentração de EDS foi obtida entre  $68$  e  $262 \mu\text{g L}^{-1}$  e o valor de LD foi calculado como  $5,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ . A extração de EDS do solo foi realizada com  $100 \text{ mL}$  de diclorometano em condições de refluxo por  $30$  minutos. O percentual médio de recuperação do EDS em solo foi de  $93\%$  com DPR de  $2,9\%$ .

Mathew e colaboradores desenvolveram procedimento para analisar EDS sobre eletrodo de gota estática de mercúrio empregando voltametria de pulso diferencial. A linearidade alcançada ficou entre  $0,07$  a  $1,43 \text{ ppm}$  e LD igual a  $14 \text{ ppb}$ . (76)

Manisankar e colaboradores analisaram os pesticidas EDS, isoproturon, carbendazim, o-clorofenol em célula eletroquímica acoplada a bomba peristáltica proporcionando fluxo perpendicular da solução à superfície do eletrodo de CV. (77) A técnica empregada foi VOQ com a inclusão de etapa de pré-concentração. As condições otimizadas para EDS foram  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pH 1,0,  $E_a = -0,2$  V, fluxo =  $50 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $t_a = 300$  s,  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 150$  mV,  $\Delta E_s = 4$  mV. A região de linearidade foi estabelecida entre  $1,0 \times 10^{-4}$  e  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , com LD igual a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$ . No entanto, nenhuma aplicação em amostras reais foi realizada.

Até o ano de 2004 não tinham sido desenvolvidos eletrodos modificados para análise de EDS. Neste contexto, Manisankar e colaboradores desenvolveram eletrodos de carbono vítreo modificados com polipirrol e montmorilonita de sódio empregando voltametria de pulso diferencial com etapas de pré-concentração como alternativas para analisar EDS e outros poluentes. (78) O processo de redução irreversível de EDS sobre eletrodo modificado em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pH 1,0 surgiu em torno de  $-0,3$  V. Nos estudos analíticos se empregou  $E_a = -0,2$  V e  $t_a = 15$  s. Os autores apresentam a faixa de linearidade para EDS entre 5 e 300 ppb e repetibilidade de 2,3%. No entanto, nenhuma aplicação do procedimento foi realizada.

Nos últimos anos, as estratégias para análise de EDS tem se voltado para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos indiretos. Bakouri e colaboradores concluíram que o sinal eletroquímico de oxidação do cobre era afetado por EDS. (79) Neste trabalho, utilizou-se eletrodo de pasta de carbono consistindo na mistura de grafite de grau espectroscópico, óleo mineral e 10 % de octadecil-C18. A maior intensidade de corrente foi observada em tampão BR  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0 empregando voltametria de pulso diferencial com  $E_a = -1,2$  V e  $t_a = 300$  s. Com a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  igual a  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ , observou-se diminuição linear do sinal de oxidação do cobre entre  $1,0 \times 10^{-4}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  de EDS. Os valores de LD e LQ calculados foram  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,3 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Os ensaios de recuperação foram realizados em amostras de águas superficiais contaminadas artificialmente com EDS e os percentuais de recuperação ficaram entre 98,8% e 99,2% com DPR entre 2,4 e 2,8%.

Liu e colaboradores desenvolveram um sistema complexo para detecção de EDS em amostras de águas naturais. (80) Tal sistema consistia em imunossensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono de paredes simples carboxilados, alinhados verticalmente sobre eletrodo de CV funcionalizado com 4-aminofenil e fenil, polietilenoglicol,

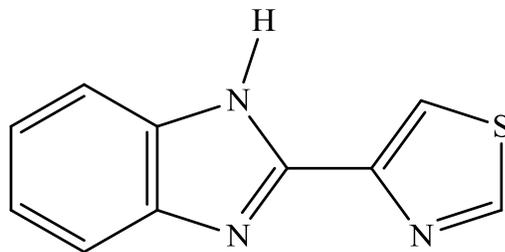
ferrocenodietilamina, hapteno de EDS e anticorpo específico para EDS. Apesar da complexidade do dispositivo, os imunossensores eletroquímicos apresentaram elevada especificidade, resultante da introdução de anticorpo específico do analito de interesse. A VOQ (parâmetros não especificados) foi empregada, com a curva analítica sendo construída entre 0,01 e 20 ppb em meio de tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0. O valor de LD calculado foi de 0,01 ppb. Os percentuais de recuperação nas amostras de água provenientes de campo irrigado, lago e torneira foram 79%, 85% e 93%, respectivamente. Apesar das vantagens apresentadas para o imunossensor desenvolvido, ficou evidente um longo tempo de análise, sendo 10 minutos de incubação e 5 minutos de aplicação de -0,9 V vs Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> em meio de NaCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> entre as medidas para garantir reprodutibilidade.

Atualmente, ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de biossensores enzimáticos para análises de pesticidas, com o estabelecimento de que a enzima acetilcolinesterase tem sua atividade afetada na presença de pesticidas organofosforados e carbamatos. (81) No entanto, os pesticidas organoclorados também afetam a atividade desta enzima e, assim, Chauhan e colaboradores desenvolveram um biossensor baseado na imobilização covalente da acetilcolinesterase sobre filmes de óxido de índio dopado com estanho (ITO, do inglês *Tin-Doped Indium Oxide*) previamente modificado com nanopartículas de óxido de ferro e nanotubos de carbono de parede múltiplas funcionalizado com grupos carboxila para a detecção dos pesticidas. (82) A imobilização covalente da enzima sobre eletrodo modificado foi confirmada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, onde se observou bandas de estiramento da carbonila (banda amida I) em 1641 cm<sup>-1</sup> e de deformação da ligação N-H (banda amida II) em 1539 cm<sup>-1</sup>, revelando que a enzima formou ligação amídica com o grupo carboxílico presente nos nanotubos de carbono. O procedimento de análise dos pesticidas consistiu na imersão do biossensor na solução de tampão fosfato pH 7,0 contendo 7,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de acetilcolina por 10 minutos, seguido pela medida amperométrica aplicando 0,4 V vs Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> em meio de KCl saturado. A concentração de EDS apresentou dependência linear com o percentual de inibição entre 0,1 e 100 nmol L<sup>-1</sup>, com LD igual a 1,0 x 10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup>. O biossensor foi eficiente para detectar os pesticidas em amostras de repolho, cebola, espinafre e solo. Contudo, os testes foram avaliados somente com o pesticida malation.

### 1.5 Pesticidas benzimidazólicos: Tiabendazol

A classe dos pesticidas benzimidazólicos, representada principalmente pelo carbendazim e tiabendazol, apresentam estabilidade frente à radiação solar, com estes compostos podendo resistir à fotodegração quando presentes no meio ambiente. (12) No trabalho de Gama e colaboradores foi apresentado inventário de agrotóxicos e o risco de contaminação da água no Estado do Ceará. (83) O inventário apontou tiabendazol, 2-(4-tiazolil)-1 H-benzimidazol (TBZ), como uma das substâncias prioritárias em estudos de monitoramento ambiental. A estrutura química do fungicida TBZ pode ser vista na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química do tiabendazol



Fonte: Elaborada pelo autor.

TBZ também tem sido considerado como um poluente emergente. (84) A preocupação com a contaminação de amostras de águas por TBZ motivou os estudos de degradação deste composto. (85,86) No Brasil, TBZ tem uso permitido pela ANVISA para aplicação em diversas culturas com LMR entre 0,01 e 10,0 mg kg<sup>-1</sup>, estando incluído na classe toxicológica IV. (87) No comércio de insumos agrícolas no Brasil, TBZ é o princípio ativo das formulações Maxin advanced<sup>®</sup> e Tecto SC<sup>®</sup>. (57) Os danos causados aos seres humanos pelo TBZ consistem em problemas hepáticos, anemia e tireóide, estando associado a interferências da atividade estrogênica. (88,89)

Jalil e colaboradores relataram que as soluções de TBZ são empregadas na lavagem dos frutos após a colheita e, além da enorme possibilidade de contaminação dos frutos, efluentes com concentração da ordem de 1 ppm podem alcançar as águas naturais, prejudicando sua qualidade e afetando o ecossistema aquático devido à capacidade de acumulação do TBZ. (90)

Nos últimos anos, o desenvolvimento de metodologias para a determinação de TBZ e de outros pesticidas pertencentes à classe dos benzimidazóis potencializou o uso das técnicas cromatográficas aliadas a diferentes métodos de extração do analito de interesse. Por outro lado, diversas metodologias também foram empregadas para a determinação de TBZ, incluindo imunoenaios, eletroforese, fosforometria, espectrofotometria, espectrometria de massas e espectroscopia Raman. (91 - 97)

Asensio-Ramos e colaboradores realizaram a extração de TBZ, carbendazim, benomil, fuberidazol, carbaril e triazofós em amostras de solo por meio da microextração com dispersão líquido-líquido empregando metanol e líquido iônico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio. (98) Os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C18 e detector de fluorescência. A fase móvel consistiu da mistura de acetonitrila e tampão fosfato 0,010 mol L<sup>-1</sup> pH 8,70. O tempo de corrida cromatográfica foi 20 minutos. Os menores valores de LD e de LQ calculados para TBZ foram 1,21 e 4,03 ng g<sup>-1</sup> e os percentuais de recuperação para TBZ nas amostras de solo, após fortificação em diferentes níveis de concentração, variaram entre 80 e 117%. Walorczyk e colaboradores analisaram 160 pesticidas incluindo TBZ em amostras de vinho. (99) A análise de multirresíduos foi viabilizada pela dispersão da matriz em fase sólida em conjunto com CG-EM/EM. Neste procedimento, TBZ foi identificado somente 16,4 minutos após o início da corrida cromatográfica com LQ igual a 0,01 mg kg<sup>-1</sup>. Os percentuais de recuperação variaram entre 89±4 e 95±13%.

Chen e colaboradores fizeram uso da cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLUF-EM/EM) para o procedimento de determinação de 19 pesticidas, incluindo TBZ, em amostras de águas de rio, estação de tratamento, solo, sedimento e lodo. (100) Os métodos de extração empregados foram: extração em fase sólida (amostras de água) e ultrassônica (amostras de solo, sedimento e lodo). TBZ foi analisado pelo íon de razão  $m/z$  131,1 com  $t_r = 3,6$  minutos, em coluna C18. Os autores relataram que TBZ foi encontrado nas amostras de efluente e afluentes de estações de tratamento e lodo, indicando a tendência de acumulação de TBZ no meio ambiente e a sua resistência aos processos de degradação bióticos e abióticos. Os valores de LD calculados variaram entre 0,01 e 0,11 ng L<sup>-1</sup> e os de LQ variaram entre 0,04 e 0,35 ng L<sup>-1</sup>. Os percentuais de recuperação foram estabelecidos entre 93±3 e 125±12%.

Santaladchaiyakit e colaboradores empregaram a extração em ponto de nuvem com o surfactante triton X-114 assistida com ultrassom e combinada com CLAE com detector de redes de fotodiodo para extração de TBZ, oxfendazol, mebendazol, albendazol e febendazol em amostras de águas (rio, lago, torneira e água potável) e leite. (101) A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 com detector operando a 296 nm. Para TBZ, o valor de LD calculado foi de  $5,0 \text{ ng L}^{-1}$  e o procedimento se mostrou eficiente com percentuais de recuperação variando entre 89,3 e 110,7% (DPR entre 0,5 e 5,1%) para as amostras de águas e entre 77,7 e 112,9% (DPR entre 0,2 e 6,1%) para amostras de leite.

Amostras de sucos de frutas também foram objeto de estudo empregando técnicas cromatográficas para a determinação de pesticidas benzimidazólicos. Com muita frequência, na prática da indústria alimentícia, estes compostos são empregados no tratamento pós-colheita dos produtos agrícolas para evitar a contaminação por fungos, mas, desta forma, os pesticidas podem penetrar nos frutos acarretando riscos à saúde humana. Deng e colaboradores determinaram traços de TBZ e de carbendazim em sucos de uva, pêssigo, laranja e pera. (102) O método de extração em fase sólida com partículas magnéticas juntamente com CLAE acoplada a detector de fluorescência foi utilizado para a detecção, resultando em valores de LD e de LQ iguais a 0,14 e  $0,5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Os percentuais de recuperação para amostras fortificadas em três níveis diferentes de concentração variaram entre  $86 \pm 8$  e  $96 \pm 6\%$ .

Boeris e colaboradores analisaram propoxur, carbaril, carbendazim, fubenridazol e TBZ em amostras de tomate, sucos de laranja e de uva, limão e tangerina. A extração dos pesticidas foi realizada com metanol. (103) O método de separação empregado foi CLAE com detector de rede de diodos operando com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm. Os autores realizaram estudos quimiométricos para assegurar a separação dos componentes das amostras. Os valores de LD e de LQ calculados para TBZ foram 0,9 e  $2,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. As amostras foram fortificadas em quatro diferentes níveis de concentração e os percentuais de recuperação variaram entre  $90,22 \pm 2,1$  e  $137,41 \pm 45\%$ .

### ***1.5.1 Determinação de tiabendazol baseada em métodos eletroquímicos***

Existem poucos relatos na literatura acerca de estudos eletroquímicos de TBZ. Os primeiros resultados foram baseados em polarografia de pulso diferencial. O procedimento de

análise foi baseado na determinação indireta do TBZ. Inicialmente, o mercúrio era oxidado a  $\text{Hg}^{2+}$ , seguido pela etapa química de formação da espécie  $\text{Hg}(\text{TBZ})_2$ . O eletrólito empregado foi tampão BR pH 8,0. O valor de LD calculado foi  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-6}$  e o percentual de recuperação de TBZ em amostras de laranja, limão e uva foi de 70% com DPR de 2,9%. (104)

Na sequência, Msagati e colaboradores realizaram estudos eletroquímicos relativos aos compostos TBZ, mebendazol, albendazol, febendazol e oxibendazol empregando VOQ e eletrodo de disco rotatório de CV modificado com poli-(3-metiltiofeno). (105) As condições otimizadas foram tampão BR pH 4,93 e velocidade de rotação 3000 rpm. Observou-se processo de redução para TBZ em torno de  $-3,5 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$  em meio de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ , que teve seu valor de  $I_p$  intensificado pela modificação do eletrodo com este polímero condutor. O procedimento apresentou sensibilidade de  $3,36 \times 10^{-7} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$  e valor de LD de  $3,39 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Prada e colaboradores estudaram o comportamento eletroquímico dos compostos febendazol, albendazol, mebendazol e TBZ sobre CV. (106) Os estudos foram realizados em (A)  $\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (B) mistura etanol-água contendo  $\text{NaClO}_4 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (70:30, v/v) e (C) mistura acetonitrila-água contendo  $\text{NaClO}_4 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (70:30, v/v). Os experimentos de VOQ para TBZ apresentaram um único processo de oxidação irreversível com  $E_p$  igual a 0,86, 1,39 e 1,50  $\text{V vs Ag/AgCl/Cl}^-$  em meio de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ , nos eletrólitos A, B e C, respectivamente. No entanto, não foi apresentada nenhuma informação acerca da provável região de oxidação da molécula do TBZ. Os autores realizaram experimentos de injeção em fluxo com detector amperométrico nos potenciais de 1,6 V para os eletrólitos etanol-água contendo  $\text{NaClO}_4 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (70:30, v/v) e acetonitrila-água contendo  $\text{NaClO}_4 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (70:30, v/v) e 0,9 V quando foi empregado o eletrólito  $\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores de LD e de sensibilidade para TBZ variaram entre  $2,1 \times 10^{-7}$  e  $6,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $6,2 \times 10^{-3}$  e  $31,3 \times 10^{-3} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ , respectivamente.

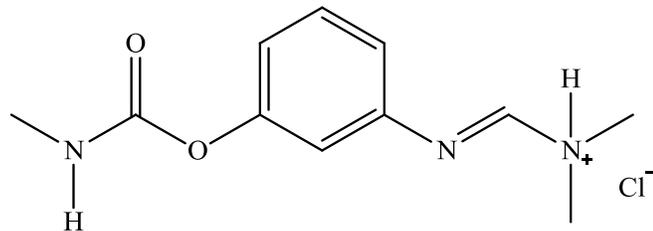
Neste contexto, chega-se à conclusão de que existe a necessidade de estudar o comportamento eletroquímico do TBZ de modo mais detalhado, pois TBZ tem sido considerado como poluente emergente e as reações que ocorrem com os poluentes emergentes no meio ambiente ou no corpo humano são semelhantes aos processos eletroquímicos que acontecem na superfície do eletrodo. Do ponto de vista de desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos

para TBZ, o emprego de EDDB, eletrodos modificados com NTC e biossensores enzimáticos podem ser promissores para a determinação de TBZ em amostras complexas.

### 1.6 Pesticidas carbamatos: Cloridrato de formetanato

Dentre os pesticidas com uso permitido no Brasil, os carbamatos representam elevado risco, pois estes apresentam neurotoxicidade acentuada em seres humanos devido à capacidade de inibirem a atividade da enzima acetilcolinesterase. (107,108) Formetanato, cloridrato de 3-dimetilaminometileno aminofenil metilcarbamato (FMT), pertencente à classe toxicológica I (classe que abrange os compostos considerados extremamente tóxicos para seres humanos), atua como inseticida e acaricida, podendo ser empregado nas culturas de manga, uva, batata, cebola, citros, feijão, tomate, beringela, melancia, crisântemo e pimentão, com valores de LMR entre 0,02 e 2,0 mg kg<sup>-1</sup>. (109) A Figura 5 apresenta a estrutura química do FMT.

Figura 5– Estrutura química do cloridrato de formetanato



Fonte: Elaborada pelo autor.

No Brasil, a formulação Dicarzol 500 SP<sup>®</sup> é a que contém FMT como princípio ativo. (57). FMT possui dois grupos funcionais que desempenham papel fundamental na atuação como acaricida e inseticida. O grupo formamidina compete com o neurotransmissor octadopamina, enquanto que o grupo carbamato inibe a atividade da acetilcolinesterase. (110)

Os procedimentos analíticos para determinação de FMT, na última década, desconsiderando as técnicas eletroquímicas deu-se unicamente por métodos cromatográficos (111 - 114), embora métodos espectrofotométricos tenham sido empregados nos anos de 1990. (115,116)

Wang e colaboradores utilizaram cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) para detectar 13 pesticidas, incluindo FMT em alimentos infantis à base de maçã e soja. (111,112) A separação dos analitos ocorreu na coluna C18 e os solventes empregados para a fase móvel foram: acetonitrila, acetato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e água, sendo a eluição por gradiente. A extração dos pesticidas foi realizada com acetonitrila, seguida por etapas de *clean-up* e pré-concentração. FMT apresentou como valores de  $t_r$  e LD 6,21 minutos e 0,1 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Os percentuais de recuperação das amostras fortificadas artificialmente variaram entre 25,9 e 95,3 % com DPR entre 2,4 e 24,5%.

Podhorniak e colaboradores vislumbraram a possibilidade de aplicar o método QuEChERS seguido por *clean-up* para extração de FMT em amostras de maçã, pera, laranja, pêssigo e nectarina (113), com detecção por CLAE-EM e CLAE-EM/EM. A coluna empregada foi a de fase reversa e os solventes para a fase móvel foram metanol, água e acetato de amônio 0,01 mol L<sup>-1</sup>. O espectro de massa foi adaptado para o modo positivo de ionização por *electrospray*. Os íons monitorados apresentavam as seguintes razões carga/massa: 222,1; 165,5 e 120  $m/z$  (CLAE-EM) e 92,8 e 164,9  $m/z$  (CLAE-EM/EM). Valores de LD calculados foram iguais a 3,33 ng g<sup>-1</sup> e a 0,1 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, confirmando que o uso de detecção de massas sequencial promove menores níveis de detecção. As recuperações das amostras fortificadas variaram entre 79 e 121% com DPR entre 0,7 e 14%.

Rajski e colaboradores avaliaram a presença de 113 pesticidas, incluindo FMT, em amostras de abacate e amêndoas, cujos extratos foram obtidos por QuEChERS com uma série de estratégias para *clean-up* das amostras por extração em fase sólida. (114) A quantificação foi realizada por CLAE-EM/EM, com a coluna empregada sendo a C8 e os solventes para a fase móvel sendo acetonitrila e água contendo 0,1 % de ácido fórmico. FMT apresentou  $t_r = 2,97$  minutos e valor de LQ igual a 10 µg kg<sup>-1</sup>, com percentuais de recuperação variando entre 80 e 92% e DPR entre 2 e 3%. Com esses valores, tem-se eficiência do método em termos de precisão e de exatidão, demonstrando que, além do procedimento de extração, a etapa de *clean-up* garante o sucesso do procedimento de análise.

### 1.6.1 Determinação de formetanato baseada em métodos eletroquímicos

Os pesticidas carbamatos possuem estrutura química susceptível a reações redox, possibilitando o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para análise direta desses compostos. (117) Nos últimos anos, a análise de pesticidas carbamatos por técnicas eletroquímicas tem se mostrado promissora, empregando como superfícies eletródicas eletrodos de gota pendente de mercúrio, CV, EDDB e eletrodos modificados. (118 - 120)

No entanto, a literatura é escassa com relação a estudos eletroquímicos de FMT. O único trabalho encontrado é o de Subbalakshamma e colaboradores que estudaram o comportamento eletroquímico do FMT sobre mercúrio empregando polarografia de pulso diferencial (121), que, em meio de  $\text{HClO}_4$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , apresentou processo de redução irreversível em torno de  $-0,8 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$  em meio de KCl saturado. O mecanismo proposto pelos autores envolve a redução do grupo formamidina com a participação de dois elétrons. A região de linearidade foi definida entre  $1,25 \times 10^{-9}$  e  $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Contudo, os autores não apresentaram o valor de LD. O procedimento desenvolvido foi aplicado em amostras de formulações comerciais para aplicação agrícola à base de FMT e os percentuais de recuperação variaram entre  $97,98 \pm 0,08$  e  $99,05 \pm 0,082\%$ .

Oliveira e colaboradores desenvolveram biossensor baseado na imobilização da enzima Lac (*Trametes versicolor*) sobre eletrodo de pasta de carbono dopado com grafeno e funcionalizado com filme de azul da prússia para analisar individualmente carbaril, carbofurano, ziram, pirimicarbe e FMT em amostras de tomate e de batata, empregando o método QuEChERS no preparo das amostras. (122) Esse estudo se baseou na capacidade dos pesticidas carbamatos inibirem a atividade enzimática da Lac frente à oxidação do substrato cloridrato de 4-aminofenol (4-AF.HCl). As condições otimizadas foram tampão BR pH 5,0, concentração do substrato  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Os valores de LD e de LQ para FMT foram  $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,045 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Os percentuais de recuperação variaram entre  $91,0 \pm 0,1$  e  $97,1 \pm 0,3 \%$ . Esses resultados indicam que a Lac, que possui custo menor que a acetilcolinesterase (nos dias de hoje: R\$0,022/Unidade e R\$1,51/Unidade), respectivamente, pode ser empregada para o desenvolvimento de biossensores para a determinação de pesticidas em amostras complexas.

Na sequência, Oliveira e colaboradores também analisaram os pesticidas carbaril e FMT em amostras de frutas cítricas (limão, laranja e tangerina) empregando biossensor bi-enzimático a partir de Lac e Tir, contendo nanopartículas de ouro, quitosana e pasta de carbono dopado com grafeno. (123) Os autores concluíram que o valor da constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para os dispositivos com Lac, Tir e Lac-Tir foram 37,8; 52,3 e 26,9, respectivamente, indicando, assim, que 4-AF.HCl apresentou maior afinidade pelo sistema bi-enzimático. Os valores de LD e de LQ calculados para FMT foram  $0,048 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,158 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Estes foram maiores que os limites calculados no trabalho anterior dos mesmos autores, indicando que a utilização somente da enzima Lac é mais promissora que o sistema bi-enzimático Lac-Tir. Os percentuais médios de recuperação das amostras previamente fortificadas foram superiores a 95%.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver sensores e biossensores enzimáticos para a determinação de pesticidas em amostras de alimentos e águas naturais, visando contribuir para a segurança alimentar e minimizar danos à saúde pública.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver metodologia eletroanalítica para a determinação de EDS sobre HMDE;
- ✓ Construir eletrodo modificado com NTCPMF e FcM;
- ✓ Construir biossensores eletroquímicos baseados na enzima lacase e em NpAu, NTCPMF e FcM;
- ✓ Desenvolver metodologia eletroanalítica para a determinação de TBZ e FMT sobre EDDB e eletrodo modificado com NTCPMF e FcM;
- ✓ Desenvolver metodologia eletroanalítica para a determinação de EDS, TBZ e FMT sobre biossensor baseado na enzima lacase;
- ✓ Estabelecer mecanismo redox do EDS, TBZ e FMT;
- ✓ Aplicar a metodologia eletroanalítica na determinação de EDS em amostras de cana-de-açúcar, tomate e de águas naturais;
- ✓ Aplicar a metodologia eletroanalítica na determinação de TBZ em amostras de cana-de-açúcar, manga e de águas naturais;
- ✓ Aplicar a metodologia eletroanalítica na determinação de FMT em amostras de manga e de uva.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Os estudos contidos no presente trabalho foram realizados no Grupo de Eletroquímica e Corrosão (GELCORR) da Universidade Federal do Ceará e no Grupo de Reações e Análises Químicas (GRAQ) do Instituto Superior de Engenharia do Porto, por meio de estágio de doutorado sanduíche na cidade do Porto-Portugal.

#### 3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos utilizados apresentaram pureza analítica e uma lista com as suas respectivas fórmulas químicas, procedências e purezas, pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes químicos utilizados, com suas respectivas fórmulas químicas, procedência e pureza

Reagentes	Fórmula Química	Procedência	Teor
<b>2,2''-Azino-bis (3- etilbenzotiazolino-6- sulfônico)</b>	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	Sigma-Aldrich	99,0%
<b>Acetonitrila</b>	$CH_3CN$	Vetec	99,8%
<b>Ácido acético</b>	$CH_3COOH$	Vetec	99,7%
<b>Ácido bórico</b>	$H_3BO_3$	Vetec	99,5%
<b>Ácido cloroáurico</b>	$HAuCl_4$	Sigma-Aldrich	99,99%
<b>Ácido clorídrico</b>	$HCl$	Vetec	37%
<b>Ácido nítrico</b>	$HNO_3$	Vetec	65%
<b>Ácido fosfórico</b>	$H_3PO_4$	Vetec	85%
<b>Ácido sulfúrico</b>	$H_2SO_4$	Vetec	95%
<b>Citrato de sódio</b>	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Vetec	99%
<b>Cloridrato de formetanato</b>	$C_{11}H_{15}N_3O_2 \cdot HCl$	Sigma-Aldrich	99,6%
<b>Cloreto de potássio</b>	$KCl$	Vetec	99%
<b>Cloreto de sódio</b>	$NaCl$	Vetec	99%
<b>Dimetilformamida</b>	$C_3H_7ON$	Vetec	99,8%

Continua: Tabela 1 – Reagentes químicos utilizados, com suas respectivas fórmulas químicas, procedência e pureza

<b>Endossulfam</b>	$C_9H_6Cl_6O_3S$	Sigma-Aldrich	99,9%
<b>Ftalocianina de Cobalto</b>	$C_{32}H_{16}CoN_8$	Sigma-Aldrich	97%
<b>Glutaraldeído</b>	$C_5H_8O_2$	Sigma-Aldrich	25%
<b>Hidróxido de sódio</b>	NaOH	Vetec	98%
<b>Lacase</b>	-	Sigma-Aldrich	0,5 U mg <sup>-1</sup>
<b>Nafion<sup>®</sup></b>	-	Sigma-Aldrich	10%
<b>Nanotubos de carbono de paredes múltiplas</b> Diâmetro = 6-9 nm Comprimento = 5 µm	C	Sigma-Aldrich	95%
<b>Sulfato de magnésio</b>	$MgSO_4$	Sigma-Aldrich	99,5%
<b>Tiabendazol</b>	$C_{10}H_7N_3S$	Riedel-de Haën	99,6%

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gás nitrogênio ( $N_{2(g)}$ ) utilizado nos experimentos eram de procedência White Martins (pureza 99,996%) e Linde Sogás (pureza 99,999%).

As soluções empregadas como eletrólito de suporte consistiram em solução tampão BR preparada pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico. (124) O ajuste do pH desejado foi realizado pela adição de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Solução tampão fosfato preparada pela mistura de fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico, solução tampão acetato preparada pela mistura de ácido acético e acetato de sódio, solução tampão McIlvaine preparada pela mistura de ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico e tampão Sörensen preparado pela mistura de glicina e ácido clorídrico. (125) A concentração de cada componente dos tampões mencionados foi 0,04 mol L<sup>-1</sup>.

As soluções dos substratos específicos para a enzima Lac foram preparadas a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. As soluções estoque dos pesticidas EDS, TBZ e FMT foram preparadas pela pesagem da quantidade adequada de cada composto e posterior solubilização em acetonitrila (EDS e TBZ) e em água purificada (FMT). As soluções foram preparadas a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e, quando necessário, diluídas para  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>,  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram mantidas ao abrigo da luz e sob refrigeração em torno de 4 °C.

### 3.2 Instrumentação

Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando potenciostato/galvanostato PGSTAT 101, 128N (Autolab, Eco Chemie) e PGSTAT 30 (Autolab, Eco Chemie) controlados por computador, empregando os programas NOVA 1.8, 1.9 e GPES (*General Purpose Electrochemical System*) versão 4.9, respectivamente. Para experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram usados potenciostatos/galvanostatos PGSTAT128N (Autolab, Eco Chemie) e PGSTAT 30 (Autolab, Eco Chemie), controlados por computador, com auxílio do programa FRA (*Frequency Response Analysis*) versão 4.9.

Para a caracterização física dos eletrodos foram utilizados microscópio eletrônico de varredura Vega XMU (Tecsan, Inc.) e microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo Supra 35-VP (Carl Zeiss) As análises de espectroscopia Raman foram realizadas com espectrofotômetro HR550 (Horiba Jobin Yvon) equipado com laser de íon argônio de comprimento de onda 514,5 nm e microscópio óptico BX41 (Olympus).

Espectrofotômetro Cary 1E (Varian) com células de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm foi utilizado para as medidas de espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis). As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo modelo 20A Prominence (Shimadzu) provido de detector de arranjos de diodo (SPD-M20A), duas bombas (LC-20AT), forno (CTO-20A), desgaseificador (DGU-20A<sub>3</sub>) e coluna de fase reversa C18 (Hichrom5) com 250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm.

Experimentos de CG-EM foram realizados em cromatógrafo GMMS-QP2010 (Shimadzu) controlado por computador e pelo programa Labsolution GC-MSsolution versão 2.30. A coluna capilar empregada foi DB5-MS (J&W Scientific) (100 % de metilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., filme de espessura de 0,25 µm). O volume de injeção foi 1 µL, com hélio como gás de arraste a 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

Para agitação das soluções antes dos experimentos voltamétricos utilizou-se agitador 78HW-1 (Biomixer). O preparo das soluções e a limpeza dos eletrodos foram auxiliados pelo banho de ultrassom 03350 (Quimis). No preparo das amostras foram empregadas as centrífugas Sartorius 2.16 (Sigma) e Q222T204 (Quimis) e os rotaevaporadores B-940 (Büchi) e Q344M2 (Quimis). As amostras de alimentos foram trituradas com auxílio do *mixer* BHB 986 (Bluesky).

Todas as pesagens foram realizadas utilizando balanças analíticas TB-215D (Denver Instrument) e M5205DV (Mettler Toledo AG), ambas com precisão de  $\pm 0,01$  mg. As medidas de pH foram realizadas em pHmetros B474 (Micronal) e GLP 22 (Crison). A água empregada para preparação das soluções e lavagem das vidrarias foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore), apresentando resistividade 18,2 M $\Omega$  cm.

### 3.2.1 Sistema eletroquímico

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se célula eletroquímica convencional em vidro com tampa em Teflon<sup>®</sup> e orifícios para posicionamento dos eletrodos e para adição de alíquotas do analito.

### 3.2.2 Eletrodos

Os eletrodos de trabalho utilizados foram: eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*) de área geométrica ( $A_{\text{geo}}$ ) de 0,52 mm<sup>2</sup>, VA Stand 663 (Metrohm). O segundo foi o EDDB, fabricado pelo *Centre Suisse d'Electronique et d'Microtechnique*, Neuchâtel, Suíça, com teor de boro de 8000 ppm e  $A_{\text{geo}}$  de 0,265 cm<sup>2</sup>. (126,127) O terceiro foi de CV na forma de disco (Metrohm) com  $A_{\text{geo}}$  de 0,0314 cm<sup>2</sup>, utilizado como superfície para a modificação com NTCPM, FcM e enzima. O quarto eletrodo empregado foi o de ouro policristalino (Au), também na forma de disco, com  $A_{\text{geo}}$  de 0,020 cm<sup>2</sup> (BASi), para a construção do biossensor eletroquímico. Os eletrodos auxiliares consistiam em placa de platina (99,5 %, Heraeus Vectra do Brasil Ltda.) com  $A_{\text{geo}}$  igual a 1,03 cm<sup>2</sup> embutida em tubo de vidro e fixada com resina Araldite<sup>®</sup> e cilindro de CV com 65 mm de comprimento e diâmetro de 2 mm (Metrohm). Por último, eletrodo de Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> em meio de KCl saturado foi utilizado como referência.

### 3.3 Preparação dos sensores eletroquímicos

#### 3.3.1 Eletrodo de diamante dopado com boro

Antes de iniciar os experimentos voltamétricos, EDDB foi submetido a um pré-tratamento para limpeza e condicionamento da superfície eletródica. Para isso, o eletrodo foi polarizado anodicamente em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  aplicando o potencial de  $3,0 \text{ V}$  por  $30 \text{ s}$ . Em seguida, após a troca por uma nova solução e a lavagem dos eletrodos com água purificada, EDDB foi polarizado catodicamente aplicando-se  $-3,0 \text{ V}$  por  $60 \text{ s}$ . (128)

#### 3.3.2 Eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas

Antes da preparação do eletrodo modificado, a funcionalização dos NTCPM foi realizada empregando tratamento ácido. O procedimento consistiu em misturar  $500 \text{ mg}$  de NTCPM com  $250 \text{ mL}$  de solução nitrante constituída por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3$  concentrados na proporção  $3:1 \text{ v/v}$ . (129) Essa mistura ficou sob agitação magnética moderada por  $4 \text{ horas}$ . Em seguida, a amostra de nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados (NTCPMF) foi filtrada a vácuo, sendo lavada com água purificada e secada em forno tipo mufla por  $12 \text{ horas}$  a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . (130)

As suspensões foram preparadas em NTCPMF  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  com cada FcM a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  empregando dimetilformamida (DMF) como solvente na presença de Nafion<sup>®</sup>  $0,5 \%$  (Naf.  $0,5\%$ ). Para auxiliar a formação de suspensão homogênea, a mistura foi posta em banho de ultrassom por  $30 \text{ minutos}$ .

Para a preparação do eletrodo modificado, inicialmente, foi realizada uma etapa de limpeza do CV. O procedimento de limpeza consistiu em polimento do eletrodo em suspensão de pasta diamante  $3 \text{ }\mu\text{m}$ , seguido por jateamento de água na superfície do eletrodo. Na sequência, o eletrodo foi levado ao banho de ultrassom em meio de acetona e depois em água purificada, ambos por  $3 \text{ minutos}$ . No final da limpeza, o restante de água foi removido da superfície do CV pela passagem de  $\text{N}_{2(\text{g})}$  por  $10 \text{ s}$ . Em seguida, uma alíquota de  $0,5 \text{ }\mu\text{L}$  de uma das suspensões (Naf.  $0,5\%$ , NTCPM-Naf.  $0,5\%$ , NTCPMF-Naf.  $0,5\%$ , NTCPMF-FcCo-

Naf.0,5%, NTCPMF-FcFe-Naf. 0,5% e NTCPMF-FcNi-Naf.0,5%) foi gotejada sobre a superfície do CV. Finalmente, a secagem ocorreu à temperatura ambiente ( $26\pm 1$  °C) por 1 hora.

### ***3.3.3 Preparação do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas***

O primeiro biossensor eletroquímico foi construído a partir da adição de 2  $\mu\text{L}$  da solução composta da mistura de igual volume de solução de Lac 5  $\text{mg mL}^{-1}$  (condição otimizada, correspondendo a 68 mU da enzima) e glutaraldeído 2% (Glu 2%) sobre a superfície do eletrodo de CV previamente modificado com NTCPMF e FcCo, de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.2. Em seguida, o dispositivo foi levado ao dessecador para secagem à temperatura ambiente ( $26\pm 1$  °C) por 1 hora. Na sequência, o biossensor foi imerso em tampão BR pH 5,0 por 10 minutos e depois estocado a 4 °C até sua utilização. O mesmo procedimento de lavagem e estocagem foi realizado após o término dos experimentos em cada dia de trabalho. O estudo foi realizado empregando o 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) como substrato. Após a adição do substrato a célula eletroquímica, o sistema foi deixado em repouso por 30 minutos para estabilizar a resposta do ABTS sobre o biossensor.

### ***3.3.4 Preparação do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase e nanopartículas de ouro***

O segundo biossensor eletroquímico foi preparado pela imobilização da Lac sobre eletrodo de Au modificado com NpAu. Antes da modificação, o eletrodo de Au foi polido em alumina 0,3  $\mu\text{m}$  e 0,05  $\mu\text{m}$  e levado ao banho de ultrassom por 5 minutos em água purificada. Em seguida, o eletrodo foi imerso em solução piranha ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1:3, v/v) por 10 minutos. Então, realizou-se limpeza eletroquímica por VC na faixa de  $-0,2$  a  $1,5$  V a  $100$   $\text{mV s}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5  $\text{mol L}^{-1}$  até a obtenção de perfil característico.

Finalmente, NpAu foram eletrodepositadas em  $-0,2$  V em solução de  $\text{HAuCl}_4$   $1,0 \times 10^{-3}$   $\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$  previamente desaerada com  $\text{N}_{2(\text{g})}$  por 10 minutos, para obtenção do eletrodo Au/NpAu. O tempo de eletrodeposição foi variado entre 60 e 250 s. O estudo da otimização da obtenção das NpAu foi realizado a partir da avaliação do efeito do tempo de

eletrodeposição sobre a intensidade da  $I_p$  para a mistura equimolar de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu.

Após a eletrodeposição das NpAu, a superfície do eletrodo foi seca pela passagem de  $N_{2(g)}$ . Depois, alíquota de  $5 \mu\text{L}$  da solução contendo Lac  $12,4 \text{ mg mL}^{-1}$  foi depositada sobre Au/NpAu, seguida pela adição de  $5 \mu\text{L}$  da solução de Glu 2% para promover a imobilização da enzima, (131,132) evitando sua lixiviação para a solução eletrolítica, no momento da realização dos experimentos voltamétricos. Glu tem a capacidade de fazer ligações cruzadas com proteínas (*cross-linking*), sendo eficiente para imobilização de biomoléculas. (133) Dando continuidade, o biossensor eletroquímico Au/NpAu/Lac-Glu.2% foi deixado sob refrigeração por 12 horas. Finalmente, após a secagem, o eletrodo foi lavado com tampão BR pH 5,0 e estocado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  até sua utilização. O mesmo procedimento de lavagem e estocagem foi realizado sempre após o término dos experimentos em cada dia de trabalho.

### 3.4 Metodologia

VC foi empregada para avaliar o comportamento eletroquímico das moléculas em estudo. VOQ foi utilizada no desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos. (31) Para os experimentos realizados para EDS sobre HMDE foram adicionados 20 mL do eletrólito de suporte à célula eletroquímica e, em seguida, a solução foi desaerada com  $N_{2(g)}$  por 10 minutos. Esse procedimento foi realizado para evitar a ocorrência da reação de redução do oxigênio na superfície do mercúrio que, conseqüentemente, competiria com a resposta eletroquímica da espécie de interesse. Para os demais sistemas, foram adicionados 10 mL do eletrólito de suporte.

Após estabelecimentos das condições otimizadas, as curvas analíticas em eletrólito de suporte foram construídas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica. Os experimentos de recuperação nas amostras reais foram realizados empregando o método da adição de padrão.

EIE foi empregada para avaliar o comportamento redox e o efeito da modificação da superfície do CV com NTCPMF e com FcM na resposta eletroquímica do TBZ. Para tal, usou-se TBZ  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR. Para a caracterização do biossensor eletroquímico baseado em Lac, os experimentos de EIE foram realizados em  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . (134,135)

Os resultados obtidos pelo procedimento eletroanalítico para TBZ foram comparados com os obtidos por UV-Vis em 302 nm e por CLAE, com a fase móvel operando em modo isocrático, consistindo na mistura de tampão fosfato pH 3,5 e metanol na proporção (54:46, v/v) e a coluna mantida a 30 °C. O fluxo da fase móvel foi 1,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de amostra foi 20 µL. O detector operou com dois diferentes comprimentos de onda: 254 nm e 300 nm. (136)

Para auxiliar na elucidação do mecanismo de oxidação do TBZ foram realizados experimentos de CG-EM, em que o volume de injeção foi 1 µL e o gás de arraste foi hélio a 0,7 mL min<sup>-1</sup>. A programação de aquecimento do forno teve início em 60 °C por 1 minutos; em seguida, a temperatura foi elevada a 290 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 3 minutos. O detector de EM operou no modo SCAN a 300 °C e o método de ionização empregado foi o de impacto de elétrons com corrente de emissão de 70 eV.

### **3.5 Aplicação da metodologia eletroanalítica**

#### ***3.5.1 Determinação de endossulfam em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais***

As amostras foram adquiridas na região metropolitana de Fortaleza-CE. Inicialmente, as amostras de cana-de-açúcar foram trituradas em moedor mecânico e o caldo obtido foi filtrado com papel quantitativo (porosidade 28 µm, permeabilidade 55 L/s m<sup>2</sup>). O material filtrado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi misturado com etanol de pureza analítica na proporção 1:1. Então, uma alíquota foi adicionada à célula eletroquímica contendo eletrólito de suporte. As amostras de tomate foram trituradas com auxílio de *mixer*. Na sequência, empregou-se procedimento semelhante ao descrito para o caldo de cana-de-açúcar.

As amostras de águas naturais foram coletadas no açude Pacajus, localizado na cidade de Pacajus-CE, que é responsável pelo abastecimento de água para a região metropolitana de Fortaleza. A segunda amostra de água foi coletada do açude Acarape do Meio, localizado na cidade de Redenção-CE. Esta última se trata de área urbana marcada pelo alto grau de poluição, devido ao descarte de esgoto doméstico e às práticas agrícolas, tais como cultivo de banana, feijão e milho. As amostras de água foram coletadas em frascos, filtradas com auxílio de filtro de fibras de vidro de 0,45 µm de porosidade e mantidas sob refrigeração ( $\pm 5$  °C). Para os

experimentos, as amostras de água foram utilizadas para a preparação do eletrólito de suporte. Os experimentos voltamétricos foram realizados sem a necessidade de etapas de pré-tratamento da amostra. Os estudos foram realizados sobre as superfícies: HMDE e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%.

### ***3.5.2 Determinação de tiabendazol em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais***

As amostras de cana-de-açúcar e águas naturais passaram pelo procedimento semelhante ao descrito na seção 3.5.1. As amostras de manga para análises foram adquiridas em supermercado na região metropolitana de Fortaleza-CE. Para o preparo das amostras de manga, empregou-se o método QuEChERS, com a seguinte composição: 6 g  $\text{MgSO}_4$  + 1,5 g NaCl + 1,5 g citrato de sódio dihidratado. A coluna de *clean-up* consistiu de  $\text{MgSO}_4$  150 mg + PSA 150 mg. As amostras foram previamente trituradas com auxílio de *mixer* e aproximadamente 15 g foram pesados em tubo de Falcon<sup>®</sup>, com posterior adição de 15 mL de acetonitrila. O sistema foi manualmente agitado de modo moderado por 3 minutos. Então, a mistura foi adicionada ao tubo de QuEChERS e agitada por mais 3 minutos. Na sequência, foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante foi retirado e o solvente foi evaporado com auxílio de rotaevaporador. O sólido obtido foi dissolvido em 2 mL de acetonitrila e então adicionado na coluna do *clean-up*. Após esta etapa, o solvente foi evaporado e a amostra foi redissolvida em tampão BR, com pH ajustado de acordo com a condição otimizada para cada sistema estudado. Os eletrodos empregados para análise de TBZ foram: EDDB, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%.

### ***3.5.3 Determinação de formetanato em amostras de manga e de uva***

As amostras de manga e uva foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de Fortaleza-CE e da cidade do Porto-Portugal. O método QuEChERS foi empregado para o preparo das amostras, seguindo procedimento similar ao descrito na seção 3.5.2. As determinações de FMT nas amostras de manga e de uva foram realizadas sobre EDDB, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e Au/NpAu/Lac-Glu.2%.

### 3.6 Estudos químico-computacionais

O estudo conformacional foi feito pelo programa Forcite e para os cálculos foi usado um campo de força Universal, com 250 ciclos de *annealing*, cada um com cinco rampas de aquecimento e 100 passos dinâmicos por rampa, totalizando, assim, 125.000 estruturas calculadas. A temperatura foi variada entre 300 e 350 K e as cargas iniciais foram atribuídas pelo campo de força. No estudo das propriedades moleculares, o programa DMOL3 foi utilizado para o cálculo de relaxamento de geometria, modos vibracionais, energia dos orbitais de fronteira, análise populacional e densidade de estados eletrônicos. A Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) foi empregada no cálculo, sendo realizada a aproximação de gradiente generalizado (GGA, do inglês *generalized gradient approximation*) e o funcional de gradiente corrigido BLYP.

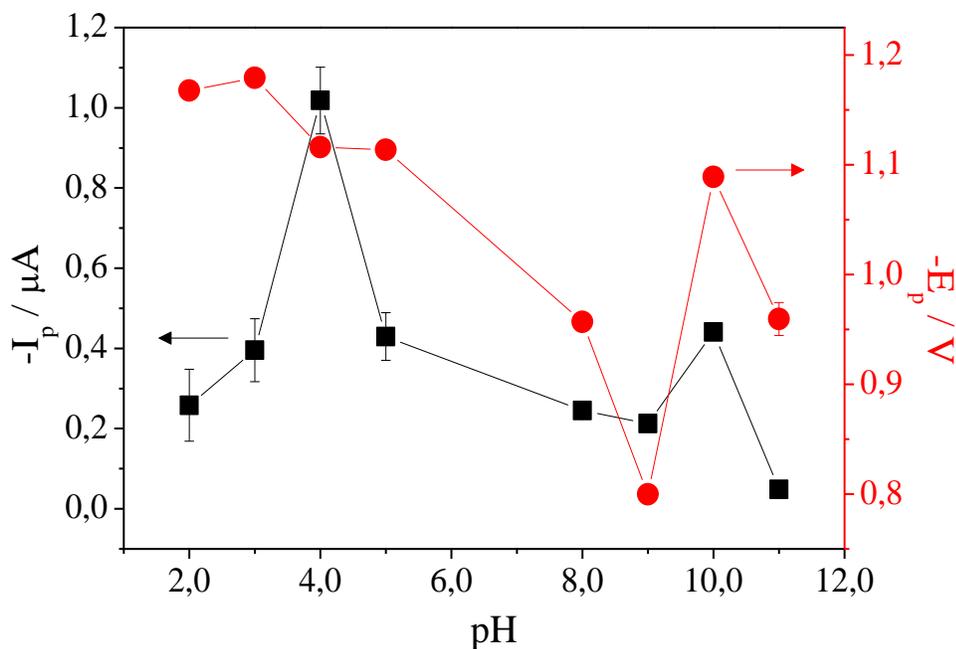
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo eletroanalítico de endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio

#### 4.1.1 Comportamento eletroquímico do endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio e influência do pH do meio

Inicialmente foram realizados experimentos de VOQ para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE em meio de tampão BR na faixa de pH de 2,0 a 11,0 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . A razão pela escolha do tampão BR foi baseada em sua ampla região tamponante. A Figura 6 apresenta a relação entre  $I_p$ ,  $E_p$  e pH obtida para esse sistema.

Figura 6 – Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR sobre HMDE com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , e as respectivas barras de erros calculadas



Fonte: Elaborada pelo autor.

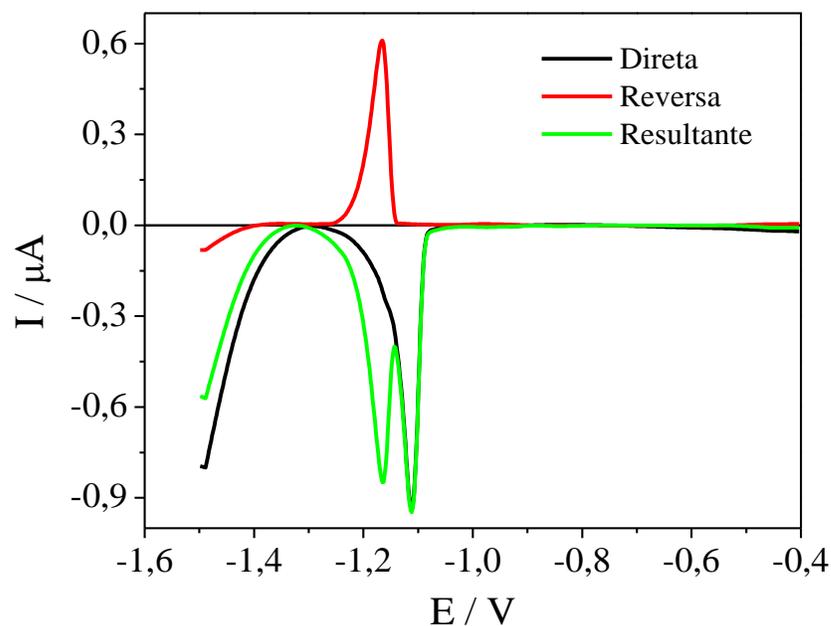
No intervalo de pH estudado, foi observado um processo de redução caracterizado como quase-reversível, com a relação entre  $E_p$  e pH não sendo linear, indicando que etapas que envolvem prótons na etapa determinante da reação não fazem parte do mecanismo da reação.

(137) Este comportamento está de acordo com o indicado na literatura para reações de redução eletroquímica envolvendo halogênios. (138) A relação entre  $I_p$  e pH apresenta um máximo em pH 4,0, seguido pela diminuição da intensidade da  $I_p$  com o aumento do pH. Tal diminuição é devido à reação de hidrólise do EDS, que é favorecida à medida em que o meio se torna básico. (73) Assim, o eletrólito de suporte com pH 4,0 foi selecionado para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico de determinação de EDS.

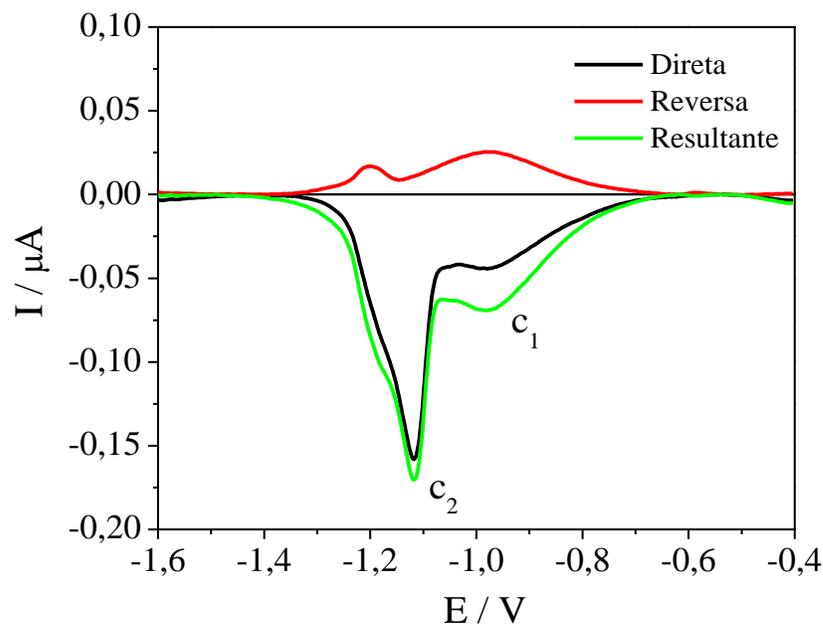
As condições básicas em pH 11,0 foram suficientes para promover a formação do produto da reação de hidrólise do EDS, em concentração apreciável para ser detectada no experimento voltamétrico. Consequentemente, neste meio foi possível observar a presença de dois processos de redução. A diferença do comportamento eletroquímico de EDS nas condições de eletrólito de suporte e de pH otimizados, em que ocorre reação de hidrólise, pode ser observada pela avaliação das componentes de corrente da VOQ. Os perfis voltamétricos para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0 e 11,0 empregando VOQ com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  podem ser visto na Figura 7.

Figura 7 – Voltamogramas de onda quadrada com a indicação das componentes de corrente para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em meio de tampão BR (A) pH 4,0 e (B) pH 11,0

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estudos eletroquímicos apresentados na literatura empregando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial sugerem que EDS é reduzido irreversivelmente sobre a superfície do mercúrio. (73) No entanto, como pode ser observado na Figura 7, os resultados indicam que o mecanismo de redução do EDS não é irreversível.

Pela análise da componente resultante em pH 4,0, observa-se um processo de redução em torno de  $-1,1$  V acompanhado da presença de um segundo processo em potencial mais negativo. Apesar da componente resultante indicar a presença de dois processos de redução bem definidos, o que na verdade está sendo observado é que, devido à separação existente entre as componentes de corrente direta e reversa, o segundo processo é relativo à contribuição da componente reversa; isso porque a componente resultante é obtida pela subtração das componentes direta e reversa. Este comportamento é típico de reações que ocorrem com espécies imobilizadas sobre a superfície do eletrodo.

Pela teoria da VOQ, verifica-se que o valor do coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) não afeta de forma significativa a separação das componentes direta e reversa, em sistemas tal como o observado na Figura 7 (A). (139) No entanto, a razão entre as correntes  $\Psi_{p1}/\Psi_{p2}$  ( $\Psi_{p1}$  e  $\Psi_{p2}$  são as correntes de pico dos processos que aparecem nos potenciais mais negativos e mais

positivos, respectivamente) depende de  $\alpha$ . De acordo com o modelo, a dependência linear entre logaritmo da razão  $\Psi_{p1}/\Psi_{p2}$  e  $\alpha$  é dada pela equação 1.

$$\log \left( \frac{\Psi_{p1}}{\Psi_{p2}} \right) = 1,3205 \alpha - 0,723 \quad (1)$$

em que  $\Psi_{p1}$  e  $\Psi_{p2}$  são as intensidades de corrente de pico das componentes reversa e direta, respectivamente. Assim, essa dependência pode ser usada para estimar o valor de  $\alpha$ . Portanto, considerando as condições  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , o valor calculado da razão  $\Psi_{p1}/\Psi_{p2}$  é igual a 0,65, proporcionando  $\alpha = 0,40$ . Esse resultado pode ser ratificado por outros trabalhos na literatura, que apresentaram  $\alpha < 0,5$  para processos quase-reversíveis. (140,141)

Em pH 11,0, observa-se a presença de dois processos de redução ( $c_1$  e  $c_2$ ) com reduzida separação dos potenciais de pico, justificando a formação de endossulfanodiol por hidrólise do EDS. De acordo com Raviejo e colaboradores, o endossulfanodiol pode ser reduzido eletroquimicamente sobre a superfície de mercúrio em valores mais negativos de potencial que os relativos ao EDS. (74) Portanto, o processo  $c_1$  de menor intensidade é referente ao EDS remanescente na solução e o processo  $c_2$  corresponde ao endossufanodiol.

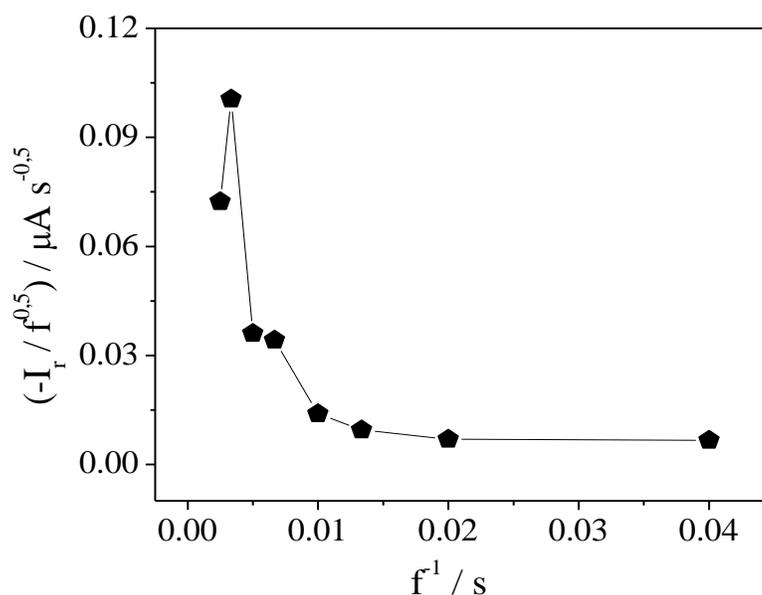
Na sequência, a influência da velocidade de varredura ( $v$ ) sobre a  $I_p$  de redução do EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0 foi estudada entre 20 e 400  $\text{mV s}^{-1}$ . Observa-se relação linear entre  $I_p$  e  $v$ , de acordo com  $I_p = 1,62 \times 10^{-9} \pm 2,40 \times 10^{-10} + 4,72 \times 10^{-11} \pm 2,25 \times 10^{-12} v$  com  $R = 0,9961$ , indicando a adsorção do reagente sobre a superfície do eletrodo. Esta conclusão pode ser confirmada pela relação linear entre  $\log(I_p)$  e  $\log(v)$  representada pela equação  $\log(-I_p) = -9,76 \pm 1,14 \times 10^{-3} + 0,79 \pm 2,69 \times 10^{-3} \log(v)$  com  $R = 0,9988$ . A relação linear obtida apresenta inclinação de 0,79, sendo bem próximo do valor intermediário de 0,75 para sistemas em que há controle misto, ou seja, envolvendo difusão e adsorção. (142)

#### 4.1.2 Estudos dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Os estudos dos parâmetros da VOQ representam uma importante ferramenta do ponto de vista analítico e de discussão do mecanismo de reação, possibilitando até a obtenção de informações cinéticas dos processos de transferência de carga. (143) Para a otimização dos parâmetros da VOQ para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0, os valores de  $f$ ,  $a$  e  $\Delta E_s$  foram avaliados entre 25 e  $400 \text{ s}^{-1}$ , 5 e 50 mV e 1 e 7 mV, respectivamente.

Os resultados sugerem que o aumento nos valores de  $f$  implica em aumento dos valores de  $I_p$ , com relação linear entre  $I_p$  e  $f$  no intervalo de 25 a  $200 \text{ s}^{-1}$ . De acordo com o modelo teórico proposto para VOQ, esta dependência é indicativa de reações redox que ocorrem com espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. (144) No entanto, não se observa relação linear entre  $E_p$  e  $\log f$ , estando de acordo com os critérios diagnósticos da VOQ para processos quase-reversíveis. (143) Assim, para o procedimento eletroanalítico, o valor  $200 \text{ s}^{-1}$  foi considerado como otimizado. A relação entre  $I_r/f^{1/2}$  e  $1/f$  obtida para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0 está apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Relação entre razão corrente de pico/raiz quadrada da frequência e inverso da frequência obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para EDS  $2,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 4,0 sobre HMDE. Valores de frequência no intervalo de 25 a  $400 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

O resultado apresentado na Figura 8 indica que a característica de processo quase-reversível pode ser confirmada pela relação obtida entre a razão corrente de pico da componente resultante e raiz quadrada da frequência ( $I_p/f^{1/2}$ ) versus o inverso da frequência ( $1/f$ ), que exibe um máximo conhecido como máximo quase-reversível ( $f_{\max}$ ). (145) O valor do máximo quase-reversível pode ser usado para calcular a constante de transferência de carga ( $k_s$ ), de acordo com a equação 2.

$$k_s = \kappa_{\max} \cdot f_{\max} \quad (2)$$

em que  $\kappa_{\max}$  é o parâmetro cinético crítico calculado teoricamente. (146) O valor  $\kappa_{\max}$  usado é  $1,18 \pm 0,05$  com a seguinte condição de contorno:  $0,25 \leq \alpha \leq 0,85$ . Considerando  $f_{\max} = 300 \text{ s}^{-1}$ , o valor de  $k_s$  é igual a  $354 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ .

O estudo da variação de  $a$  apresenta correlação linear entre  $I_p$  e  $a$  no intervalo de 5 a 20 mV; após esse valor, observa-se a diminuição da  $I_p$ . O estudo do incremento de potencial exibe correlação linear entre  $I_p$  e  $\Delta E_s$  na faixa de 2 a 4 mV, e para  $\Delta E_s > 4 \text{ mV}$  não há contribuição significativa para o aumento da  $I_p$ . Assim, as condições otimizadas para a determinação do EDS sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0 são  $f = 200 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ .

Experimentos de VOQ para EDS sobre HMDE nas condições otimizadas exibem processo de redução bem definido e valor de  $I_p$  da componente reversa se apresenta em torno de 80% menor que  $I_p$  da componente direta. Outro resultado interessante observado é o desaparecimento da separação das componentes de corrente direta e reversa, indicando que a mudança nos parâmetros pode promover alterações nos perfís voltamétricos. De acordo com Mirčeski e Lovrić, se o parâmetro cinético  $K$  ( $K = k_s / f$ , parâmetro cinético adimensional) diminui, os valores de potencial das componentes também diminuem e, como consequência, a separação das componentes desaparecem, caracterizando reação redox quase-reversível. (139) Deste modo, a componente resultante foi selecionada para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico para determinação de EDS.

#### **4.1.3 Proposta de mecanismo de redução do endossulfam**

Nos últimos anos, os métodos químico-computacionais têm sido empregados como ferramenta complementar aos estudos eletroquímicos. As aplicações incluem, por exemplo, a

criação de modelos de interação analito e superfície eletródica e obtenção de informações acerca do mecanismo da reação. (147 - 151)

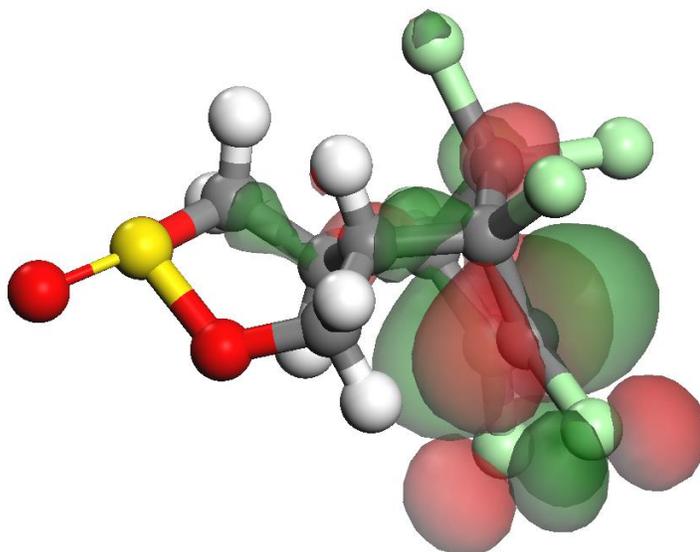
Neste contexto, os métodos químico-computacionais foram aliados aos resultados obtidos por VOQ para descrever uma proposta de mecanismo de redução do EDS sobre HMDE. A molécula de EDS possui átomos de cloro distribuídos em diferentes posições da molécula, representando diferentes sítios para a redução da ligação cloro-carbono. (117) A primeira parte dos estudos químico-computacionais foi direcionada para descrever a distribuição dos orbitais moleculares desocupados de mais baixa energia (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), pois, estes são os responsáveis pelo recebimento dos elétrons resultantes da redução eletroquímica. A segunda estratégia consistiu em remover o átomo de cloro de diferentes posições da molécula, simulando a reação de redução e, em seguida, as energias das espécies foram calculadas para avaliação da forma mais estável. A Figura 9 ilustra os orbitais LUMO para EDS e os orbitais LUMO acompanhados da distribuição da densidade eletrônica para a molécula após o primeiro processo de redução.

Pode ser observada pela Figura 9 (A) que a molécula do EDS, antes do processo de redução, apresenta maior contribuição dos orbitais LUMO sobre a ligação C(7)-Cl, indicando que este é o provável sítio de redução. Os cálculos realizados para EDS após a primeira redução envolvendo um elétron indicam que a estrutura mais estável é aquela proveniente da remoção do átomo de cloro ligado ao C(7). A Figura 9 (B) atesta que os orbitais LUMO e a densidade eletrônica se encontram mais concentrados sobre o C(7), indicando que a reação eletroquímica ainda pode prosseguir. De acordo com a literatura, o produto final da redução do EDS envolve a substituição do átomo de Cl por um átomo de H com a participação total de dois elétrons. Os cálculos químico-computacionais ainda sugerem que a substituição do átomo de Cl por H para formar a ligação C(7)-H proporciona a estrutura mais estável, com mais baixa energia, confirmando que o sítio preferencial da reação é a ligação C(7)-Cl.

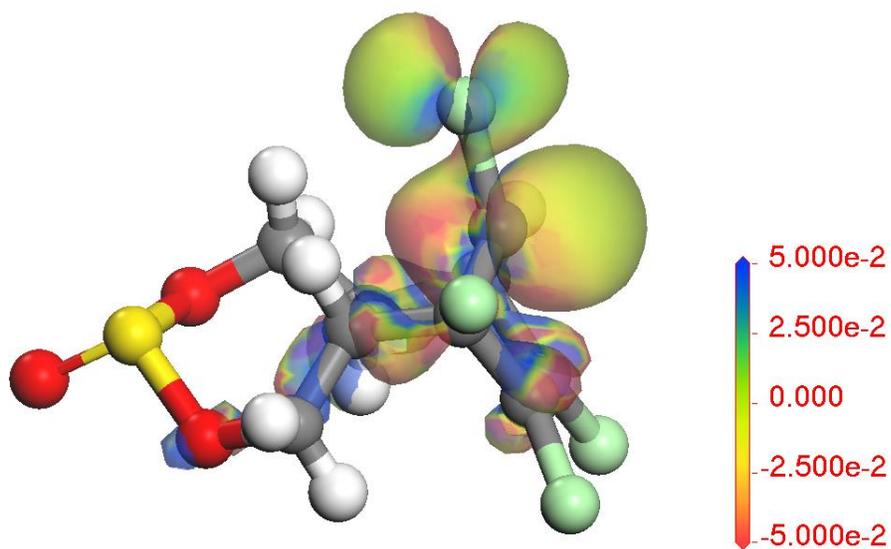
Com base nos resultados experimentais e teóricos aqui apresentados, apresenta-se proposta inédita para o mecanismo de redução do EDS sobre HMDE em meio ácido, que pode ser vista na Figura 10.

Figura 9 – (A) Representação dos orbitais LUMO para a molécula do EDS. (B) Distribuição da densidade eletrônica para a molécula de EDS após a remoção do primeiro elétron. Carbono (cinza), hidrogênio (branco), oxigênio (vermelho), cloro (verde) e enxofre (amarelo).

(A)

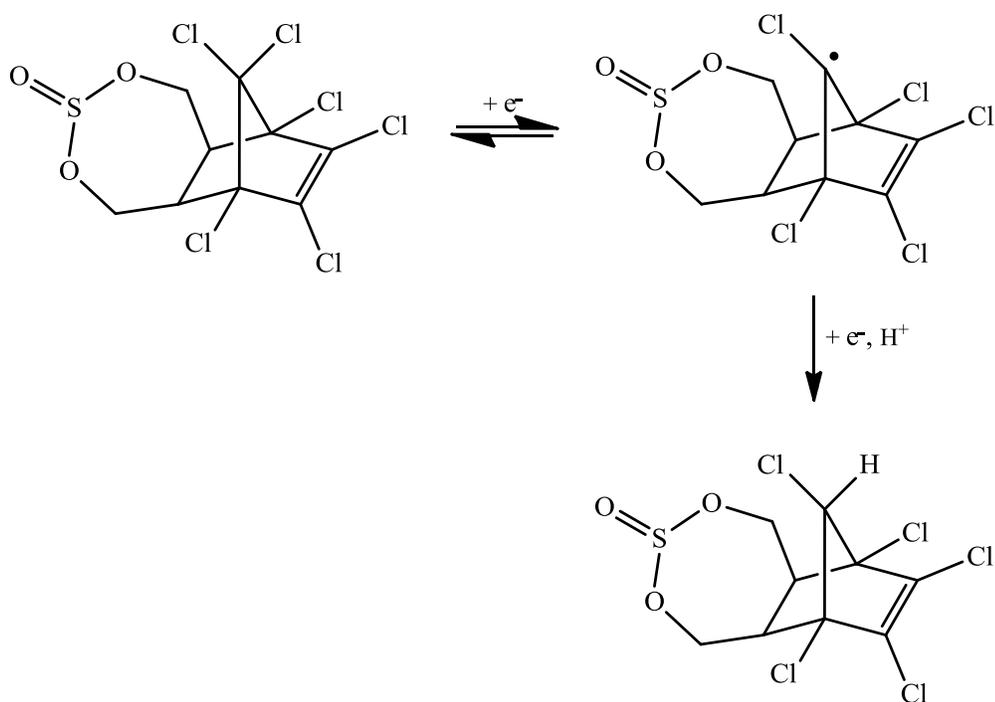


(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Proposta de mecanismo de redução do EDS sobre HMDE em tampão BR 4,0



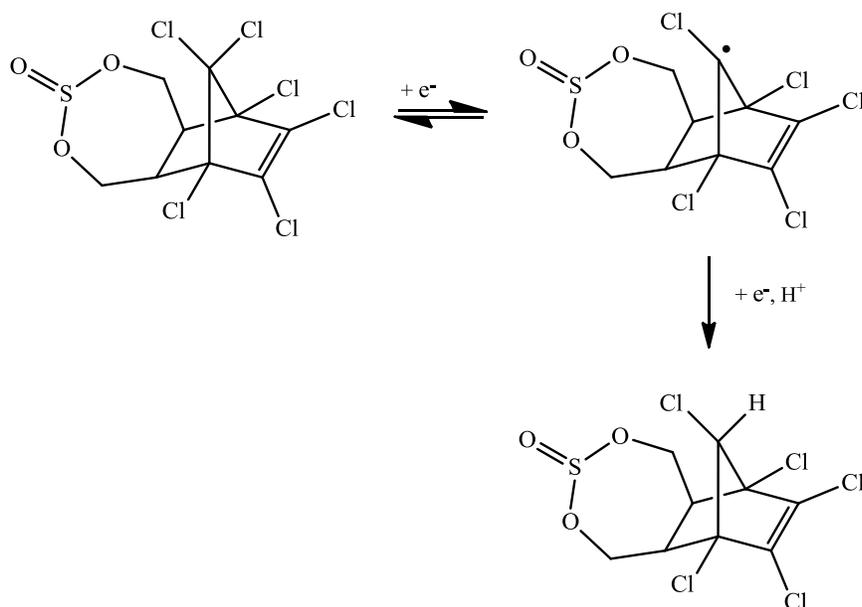
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em meio ácido, a reação envolve duas etapas. Na primeira etapa há formação da espécie radicalar em função da redução do átomo de cloro ligado ao C(7), com a participação de um elétron. Esta é a etapa determinante da reação, pois não há participação de próton no mecanismo, como foi demonstrado nos estudos do pH do meio. Na sequência, uma fração das espécies radicalares formadas são oxidadas dando origem à componente reversa nos voltamogramas de onda quadrada. As espécies radicalares que não são oxidadas são reduzidas com a participação de mais um elétron e um próton.

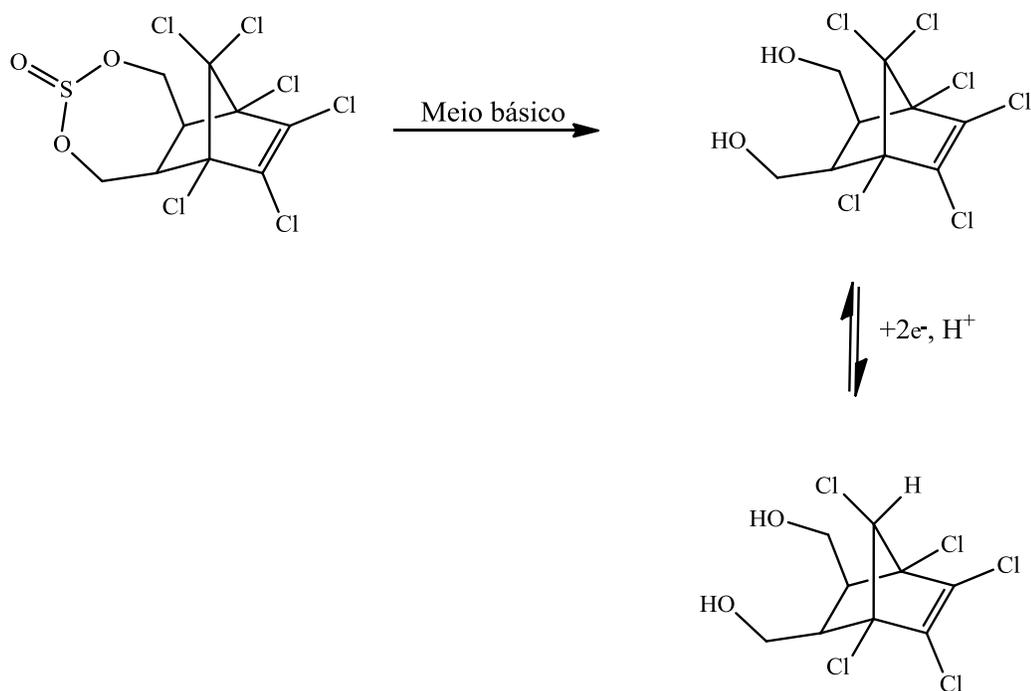
Em meio básico, a presença do segundo pico em potenciais mais negativos corresponde ao endossulfanodiol originado pela hidrólise do EDS. A proposta do mecanismo de redução para EDS sobre HMDE em meio básico pode ser vista na Figura 11.

Figura 11 – Proposta de mecanismo de redução do EDS sobre HMDE em tampão BR 11,0

Processo 1 ( $c_1$ )



Processo 2 ( $c_2$ )

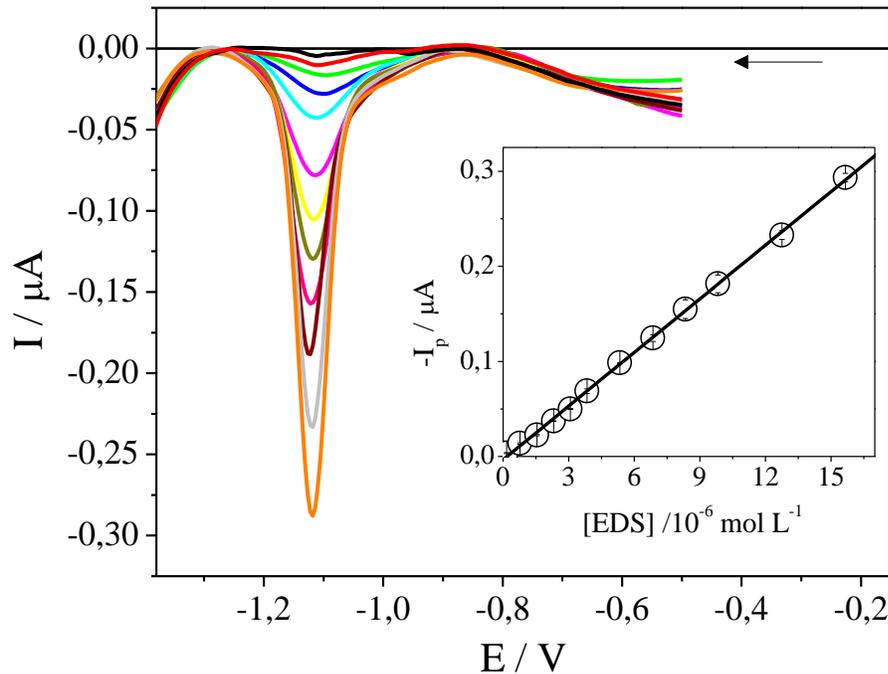


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.4 Curvas analíticas para endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio

Com os parâmetros voltamétricos da VOQ otimizados,  $f = 200 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ , foram construídas curvas analíticas para EDS sobre HMDE em tampão BR pH 4,0, empregando adição de padrão. A Figura 12 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de EDS acompanhadas da correlação linear entre  $I_p$  e concentração de EDS.

Figura 12 – Voltamogramas de onda quadrada para EDS em meio de tampão BR pH 4,0 sobre HMDE, com  $f = 200 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$  e concentrações de EDS variando de  $1,54 \times 10^{-7}$  a  $1,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se região de linearidade entre  $1,54 \times 10^{-7}$  e  $1,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , com a equação da reta e os respectivos intervalos de confiança de 95 %:  $-I_p = -3,45 \times 10^{-9} \pm 2,89 \times 10^{-9} + 1,88 \times 10^{-2} \pm 3,85 \times 10^{-4} [\text{EDS}]$  com  $R = 0,9996$ . O intercepto da equação apresenta valor negativo, quando o valor considerado como real é zero. Pelo teste de significância (152), o valor do  $t_{\text{calculado}}$  é 3,11, sendo menor que o  $t_{\text{crítico}}$  de 4,30, indicando que não há diferença significativa

entre o valor de intercepto médio obtido experimentalmente e o valor crítico. Pelas curvas analíticas, os valores de LD e de LQ foram calculados pelas equações: (152)

$$LD = \frac{3S_{x/y}}{b} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10 S_{x/y}}{b} \quad (4)$$

em que  $S_{x/y}$  é o desvio padrão da regressão linear e  $b$  é a inclinação da curva analítica. O valor de  $S_{x/y}$  foi calculado a partir da seguinte equação: (152)

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n_i - 2}} \quad (5)$$

em que  $y_i$  é a resposta para um determinado nível de concentração,  $\bar{y}$  é o valor correspondente estimado a partir da curva analítica e  $n_i$  é o número de pontos utilizados na curva analítica.

A Tabela 2 apresenta as figuras de mérito calculadas para a determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0, com regiões de linearidade (RL), equação da curva analítica, intervalo de confiança do intercepto ( $IC_a$ ), intervalo de confiança da inclinação ( $IC_b$ ), R, desvio padrão do intercepto ( $S_a$ ), desvio padrão da inclinação ( $S_b$ ), LD, LQ, repetibilidade e reprodutibilidade.

O valor de LD calculado foi  $0,121 \text{ mg kg}^{-1}$ , estando no intervalo de LMR ( $0,01$  a  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) recomendado para EDS pela ANVISA. (56) A precisão foi avaliada com base na reprodutibilidade envolvendo cinco medições em diferentes soluções contendo EDS  $1,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em dias diferentes, com valores de DPR inferiores a 3,5%. A precisão das medidas também foi avaliada a partir de dez réplicas realizadas no mesmo dia em solução contendo EDS  $1,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , resultando em DPR inferiores a 5,0%. Os reduzidos valores de DPR indicam precisão do procedimento, significando que o mesmo pode ser utilizado na determinação de EDS em amostras complexas.

Tabela 2 – Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE em meio de tampão BR pH 4,0

Parâmetro	Valor
RL / mol L <sup>-1</sup>	1,54 × 10 <sup>-7</sup> a 1,57 × 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>
Equação da curva	-I <sub>p</sub> = -3,44 × 10 <sup>-9</sup> + 1,88 × 10 <sup>-2</sup> [EDS]
IC <sub>a</sub>	± 2,89 × 10 <sup>-9</sup>
IC <sub>b</sub>	± 3,85 × 10 <sup>-4</sup>
R	0,9996
S <sub>a</sub>	1,92 × 10 <sup>-9</sup> A
S <sub>b</sub>	4,81 × 10 <sup>-4</sup> A mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	2,97 × 10 <sup>-7</sup> (120,80 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	9,98 × 10 <sup>-7</sup> (406,2 ppb)
%DPR (*)	4,98
%DPR (**)	3,47

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Repetibilidade; (\*\*) Reprodutibilidade

É importante ressaltar que EDS está em processo de exclusão do mercado brasileiro, tendo seu uso proibido. No entanto, EDS é considerado como pesticida altamente persistente no meio ambiente. (10,18) Além disso, devido à sua eficiência como defensivo agrícola, poderá ser comercializado por muito tempo no mercado negro. O resultado é que o desenvolvimento de procedimentos para análise de EDS ainda se justificará por muitos anos.

#### ***4.1.5 Determinação de endossulfam sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais***

Para avaliar a aplicabilidade do procedimento proposto para a determinação de EDS, realizou-se ensaios de recuperação em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais provenientes do açude Pacajus. Os ensaios de recuperação nas amostras foram realizados com fortificações em três níveis de concentração de EDS (correspondentes às concentrações entre o terceiro e o décimo pontos da curva analítica), com os resultados apresentados na Tabela 3.

As amostras de águas naturais foram caracterizadas pelos parâmetros físico-químicos utilizados para avaliar a qualidade de águas naturais. As análises foram realizadas no

Laboratório de Química Ambiental (LAQA) da Universidade Federal do Ceará. Os parâmetros foram clorofila a ( $2,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ), nitrogênio total ( $2,52 \text{ mg L}^{-1}$ ), fosfato total ( $0,029 \text{ mg L}^{-1}$ ) e fosfato ( $0,260 \text{ mg L}^{-1}$ ). A presença de fósforo e de nitrogênio pode ter como consequência o aparecimento e a proliferação de macrófitas aquáticas, que são consideradas bioindicadores de matéria orgânica em decomposição. Isso representa um sério risco para biota aquática, devido à ameaça de hipóxia no ambiente. (153) Portanto, considerando a determinação direta de pesticidas em águas naturais, é necessário que o método analítico seja seletivo, devido à complexidade da matriz ambiental.

Tabela 3 – Determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE em amostras de cana-de-açúcar, tomate e águas naturais provenientes do açude Pacajus

<b>Cana-de-açúcar</b>			
<b>[EDS]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$1,54 \times 10^{-6}$	$3,07 \times 10^{-6}$	$6,09 \times 10^{-6}$
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$1,47 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-6}$	$5,98 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,15 \times 10^{-6}$	$\pm 0,29 \times 10^{-6}$	$\pm 0,21 \times 10^{-6}$
<b>% Recuperação</b>	95,60	97,40	98,20
<b>% DPR</b>	4,08	3,98	1,40
<b>Tomate</b>			
<b>[EDS]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$3,07 \times 10^{-6}$	$6,09 \times 10^{-6}$	$9,08 \times 10^{-6}$
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$3,10 \times 10^{-6}$	$5,99 \times 10^{-6}$	$8,95 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,23 \times 10^{-6}$	$\pm 0,67 \times 10^{-6}$	$\pm 0,80 \times 10^{-6}$
<b>% Recuperação</b>	101,10	98,30	98,60
<b>% DPR</b>	3,00	4,53	3,60
<b>Açude Pacajus</b>			
<b>[EDS]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$1,53 \times 10^{-6}$	$4,59 \times 10^{-6}$	$7,63 \times 10^{-6}$
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$1,40 \times 10^{-6}$	$4,16 \times 10^{-6}$	$7,21 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,14 \times 10^{-6}$	$\pm 0,42 \times 10^{-6}$	$\pm 0,64 \times 10^{-6}$
<b>% Recuperação</b>	91,82	90,52	94,53
<b>% DPR</b>	4,10	4,11	3,55

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados indicam que não há diferença significativa entre a inclinação das curvas obtidas no eletrólito de suporte e nas amostras. Para confirmar este comportamento, tratamentos estatísticos foram realizados pelo teste  $t$  pareado. Os valores de  $t_{\text{calculado}}$  foram 3,78 e 2,92 para cana-de-açúcar e águas naturais, respectivamente, menores que o valor teórico ( $t_{\text{teórico}} = 4,30$ ) a um nível de confiança de 95 %, confirmando que as inclinações das curvas obtidas nas amostras foram semelhantes à do eletrólito de suporte.

Os resultados apresentados na Tabela 3 exibem valores de recuperação entre 90,52% e 101,10% com DPR variando de 1,40 % a 4,53 %. Os valores de DPR foram menores que 5,0%, indicando boa precisão nos experimentos de recuperação. Quanto à avaliação dos percentuais de recuperação, obteve-se valores satisfatórios, dentro da faixa aceitável para procedimentos analíticos (70 a 130%). (154,155) Portanto, a partir destes resultados, pode-se concluir que o procedimento proposto empregando VOQ é adequado para a quantificação de EDS em amostras complexas, tais como, cana-de-açúcar, tomate e águas naturais.

#### **4.2 Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto para a determinação do pesticida endossulfam**

NTC têm sido usados na construção de diferentes tipos de sensores e biossensores em função de suas propriedades mecânicas, elétricas e geometria. (156 - 158) Nanomateriais atuam como suportes para imobilização de enzimas, por sua elevada área superficial, resistência à transferência de massa, efetivo de ancoramento e biocompatibilidade. (159) A utilização de NTC em conjunto com mediadores de transferência de carga, tais como ftalocianinas metálicas, proporcionam significativo aumento da atividade eletrocatalítica, sensibilidade, estabilidade e biocompatibilidade frente à imobilização de enzimas. (160) Até a realização desta parte do trabalho, não foram encontrados trabalhos relacionados ao desenvolvimento de biossensores enzimáticos baseados na imobilização da enzima Lac sobre eletrodos modificados com NTC/PMF e FcCo.

Tratando especificamente com os biossensores eletroquímicos, observa-se sua aplicação em inúmeros propósitos analíticos incluindo: determinação da atividade antioxidante, análise de moléculas de interesse biológico e substâncias que podem prejudicar a saúde humana e o meio-

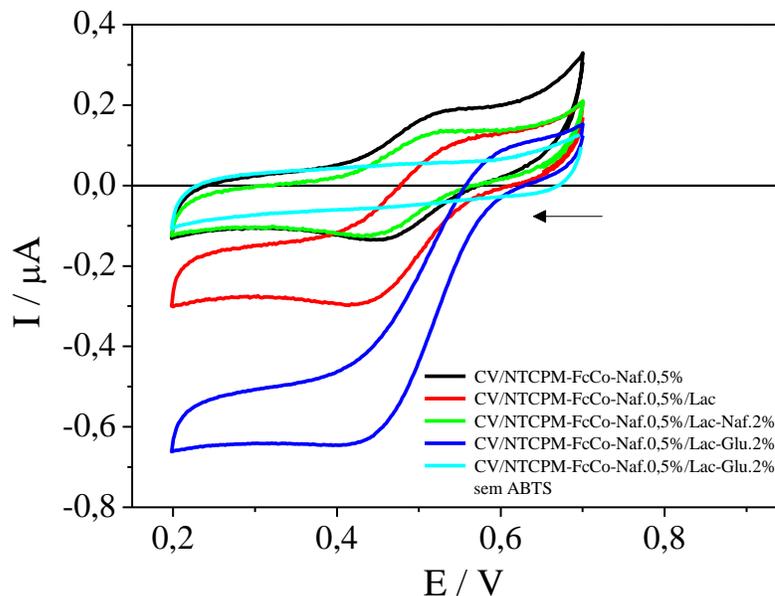
ambiente. Os avanços nos estudos de desenvolvimento de biossensores levaram esses dispositivos a serem considerados como alternativas promissoras para o desenvolvimento de metodologias analíticas viáveis para o monitoramento de pesticidas no meio ambiente e em amostras de alimentos. A estratégia de detecção dos pesticidas empregando biossensores enzimáticos é possibilitada principalmente devido ao princípio de inibição da atividade da enzima. (50)

Assim, aqui se tem o desenvolvimento do biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac para a determinação do pesticida organoclorado EDS baseado no fenômeno de inibição enzimática. (50) Também fundamentado em revisões prévias, não foram encontrados estudos com 2,2"-Azino-bis (3-etilbenzetiazolino-6-sulfônico) (ABTS) como substrato em sistemas enzimáticos para a detecção de pesticidas pelo fenômeno de inibição. Além disso, ABTS apresenta vantagens, tais como estabilidade, atoxicidade e afinidade com a enzima Lac. Portanto, os estudos foram realizados empregando o ABTS como substrato.

#### ***4.2.1 Parâmetros que influenciam a resposta do biossensor eletroquímico baseado na lacase***

Inicialmente, realizou-se experimentos de VC para avaliar o comportamento eletroquímico do ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre diferentes eletrodos modificados com NTCPM e FcCo, sem a enzima Lac (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%) e com a enzima Lac (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac). No intuito de avaliar a influência da adição de outras espécies à solução da enzima Lac, para auxiliar a imobilização da enzima sobre o eletrodo previamente modificado, foram avaliados os efeitos da presença de Glu.2% e Naf.2%. (132) A Lac apresenta atividade enzimática máxima entre pH 4,0 e 5,0. No entanto, outros biossensores baseado nesta proteína imobilizada em matrizes compostas por nanomateriais apresentaram resposta máxima em tampão BR pH 5,0. (161) Assim, os estudos iniciais foram realizados em meio de tampão BR pH 5,0. Os voltamogramas cíclicos para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Naf.2% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio tampão BR pH 5,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  são mostrados na Figura 13.

Figura 13 – Voltamogramas cíclicos para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Naf.2% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $10 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

ABTS sobre eletrodo na ausência da enzima (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%) apresentou um par redox com diferença entre os potenciais de pico catódico ( $E_{pc}$ ) e anódico ( $E_{pa}$ ),  $\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} = 59,5 \text{ mV}$ , estando coerente com os critérios diagnósticos da VC, que apontam diferença de  $60 \text{ mV}$  para processos reversíveis com a participação de um elétron. (162)

Ao adicionar a enzima Lac sobre eletrodo previamente modificado com NTCPMF e FcCo (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac) foi observada a mudança no perfil voltamétrico do ABTS, sendo marcada pela presença do processo de redução mais definido, iniciado em torno de  $0,55 \text{ V}$ , que é característico da ação catalítica da Lac exercida sobre ABTS. (163)

Esse processo foi atribuído à redução eletroquímica do produto da reação, que se deu entre enzima e substrato (ABTS). Estes resultados fornecem indícios de que a matriz NTCPMF-FcCo foi biocompatível com a proteína e que conseguiu, por meio de interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , imobilizar a enzima sobre a superfície do eletrodo.

No entanto, quando o biossensor foi preparado a partir da solução de Lac na presença de Naf. 2% se observou que o perfil voltamétrico foi semelhante ao sistema na ausência da enzima. Isso pode ser explicado pela lixiviação da enzima, quando o biossensor entrou em contato com

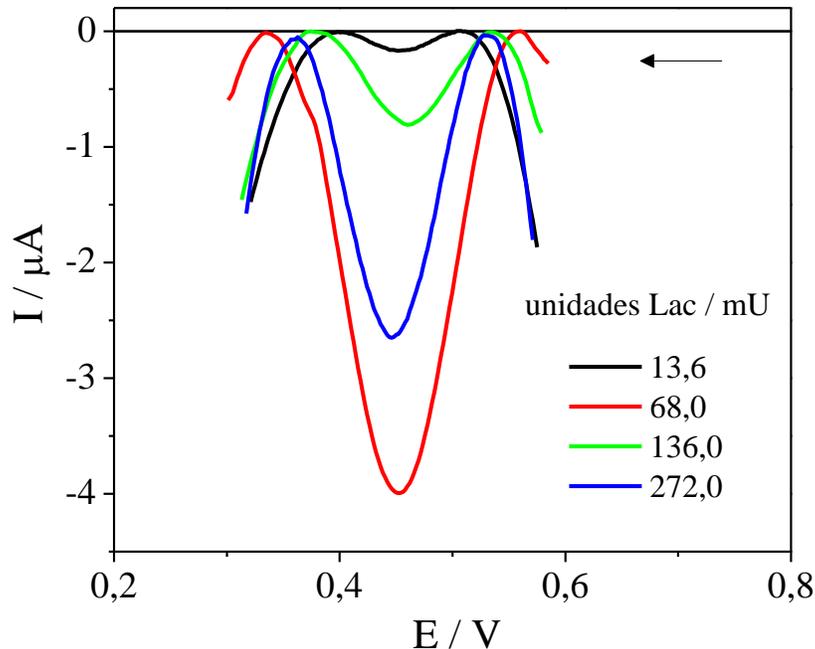
a solução do tampão, em função das repulsões eletrostáticas entre Lac e Nafion<sup>®</sup>. Ressalta-se que haletos também podem inibir a atividade da enzima Lac. (164) Portanto, como Nafion<sup>®</sup> é um polímero polifluoretado, também pode ter ocorrido a perda da atividade da Lac devido à interação entre os átomos de flúor e os sítios ativos da proteína, quando postos em contato na solução da enzima.

Já quando Glu.2% foi empregado para auxiliar a imobilização da Lac sobre eletrodo previamente modificado, observou-se maior intensidade de  $I_p$  referente ao processo de redução, indicando aumento da quantidade de enzima imobilizada para atuar na catálise enzimática. Glu é um dos reagentes mais empregados no método da ligação covalente cruzada (*cross-linking*), que tem a capacidade de formar ligações cruzadas com proteínas, tornando eficiente a imobilização da biomolécula, evitando a sua lixiviação ao entrar em contato com a solução. (133) Ressalta-se aqui que a enzima não foi ligada covalentemente à superfície do NTCPMF-FcCo. Assim, a imobilização foi do tipo não-covalente, que é considerado um dos mais promissores, uma vez que preserva a conformação estrutural da enzima, garantindo seu potencial catalítico. (159)

Os experimentos de VC realizados com CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na ausência do ABTS, não apresentaram nenhum processo eletroquímico no intervalo de potencial estudado, indicando que o estado de oxidação dos íons cobre, que fazem parte do sítio ativo da Lac não foram afetados. Estes resultados também indicaram que o oxigênio presente no meio não foi reduzido sobre a superfície do biossensor entre 0,7 V e 0,2 V. Assim, o processo de redução observado sobre o biossensor, na presença do ABTS, deveu-se unicamente ao processo catódico do produto da reação substrato/enzima.

Na sequência foi realizado o estudo do efeito da quantidade de unidades da Lac, imobilizadas na superfície do eletrodo sobre a  $I_p$  do ABTS. O estudo foi realizado na faixa de 13,6 mU a 272 mU. A Figura 14 mostra os voltamogramas de VOQ para ABTS  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 50$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV, obtidos a partir do estudo das unidades de enzima.

Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com unidades da enzima Lac variando de 13,6 a 272,0 mU, em tampão BR pH 5,0 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

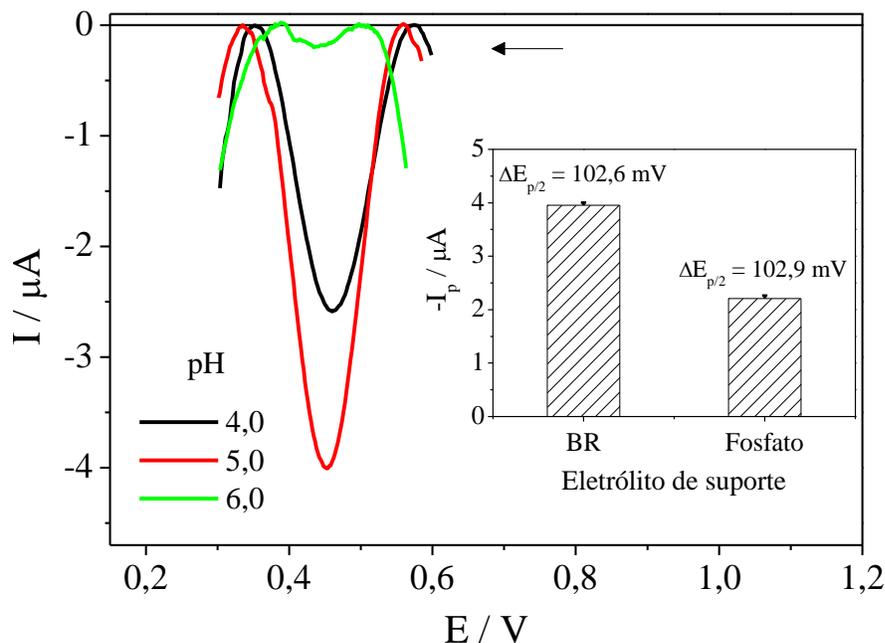


Fonte: Elaborada pelo autor.

Como apresentado na Figura 14, a quantidade de unidades de enzima influenciou a resposta eletroquímica do ABTS. O aumento da  $I_p$  foi observado até 68,0 mU; acima deste valor, houve diminuição dos valores de corrente, que pode ser atribuído ao aumento da espessura do filme, prejudicando a transferência de carga e ainda desestabilizando o sistema, facilitando a lixiviação da enzima da superfície do biossensor para a solução. Portanto, o valor de 68,0 mU foi a quantidade considerada como otimizada para a construção do biossensor.

O estudo do pH do meio foi avaliado entre 4,0 e 6,0 empregando tampão BR. A Figura 15 apresenta os voltamogramas de VOQ para ABTS  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  acompanhados da inserção contendo o efeito do eletrólito de suporte a pH 5,0 sobre  $I_p$  e largura de meia-altura ( $\Delta E_{p/2}$ ).

Figura 15 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR no intervalo entre 4,0 e 6,0, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU. Na inserção, a influência do eletrólito de suporte (tampão BR e fosfato) em pH 5,0 sobre corrente de pico e largura de meia-altura



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos foi observado que a mudança do pH não deslocou os valores de  $E_p$  dos voltamogramas, estando condizente com o comportamento eletroquímico do ABTS apresentado na literatura, que é regido por mecanismo sem a participação de prótons. (165) Conseqüentemente, a mudança da  $I_p$  com pH pode ser atribuída à mudança da atividade enzimática. Em segundo lugar, o estudo do pH indicou forte influência da concentração hidrogeniônica do meio sobre a atividade da enzima. Os valores de  $I_p$  aumentaram até pH 5,0, seguidos de acentuado decréscimo. O comportamento se deve ao aumento da concentração de íons hidroxila presentes no meio, pois estes interferem a ligação entre o oxigênio e os íons cobre T2/T3, reduzindo a atividade enzimática da Lac. (166) A mudança do eletrólito de suporte praticamente não interferiu nos valores de  $\Delta E_{p/2}$ . No entanto, o sinal de corrente mais intenso foi observado em meio de tampão BR. Em conformidade com os resultados recentemente publicados, as condições otimizadas foram tampão BR pH 5,0. (122)

A próxima etapa foi dedicada a otimizar os parâmetros da VOQ para ABTS  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0. Os intervalos analisados foram:  $f$  (10 a 100 s<sup>-1</sup>),  $a$  (5 a 50 mV) e  $\Delta E_s$  (1 a 6 mV). A relação entre  $I_p$  e  $f$  apresentou crescimento linear somente até 40 s<sup>-1</sup>. Os sistemas com transferência eletrônica de cinética lenta são caracterizados por apresentar maiores  $I_p$  em baixos valores de  $f$ . Acima deste valor, o aumento não linear da corrente ocorreu até 60 s<sup>-1</sup>, seguido por decréscimo em função do aumento de  $f$ .

A influência de  $a$  no sinal analítico exibiu linearidade entre  $I_p$  e  $a$  até 30 mV. A relação entre  $I_p$  e  $\Delta E_s$  não se caracterizou como linear; no entanto, apresentou máximo em 2 mV. Baseado nestes estudos, os parâmetros da VOQ otimizados foram  $f = 40$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV.

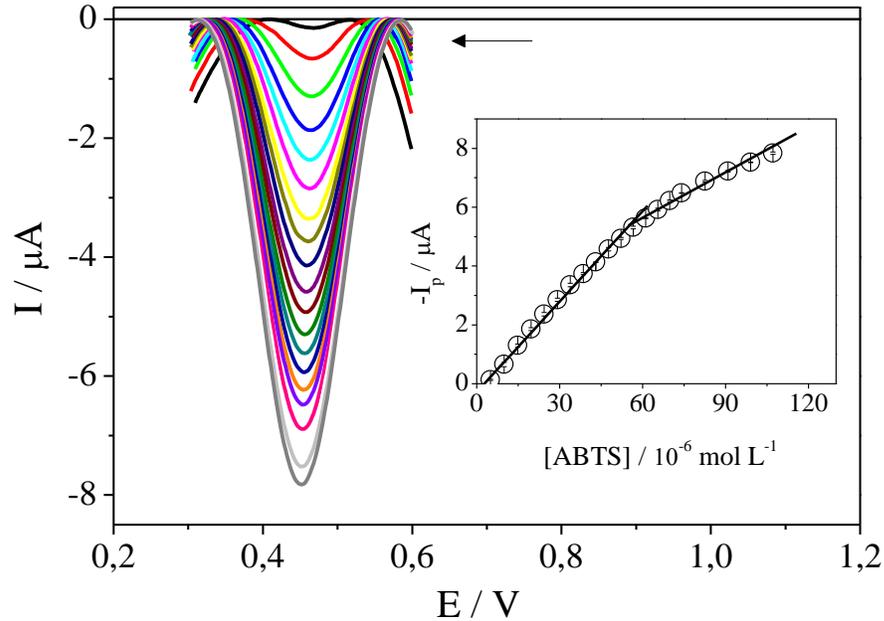
Com os parâmetros da VOQ otimizados foi realizado o estudo da influência da concentração de ABTS sobre a resposta eletroquímica do biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%. A importância deste estudo se deve ao fato de que o mecanismo de catálise enzimática proposto por Michaelis-Menten envolve duas etapas descritas pelas seguintes equações:



em que E, S, ES e P representam enzima, substrato, complexo enzima-substrato e produto da catálise enzimática, respectivamente. (167) A segunda etapa é a determinante da reação e, assim, é importante avaliar qual é a concentração de substrato que garante a formação máxima do complexo ES.

Neste contexto, o efeito da concentração do substrato sobre  $I_p$  foi estudado para ABTS entre  $4,97 \times 10^{-6}$  e  $1,07 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV. Os voltamogramas de VOQ obtidos para as diferentes concentrações de ABTS acompanhado da inserção com a relação entre  $I_p$  e concentração de ABTS estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Voltamogramas de onda quadrada para ABTS no intervalo de  $4,97 \times 10^{-5}$  a  $1,07 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a relação entre corrente de pico e concentração de ABTS com as respectivas barras de erro

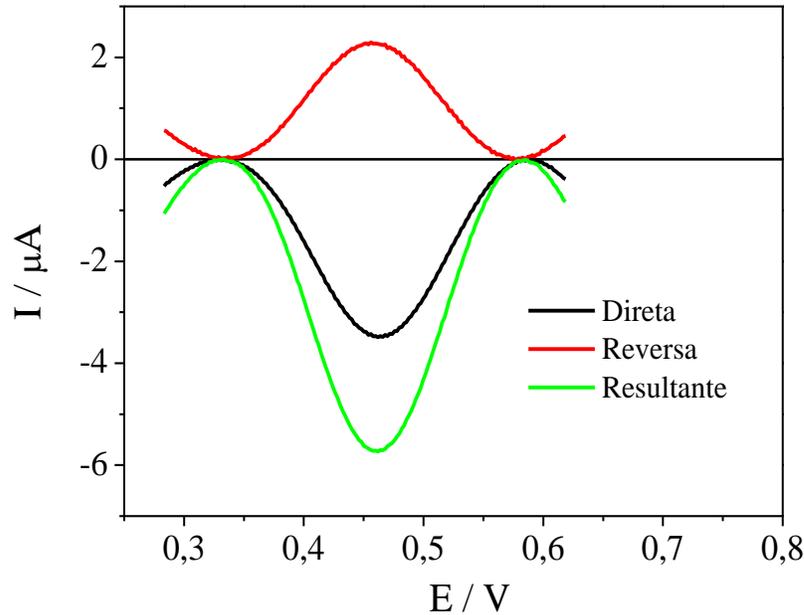


Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de  $I_p$  foram intensificados, resultado do aumento da concentração de ABTS. A relação entre  $I_p$  e concentração do substrato foi linear até  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Acima deste valor, observou-se perda de linearidade, indicando mudança da cinética de reação. Segundo o modelo proposto por Michaelis-Menten, a velocidade da reação enzimática varia linearmente com a concentração do substrato a baixas concentrações, seguindo uma cinética de primeira ordem, e com o aumento da concentração do substrato, ocorre mudança na cinética da reação, passando a ser de ordem zero. (167,168) Assim, para a continuação dos estudos foi selecionado a concentração de ABTS de  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

A Figura 17 mostra os voltamogramas de VOQ com a indicação das componentes de corrente direta, reversa e resultante para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 17 – Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

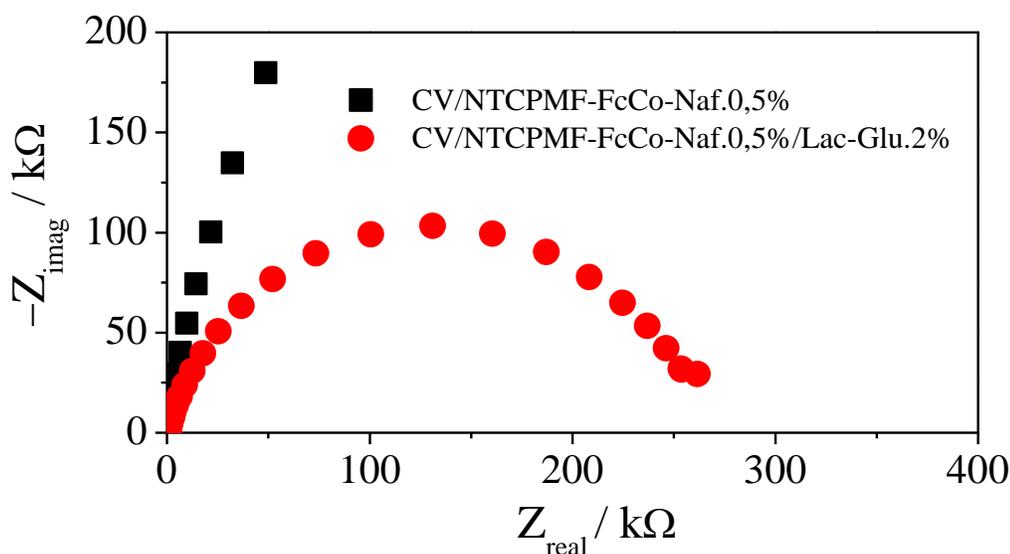
Por estes estudos, percebe-se a presença dos processos de redução (componente direta) e oxidação (componente reversa) para ABTS sobre a superfície do biossensor. Trabalhos previamente publicados indicam que a reação redox do ABTS é reversível. (165) Os resultados apresentados na Figura 17 foram diferentes daqueles observados por VC, que apresentaram corrente de oxidação bem menos intensa (*vide* Figura 13). A mudança dos comportamentos voltamétricos se deveu à forma de aplicação dos potenciais, que diferem entre as técnicas de VC e de VOQ. Nos experimentos de VC, a variação de potencial é realizada em uma só direção até o potencial de inversão (varredura direta); em seguida, o sentido da varredura é invertido (varredura reversa) até alcançar o potencial final previamente determinado, com o pulso de potencial ocorrendo de forma mais lenta que na VOQ.

Assim, no experimento realizado por VC a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  foi possível observar somente o processo de redução do produto da reação enzimática, que foi acumulado na superfície do eletrodo em função da varredura lenta. Isso se justifica porque nos experimentos de VOQ são aplicados pulsos de potencial mais rápidos que na VC (nos sentidos direto e reverso na mesma varredura, independentemente da sua direção) e, por este princípio, é possível mensurar as

correntes faradaicas de redução e de oxidação de processos reversíveis. (143) Portanto, o perfil voltamétrico (VOQ) apresentado na Figura 17 indica que a aplicação dos pulsos reversos consegue oxidar ABTS diretamente na superfície do eletrodo sem a ocorrência da reação enzimática.

Para obter mais informações acerca da reação de transferência de carga entre ABTS e biossensor foram realizados experimentos de EIE. Os estudos foram realizados para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0. A Figura 18 apresenta os diagramas de Nyquist com frequência de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV.

Figura 18 – Diagramas de Nyquist para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0, com aplicação de 0,52 V, intervalo de frequência de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros da Figura 18 foram marcados pela elevada resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ) observada para ABTS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% ( $2,38 \text{ M}\Omega$ ). Este valor pode ser atribuído à repulsão eletrostática entre ABTS, que possui dois grupos sulfônicos carregados negativamente, e o Nafion<sup>®</sup> presente no eletrodo modificado, fazendo com que o sistema se torne semelhante a um capacitor. Este perfil de elemento capacitor foi confirmado

pelo valor da inclinação da região linear da representação de Bode ( $\log|Z|$  vs  $\log f$ ), calculado como igual a  $-0,89$  e próximo do valor esperado para este tipo de elemento, que é  $-1,0$ . (169)

No entanto, para ABTS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% foi observada a formação de um arco referente ao processo de transferência de carga, atribuído à redução do produto da oxidação enzimática, com participação de um elétron. Além do mais, ocorreu a diminuição da resistência à transferência de elétrons para ABTS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% ( $R_{tc} = 260,96 \text{ k}\Omega$ ). Esta diminuição pode ser atribuída tanto à elevada afinidade substrato-enzima (ABTS-Lac) como à atividade catalítica promovida pela Lac. Outro parâmetro avaliado a partir dos experimentos de EIE foi a constante aparente de velocidade da reação de transferência de carga ( $k_{ap}$ ) expressa pela equação 8. (170,171)

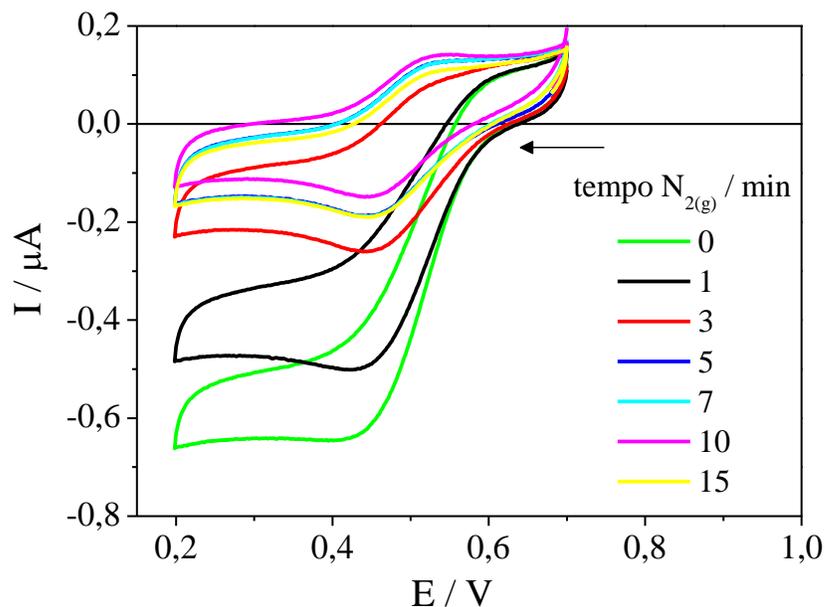
$$k_{ap} = \frac{RT}{n^2 F^2 A R_{tc} C} \quad (8)$$

em que  $R$  é a constante dos gases,  $T$  é a temperatura,  $n$  é o número de elétrons,  $F$  é a constante de Faraday,  $A$  é a área do eletrodo,  $R_{tc}$  é a resistência à transferência de carga e  $C$  é a concentração do substrato no seio da solução. Pelos valores de  $R_{tc}$ , calculou-se os valores de  $k_{ap}$  sendo  $6,29 \times 10^{-5}$  e  $5,76 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$  para CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, respectivamente. O maior valor de  $k_{ap}$  calculado para o biossensor comprovou o efeito catalítico da enzima Lac, promovendo a cinética da reação de transferência de carga.

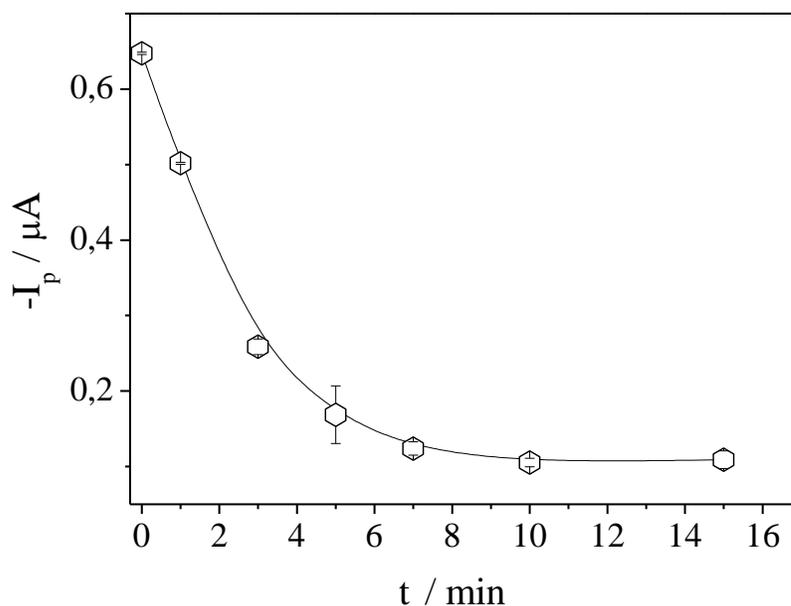
O mecanismo de catálise enzimática característica da Lac envolve a redução do oxigênio presente na solução para formar a molécula de água. (172) Assim, realizou-se o estudo do efeito da quantidade de oxigênio presente na solução sobre a resposta eletroquímica do ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  empregando CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 para comprovar atividade e mecanismo enzimáticos, bem como biocompatibilidade do sistema. O estudo foi avaliado a partir da desaeração do sistema pelo fluxo de  $N_{2(g)}$  na solução por períodos de 1 a 15 minutos. A Figura 19 apresenta os voltamogramas cíclicos para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  na presença de diferentes concentrações de oxigênio na solução e a relação entre  $I_p$  e tempo de desaeração da solução com  $N_{2(g)}$ .

Figura 19 – (A) Influência do tempo de desaeração com  $N_{2(g)}$  nos perfis voltamétricos para ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, preparado com Lac 68,0 mU, em meio de tampão BR pH 5,0 com  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Relação entre corrente de pico e tempo de desaeração com as respectivas barras de erro

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados apresentados na Figura 19 (A) indicaram que, à medida em que oxigênio foi removido da solução, os voltamogramas para ABTS sobre CV/NTCPMF-FcCo-

Naf.0,5%/Lac-Glu.2% foram semelhantes ao perfil exibido por ABTS sobre o eletrodo não-enzimático. A alteração no perfil voltamétrico é atribuída à perda de capacidade da Lac catalisar a oxidação do ABTS, não devido à desnaturação da enzima, mas sim pela ausência do agente responsável por reestabelecer a enzima à sua forma apta de prosseguir ativa no ciclo catalítico, ou seja, do oxigênio. Para entender o fenômeno é importante discutir as características da Lac, uma proteína da família das oxidoredutases. O sítio ativo da Lac possui quatro íons cobre classificados em três tipos: cobre tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3). Esta classificação foi estabelecida em função das características observadas por UV-Vis e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). O cobre T1 é responsável pela coloração azul da enzima, devido à intensa absorção eletrônica em torno de 600 nm e também detectável por EPR. O cobre T2 é incolor, mas detectável por EPR, e o tipo T3 consiste em um par de íons cobre com fraca absorção próximo à região do UV do espectro eletromagnético e não são detectáveis por EPR. (173,174)

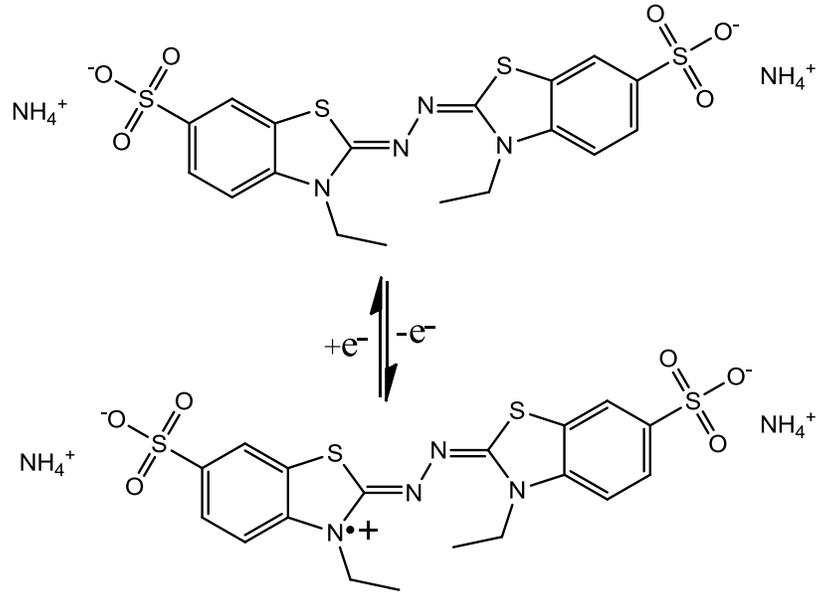
O cobre T1 é conhecido como sítio de oxidação do substrato e o cluster T2/T3 é conhecido como a região onde ocorre a redução do oxigênio. O mecanismo de catálise da Lac inicia com a doação de elétrons do substrato para o cobre T1 e, em seguida, ocorre a transferência interna de elétrons para o cluster T2/T3, que está interagindo com o oxigênio. Esses elétrons são empregados especificamente na redução de oxigênio, formando molécula de água e resultando no reestabelecimento do ciclo catalítico. (174) Portanto, a ausência de oxigênio na solução em que a enzima Lac está presente interrompe o dinamismo do ciclo da catálise enzimática.

Como apresentado na Figura 19 (B), os valores de  $I_p$  decrescem com a diminuição do oxigênio dissolvido na solução até 10 minutos e acima deste tempo permanece constante. O biossensor baseado na Lac é, por isso, bastante sensível à quantidade de oxigênio na solução, estimulando o desenvolvimento de biocélulas à combustível e de dispositivos para análise de oxigênio (166,175,176)

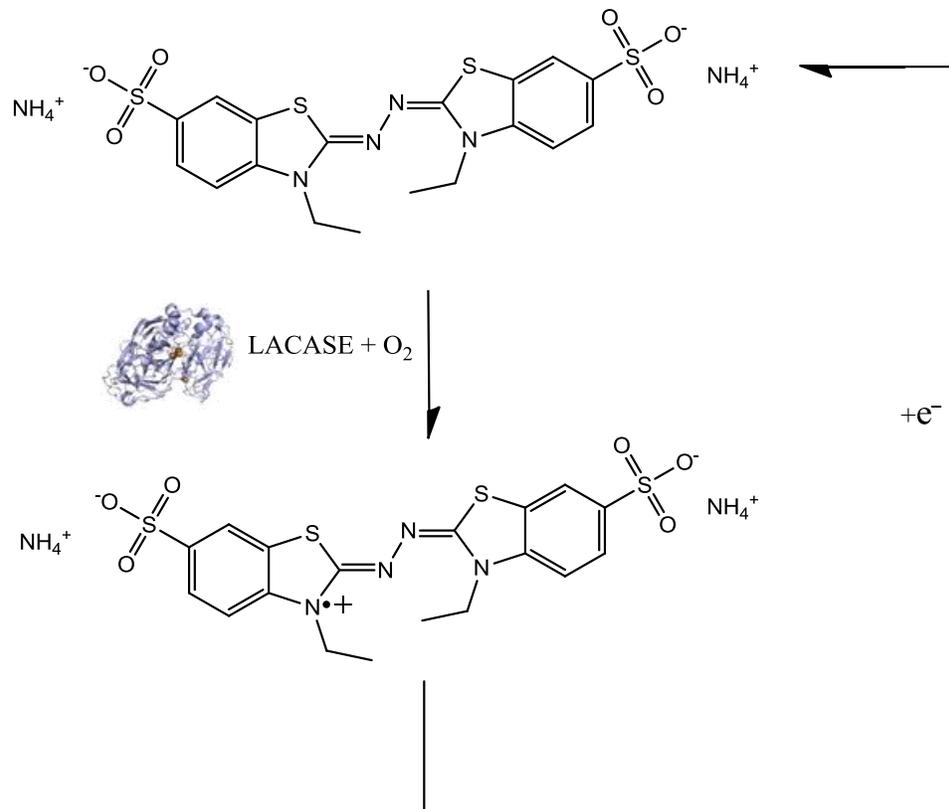
A Figura 20 apresenta, de forma esquemática, os processos que ocorrem na superfície do biossensor eletroquímico baseado na enzima Lac frente ao ABTS, na presença e ausência de oxigênio em solução.

Figura 20 – (A) Mecanismo de oxidação para ABTS na ausência da enzima Lac ou ausência de oxigênio. (B) Representação da reação enzimática entre ABTS e enzima Lac., com redução eletroquímica do ABTS radicalar formado na superfície do biossensor

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor com adaptação da referência (165).

O mecanismo de oxidação do ABTS envolve a participação de um elétron, que é removido do átomo de nitrogênio do sistema conjugado, como apresentado na Figura 20 (A).

A Figura 20 (B) ilustra que a enzima catalisa a oxidação de ABTS na presença de oxigênio, produzindo a espécie radicalar. Na sequência, ABTS na forma radicalar é reduzido na superfície do eletrodo e, em seguida, volta a interagir com a enzima, favorecendo a perpetuação do ciclo. Em função do mecanismo exposto, os biossensores enzimáticos podem ser usados com sucesso para a determinação de pesticidas ou outras espécies que possam inibir a atividade da enzima, pois, se alguma espécie for capaz de minimizar o avanço da reação na etapa em que é formado o produto da catálise enzimática, menos intensa será a corrente faradaica. (177)

#### ***4.2.2 Curvas analíticas para endossulfam sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase***

O emprego de biossensor enzimático para a determinação de EDS foi descrito somente no trabalho de Chauhan e colaboradores que utilizaram a enzima acetilcolinesterase. (82) No entanto, não tem sido descrito na literatura o desenvolvimento de biossensores tendo como receptor biológico a enzima Lac para determinação de EDS. Neste trabalho, os testes iniciais de inibição foram realizados com adições de alíquotas da solução estoque de EDS à célula eletroquímica contendo ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0, seguida pelos experimentos de VOQ com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Para concentração de EDS entre  $9,42 \times 10^{-8}$  e  $5,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  não se observou a diminuição dos valores de  $I_p$  como resultado da inibição. No entanto, ao se realizar os experimentos de VC a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  foi possível observar essa diminuição em decorrência da inibição da atividade enzimática causada pelo pesticida a partir de EDS  $2,37 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Este comportamento, possivelmente, pode ser atribuído a dois fatores: (1) o mecanismo redox de ABTS é reversível e (2) diferença no modo de aplicação do potencial das duas técnicas. Na VOQ, a aplicação dos pulsos de potencial é mais rápida e, assim, os pulsos reversos conseguem oxidar ABTS diretamente na superfície do eletrodo sem a ocorrência da reação enzimática. O sinal de corrente elétrica referente a esta reação, então, é detectado na componente reversa, como apresentado na Figura 17. No entanto, por VC a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , a

varredura foi lenta o suficiente para garantir a detecção somente do produto da reação enzimática acumulado na interface eletrodo/solução, uma vez que a varredura está sendo realizada, somente no sentido direto, na primeira metade do ciclo. Valores crescentes de velocidade (entre 20 e 100 mV s<sup>-1</sup>) intensificaram o processo de oxidação eletroquímica do ABTS sobre o biossensor, indicando que a cinética de oxidação eletroquímica foi mais favorecida que a cinética da oxidação enzimática.

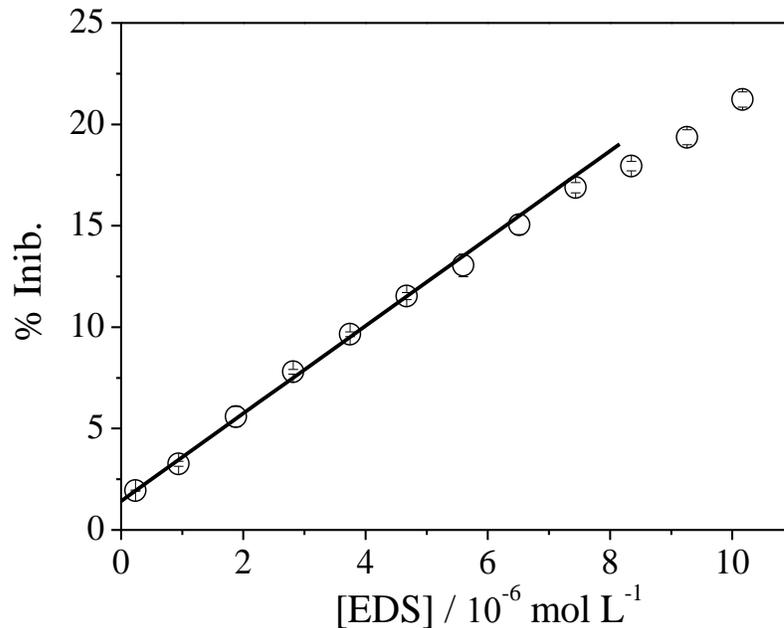
A literatura apresenta trabalhos de desenvolvimento de biossensores enzimáticos para pesticidas, baseados no fenômeno da inibição, empregando VC, uma vez que esta também permite avaliar o sinal faradaico da espécie gerada pela reação enzimática. (178 - 182) Portanto, fundamentado nesses trabalhos mencionados, nos resultados até aqui obtidos e com o objetivo de desenvolver procedimento simples baseado na inibição da enzima Lac, optou-se por seguir as análises do EDS sobre biossensor empregando VC a 10 mV s<sup>-1</sup>.

O procedimento para análise foi realizado como segue. Inicialmente, registrou-se a corrente de pico do processo de redução do ABTS 5,66 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em tampão BR pH 5,0 sem a presença do EDS. Em seguida, alíquotas sucessivas da solução de EDS 5,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> foram adicionadas à célula eletroquímica e, após homogeneização da solução por agitação magnética por 1 minuto, foi realizada a varredura de potencial. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação 9. (183)

$$\% \text{Inib.} = \left( 1 - \frac{I}{I_0} \right) \times 100 \quad (9)$$

em que % Inib. é o percentual de inibição da resposta, I<sub>0</sub> é a corrente de pico, antes da adição EDS e I é a corrente de pico após a adição do pesticida. A Figura 21 apresenta a relação entre % Inib. e concentração de EDS obtida sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em tampão BR pH 5,0 contendo ABTS 5,66 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> obtida por VC a 10 mV s<sup>-1</sup>.

Figura 21 – Curva analítica para EDS construída a partir do percentual de inibição e concentração de EDS entre  $2,36 \times 10^{-7}$  e  $7,46 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% na presença de ABTS  $5,66 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de tampão BR pH 5,0



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados indicaram que houve diminuição da  $I_p$  referente ao processo de redução de ABTS, confirmando que EDS possui a capacidade de inibir a atividade enzimática da Lac. No trabalho de Xu e colaboradores foi discutida a inibição da atividade Lac por haletos. (164) Logo, como a molécula de EDS possui seis átomos de cloro, o mecanismo de inibição possivelmente envolve a interação entre cloro e íons cobre da enzima Lac.

A linearidade entre %Inib. e concentração de EDS foi observada na faixa entre  $2,36 \times 10^{-7}$  e  $7,43 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> com  $R = 0,9993$ . As figuras de mérito calculadas para EDS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% foram comparadas com os resultados obtidos no estudo do EDS sobre HMDE (seção 4.1), como ilustrado pela Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de EDS sobre HMDE e sobre biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0

Parâmetro	HMDE	Biossensor
RL / mol L <sup>-1</sup>	1,54 × 10 <sup>-7</sup> a 1,57 × 10 <sup>-5</sup>	2,36 × 10 <sup>-7</sup> a 7,43 × 10 <sup>-6</sup>
Equação da curva	-I <sub>p</sub> = -3,44 × 10 <sup>-9</sup> + 1,88 × 10 <sup>-2</sup> [EDS]	% Inib. = 1,61 + 2,08 × 10 <sup>6</sup> [EDS]
IC <sub>a</sub>	± 2,89 × 10 <sup>-9</sup>	± 0,367
IC <sub>b</sub>	± 3,85 × 10 <sup>-4</sup>	± 8,26 × 10 <sup>4</sup>
R	0,9996	0,9993
S <sub>a</sub>	1,92 × 10 <sup>-9</sup> A	0,127 % Inib
S <sub>b</sub>	4,81 × 10 <sup>-4</sup> A mol <sup>-1</sup> L	1,9 × 10 <sup>4</sup> % Inib. mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	2,97 × 10 <sup>-7</sup> (120,86 ppb)	1,83 × 10 <sup>-7</sup> (74,47 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	9,98 × 10 <sup>-7</sup> (406,12 ppb)	6,09 × 10 <sup>-7</sup> (247,82 ppb)
%DPR (*)	4,98	0,25
%DPR (**)	3,47	3,46

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Repetibilidade; (\*\*) Reprodutibilidade

Os valores de LD e de LQ calculados para o biossensor foram menores que os calculados para HMDE. Apesar da reduzida geração de resíduos de mercúrio e a consciência nos laboratórios de pesquisa em armazenar adequadamente o descarte, as pesquisas têm sido voltadas para o desenvolvimento de sistemas eletroanalíticos alternativos para a determinação de contaminantes ambientais. Neste caso, o biossensor desenvolvido pode ser considerado como ferramenta viável para a detecção do pesticida EDS. Outra abordagem que pode ser dada é que a utilização de biossensores apresenta a vantagem de evitar problemas de adsorção do produto da reação eletroquímica sobre a superfície do eletrodo de trabalho, elevando a reprodutibilidade e aplicabilidade do procedimento de análise. Nessa perspectiva, o biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% apresentou elevada reprodutibilidade com repetibilidade abaixo de 0,5%, indicando a estabilidade do sistema. O estudo aqui realizado foi pioneiro em apresentar a inibição da enzima Lac pelo pesticida organoclorado EDS, que recentemente entrou em processo de não comercialização no Brasil, em função dos danos que podem causar aos seres humanos e ao meio ambiente. (10,11,58)

#### 4.2.3 Determinação de endossulfam sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar e águas naturais

A aplicabilidade do biossensor desenvolvido também foi testada para a determinação de EDS em amostras de cana-de-açúcar e de águas naturais. Os resultados iniciais indicaram que as amostras não estavam contaminadas com EDS. Assim, os testes de recuperação foram realizados com a fortificação das amostras em três níveis diferentes de concentração. Os valores de percentuais de recuperação e as demais figuras de mérito calculadas a partir dos ensaios de recuperação realizados para EDS sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% para as amostras de cana-de-açúcar e de águas naturais podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação eletroanalítica de EDS sobre biossensor CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em amostras de cana-de-açúcar e de águas naturais provenientes dos açúdes Pacajus e Acarape do Meio

<b>[EDS]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	9,42 x 10 <sup>-7</sup>	4,67 x 10 <sup>-6</sup>	6,52 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Cana-de-açúcar</b>			
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	8,57 x 10 <sup>-7</sup>	4,84 x 10 <sup>-6</sup>	6,81 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,53 x 10 <sup>-7</sup>	± 3,4 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,88 x 10 <sup>-7</sup>
<b>% Recuperação</b>	90,98	103,49	104,47
<b>% DPR</b>	2,49	2,87	0,52
<b>Açúde Pacajus</b>			
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	6,74 x 10 <sup>-7</sup>	4,44 x 10 <sup>-6</sup>	6,75 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,65 x 10 <sup>-7</sup>	± 4,61 x 10 <sup>-7</sup>	± 8,49 x 10 <sup>-7</sup>
<b>% Recuperação</b>	71,57	95,01	103,65
<b>% DPR</b>	3,9	4,18	5,07
<b>Açúde Acarape do Meio</b>			
<b>[EDS]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	9,03 x 10 <sup>-7</sup>	4,76 x 10 <sup>-6</sup>	6,56 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,75 x 10 <sup>-7</sup>	± 6,77 x 10 <sup>-7</sup>	± 1,24 x 10 <sup>-6</sup>
<b>% Recuperação</b>	95,87	101,77	100,71
<b>% DPR</b>	3,36	5,74	7,58

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os percentuais de recuperação se encontram entre 70 e 130 %, indicando que o biossensor superou as possíveis interferências das matrizes complexas. O maior valor de DPR obtido foi 7,58%, mas, segundo a norma brasileira para análise de agrotóxicos (ABNT NBR 14029), o valor máximo aceitável de % DPR para o nível de concentração avaliado é 16%. (184) Assim, o biossensor apresentou precisão e exatidão adequadas para análise de EDS em amostras complexas. Os percentuais de recuperação e os valores de % DPR foram semelhantes aos valores obtidos para EDS sobre HMDE (*vide* Tabela 3). Ressalta-se aqui que o biossensor desenvolvido pode ser empregado para análises de pesticidas em campo devido ao rápido procedimento de preparação e de aplicação.

### **4.3 Estudo eletroanalítico do tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro**

#### ***4.3.1 Caracterização física do eletrodo de diamante dopado com boro***

A caracterização física do EDDDB foi realizada por MEV, com os resultados indicando que o filme de diamante com 8.000 ppm de boro apresentou grãos distribuídos de forma homogênea, sem sinais de trincas. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Sun e colaboradores. (185) Os grãos são referentes aos planos preferenciais de crescimento do filme de diamante dopado com boro. (186) Com relação ao nível de dopagem, Portela e colaboradores mostraram que o aumento da razão B/C pode intensificar a sensibilidade do sinal analítico. (187) No entanto, na concepção de Jia e colaboradores, em filmes de diamante com elevadas concentrações de boro, somente poucos átomos de boro conseguem substituir os átomos de carbono em sua estrutura, com a maioria dos átomos de boro podendo se acumular nos contornos de grão, originando defeitos estruturais, prejudicando a integridade dos grãos, além de afetar a condutividade elétrica do filme. (188) Portanto, no presente trabalho optou-se pelo EDDDB com dopagem de 8.000 ppm para garantir a homogeneidade do filme.

#### ***4.3.2 Comportamento eletroquímico de tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro***

Inicialmente, foram realizados experimentos de VC para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDDB em meio de tampão BR em pH 3,0, 7,0 e 11,0 a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  e  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Os resultados

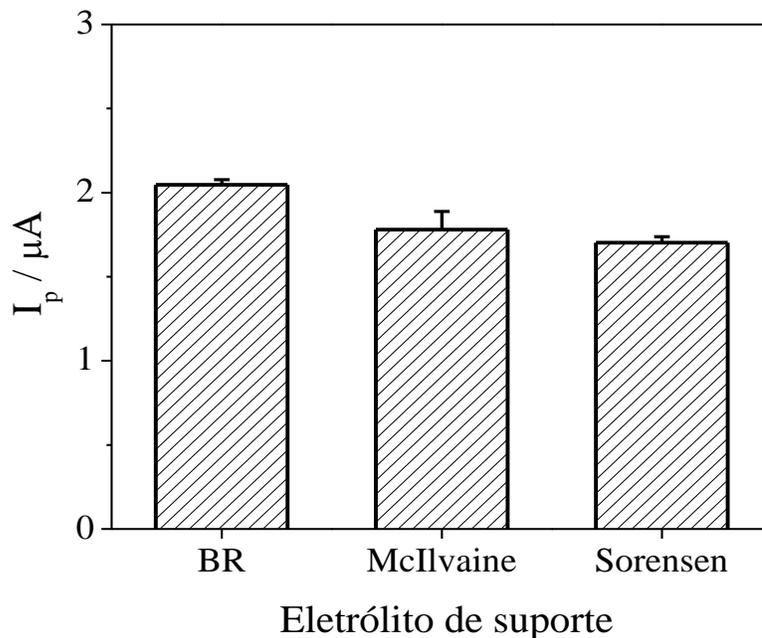
indicaram a presença de um processo de oxidação irreversível bem definido a  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , sugerindo um mecanismo de oxidação com cinética de transferência de carga lenta. Portanto, ao empregar VOQ nos estudos iniciais para TBZ sobre EDDB, optou-se em manter a mesma velocidade de varredura dos experimentos de VC. A teoria da VOQ para processos totalmente irreversíveis mostra valores de  $I_p$  mais intensos quando  $a \cong 25 \text{ mV}$ . (189) Então, como a redução de TBZ sobre EDDB se apresentou totalmente irreversível, optou-se por empregar  $25 \text{ mV}$  como valor otimizado de amplitude de pulsos de potencial nos estudos iniciais da VOQ. Portanto, os parâmetros selecionados para os estudos iniciais com VOQ foram  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Até este ponto, verificou-se que a maior intensidade da  $I_p$  foi observada em pH 3,0. Além disso, realizou-se experimentos para comparar os resultados voltamétricos para TBZ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0 obtidos com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  (condição A) com aqueles obtidos com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  (condição B); os últimos são os parâmetros tradicionais empregados em estudos iniciais de VOQ. Os resultados sugerem que a corrente de pico na condição A é maior que a observada na condição B. Assim, o aumento de dez vezes na velocidade de varredura ( $v = f \cdot \Delta E_s$ ) não promoveu aumento da corrente de pico, por causa cinética lenta. Portanto, para a sequência dos estudos de otimização do eletrólito de suporte e pH do meio foram selecionados os parâmetros  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Em seguida, o estudo do efeito do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica do TBZ utilizando os tampões BR, McIlvaine e Sørensen em pH 3,0 fornece a relação entre  $I_p$  e eletrólito, como ilustrado pela Figura 22. Como observado, a maior intensidade de  $I_p$  é obtida em meio de tampão BR. Outro critério que pode ser empregado para fazer a escolha do eletrólito de suporte é avaliando a  $\Delta E_{p/2}$ , definida como sendo a largura do voltamograma de VOQ (unidade de potencial em mV) em que a corrente é igual a  $I_{p/2}$ . (143) No presente estudo, os valores de  $\Delta E_{p/2}$  foram todos menores que  $100 \text{ mV}$ ; nestes casos, a escolha pode ser realizada preferencialmente pela  $I_p$ , permitindo selecionar, no presente estudo, o tampão BR como eletrólito de suporte otimizado.

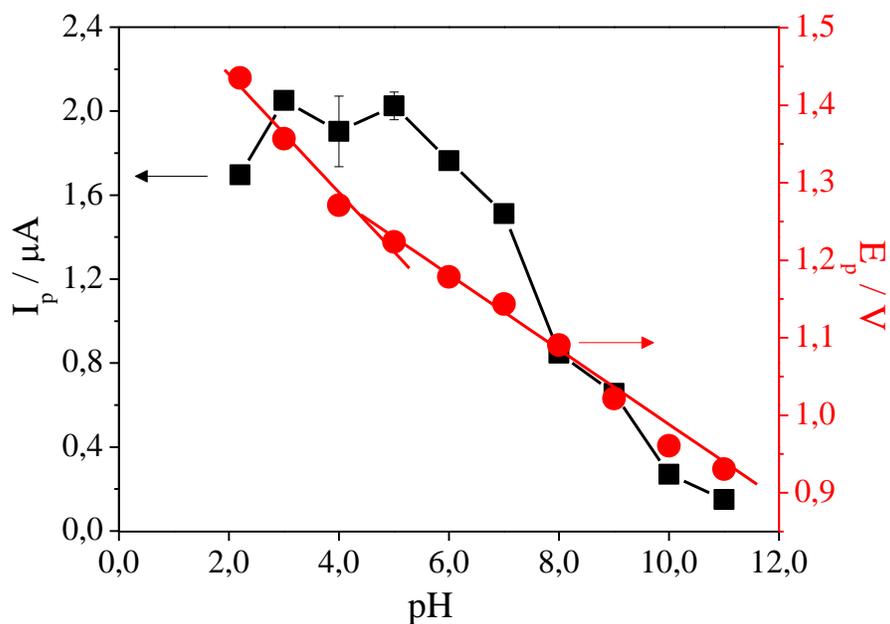
Na sequência, o estudo do efeito do pH do eletrólito de suporte na oxidação eletroquímica do TBZ, na faixa de pH de 2,2 a 12,0, utilizando VOQ com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , foi realizado empregando o tampão BR, como exposto na Figura 23.

Figura 22 – Influência do eletrólito de suporte em pH 3,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Tampões: BR, McIlvaine e Sorensen



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 – Relação entre potencial de pico, corrente de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em tampão BR com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



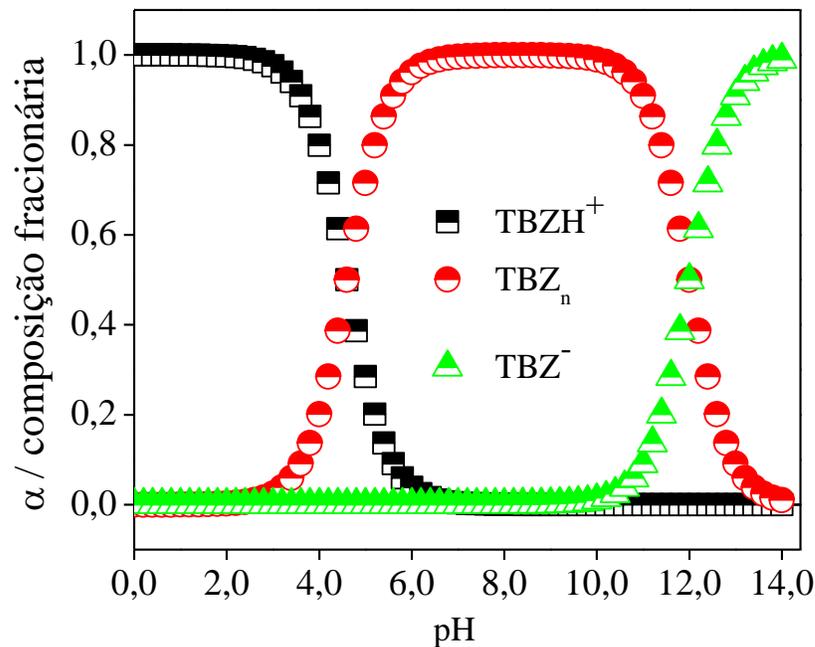
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados indicaram que os valores de  $E_p$  são influenciados pela variação do pH, uma vez que seu aumento proporcionou o deslocamento dos valores de  $E_p$  para valores menos positivos. Este comportamento é característico de processos onde ocorre a participação de prótons na reação, sendo observada mudança de inclinação em torno do pH 4,3, que pode ser atribuída ao  $pK_a$  da molécula. (137) TBZ apresenta dois valores de  $pK_a$ : 4,6 e 12,0. (190,191) Portanto, o valor de pH na mudança de inclinação é muito próximo ao primeiro  $pK_a$  do TBZ. A relação linear entre  $E_p$  e pH apresenta inclinações de 76,2 mV/pH e 48,3 mV/pH. Estes valores de inclinação sugerem a participação de igual número de prótons e elétrons na reação. (137) Ao avaliar a intensidade da  $I_p$  em função do pH é possível observar um máximo em pH 3,0, indicando que, abaixo do primeiro valor de  $pK_a$ , a molécula a ser oxidada se encontra totalmente na sua forma protonada. Portanto, pH 3,0 foi selecionado.

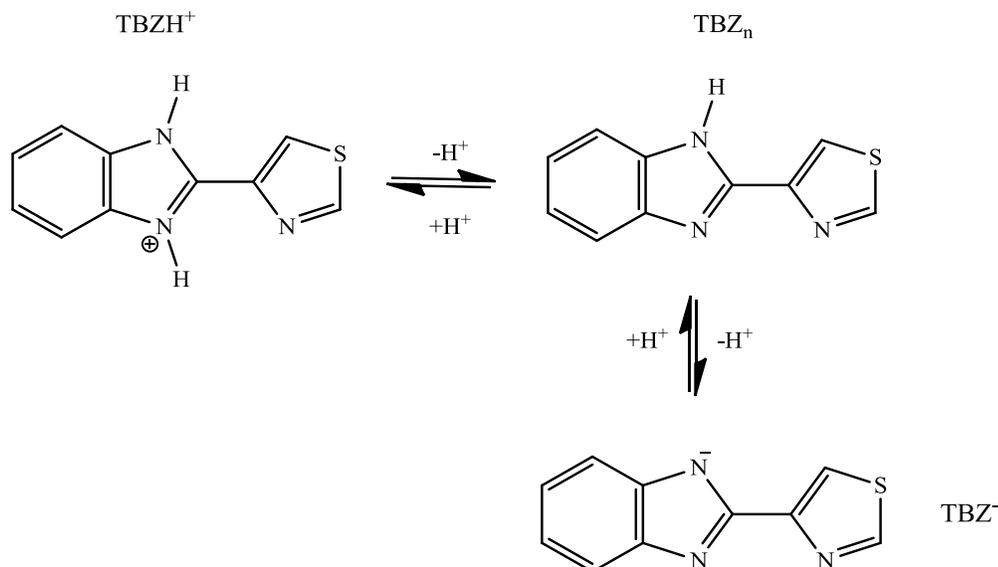
Para compreender melhor quais as espécies são responsáveis pelo sinal eletroquímico de oxidação da molécula estudada foram construídas as curvas de distribuição de espécies para TBZ em função do pH, que podem ser vistas na Figura 24.

Figura 24 – (A) Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para TBZ. (B) Estruturas químicas das espécies formadas em diferentes valores de pH

(A)



(B)



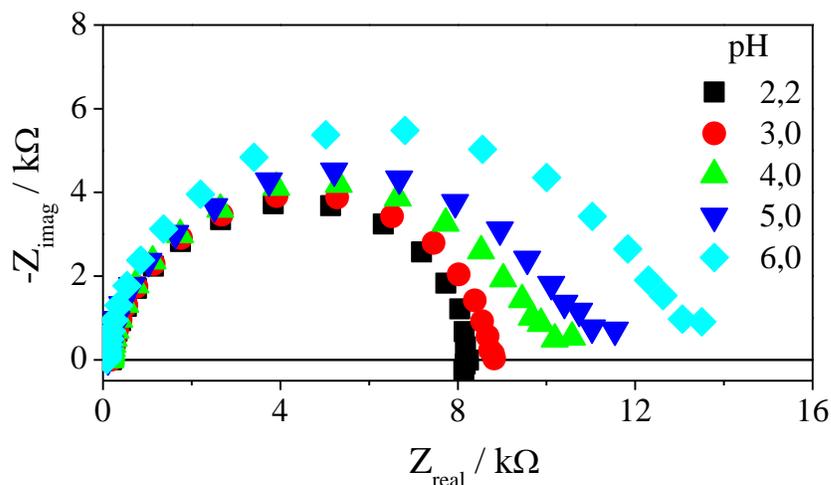
Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelo diagrama apresentado na Figura 24 (A), pode-se perceber a presença de três espécies diferentes, cada uma com a sua respectiva predominância em diferentes faixas de pH. Nos valores de composição fracionária iguais a 0,5 correspondem ao  $pK_a$ . (192) A molécula em estudo pode estar na sua forma protonada, neutra e desprotonada, representadas por TBZH<sup>+</sup>, TBZ<sub>n</sub> e TBZ<sup>-</sup>, respectivamente, como ilustrado na Figura 24 (B). Pela análise do diagrama, no pH 3,0 a molécula está predominantemente na forma TBZH<sup>+</sup>, espécie responsável pelos maiores valores de corrente de oxidação. Acima do pH 3,0, a quantidade da espécie protonada diminui, começando a coexistir com a espécie neutra TBZ<sub>n</sub>. A diminuição da corrente de pico de oxidação ocorreu à medida em que houve diminuição da fração da espécie TBZH<sup>+</sup> no sistema. No intervalo de pH entre 6,0 e 11,0, a forma predominante é a espécie neutra e nesta região ainda foram observadas correntes de oxidação.

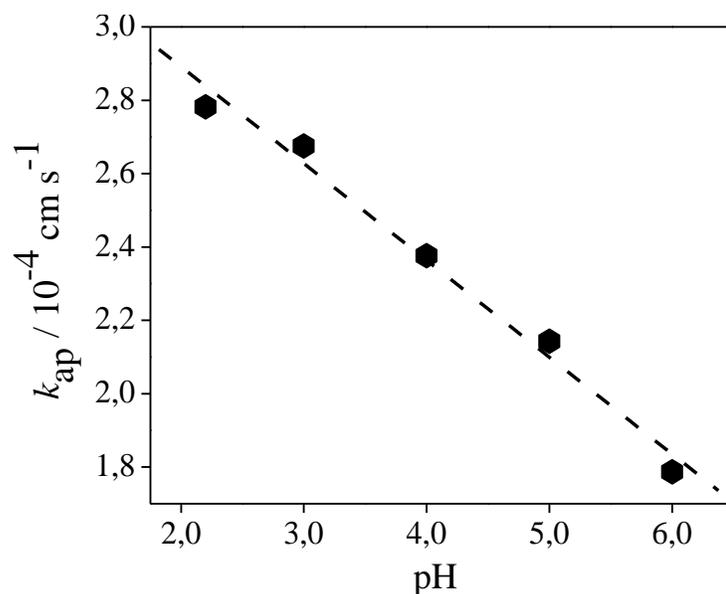
No entanto, em pH 12,0 não se observa processo de oxidação, indicando que a espécie na forma totalmente desprotonada não é eletroativa. Desta forma, as espécies responsáveis pela oxidação foram TBZH<sup>+</sup> e TBZ<sub>n</sub>. Para obter informações acerca da oxidação de TBZ, experimentos de EIE foram realizados para TBZ entre pH 2,2 e pH 6,0, região onde a espécie TBZH<sup>+</sup> passa a ser convertida à espécie TBZ<sub>n</sub>. A Figura 25 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos em diferentes valores de pH e a relação entre  $k_{ap}$  e pH.

Figura 25 – (A) Diagramas de Nyquist para TBZ  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em tampão BR no intervalo de pH entre 2,2 e 6,0, variação de frequência de 40 kHz a 4 mHz e amplitude de 10 mV. (B) Relação entre  $k_{ap}$  e pH para TBZ a partir dos experimentos de EIE

(A)



(B)

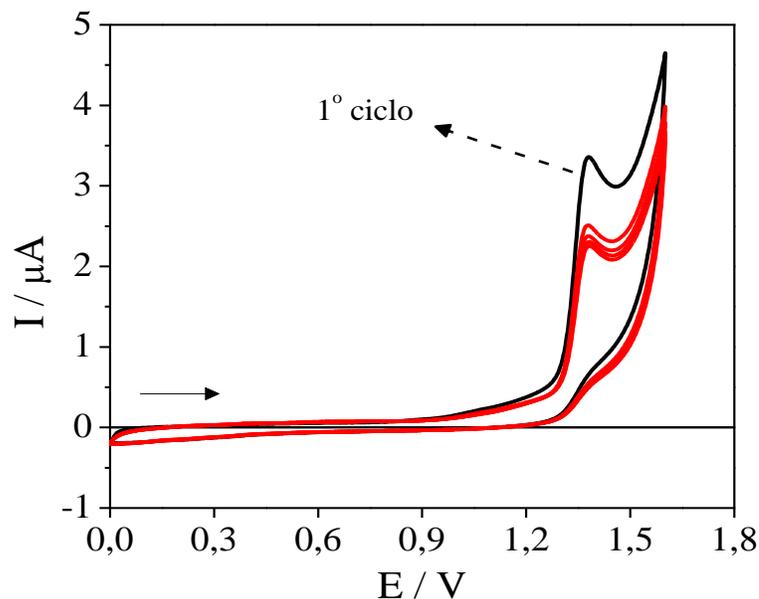


Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelos diagramas é possível observar a formação de um arco referente ao processo de transferência de carga, atribuído à oxidação do TBZ com a participação de um elétron. Ainda verifica-se que o aumento do pH promove o aumento da  $R_{tc}$ , que pode ser relacionado à diminuição da concentração da espécie  $TBZH^+$ . Pelos valores de  $R_{tc}$ , calcula-se os valores de  $k_{ap}$  para cada valor de pH. Pela Figura 25 (B), observa-se a existência de relação linear entre  $k_{ap}$  e

pH com inclinação negativa, indicando que o aumento do pH tornou a cinética da reação mais lenta, devido ao fato da reação ocorrer também com a espécie  $TBZ_n$ , presente a partir de pH 3,0. Assim, a diminuição da corrente de oxidação do TBZ em função do aumento do pH está relacionada com a cinética da reação de transferência de carga. Experimentos de VC ilustram a avaliação da eletroatividade de TBZ sobre EDDB entre 0,0 e 1,6 V a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos em meio de tampão BR pH 3,0. A Figura 26 apresenta os voltamogramas cíclicos para TBZ sobre EDDB.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0 a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na varredura direta do primeiro ciclo, registrou-se um processo de oxidação em torno de 1,3 V e na varredura inversa não houve processo eletroquímico significativo. Nos ciclos posteriores, observou-se diminuição da  $I_p$  para o processo de oxidação do TBZ, exibindo constância nos valores de corrente a partir do terceiro ciclo. Em todos os ciclos, não se verificou alteração no valor de  $E_p$  do processo de oxidação. Estes resultados indicaram que o produto da reação possivelmente ficou adsorvido na superfície do eletrodo ou, ainda, que a difusão da espécie oxidada foi lenta o suficiente para impedir a chegada de mais moléculas (não-oxidadas) à superfície do eletrodo. Portanto, a oxidação do TBZ pode ser classificada como um processo irreversível, atribuído à inativação eletroquímica do produto da reação ou devido à ocorrência

de reações químicas envolvendo o produto da oxidação. De acordo com a literatura, outras moléculas pertencentes à família dos benzimidazóis, tais como: omeprazol, pantoprazol, rabeprazol e carbendazim, exibem processos irreversíveis de oxidação. (193 - 196)

A influência da velocidade de varredura nos valores de  $I_p$  e de  $E_p$  para o processo de oxidação do TBZ foi avaliada no intervalo de 10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$ . Os resultados obtidos indicaram correlação linear entre  $I_p$  e  $\nu^{1/2}$ , sugerindo que o processo de oxidação do TBZ é controlado por uma etapa predominantemente difusional. Esta conclusão foi ratificada ao se analisar a relação linear entre  $\log I_p$  e  $\log \nu$ , que apresentou inclinação de 0,47, sendo este valor próximo do valor teórico de 0,5 para sistemas em que predominam a difusão. (197) Os experimentos ainda permitiram concluir que  $E_p$  apresentou deslocamento para valores mais positivos com o aumento de  $\nu$ , confirmando o comportamento irreversível do processo de oxidação. (198) Para reações totalmente irreversíveis, a relação entre  $E_p$  e  $\nu$  é dada pela equação 10. (35)

$$E_p = E^o - \frac{RT}{\alpha n F} \left[ 0,78 - \ln \left( \frac{k^o}{D^{1/2}} \right) + \ln \left( \frac{\alpha n F}{RT} \right)^{1/2} \left( \frac{\alpha n F}{RT} \right)^{1/2} \right] - \left( \frac{2,3RT}{2\alpha n} \right) \log \nu \quad (10)$$

em que  $E^o$  é o potencial padrão,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura,  $F$  é a constante de Faraday,  $k^o$  é a constante de velocidade,  $D$  é o coeficiente de difusão,  $\nu$  é a velocidade de varredura,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga e  $n$  é o número de elétrons transferidos. A dependência entre  $E_p$  e  $\log \nu$  apresentou relação linear com inclinação de 0,048 V. Considerando esse valor na equação 10, obteve-se  $\alpha n = 0,62$ . Considerando o valor de  $\alpha$  próximo a 0,5, (35) o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do TBZ é igual a 1.

#### ***4.3.3 Estudos dos parâmetros da voltametria de onda quadrada***

A próxima etapa do estudo se refere à otimização dos parâmetros da VOQ, que, além de fornecer as condições adequadas para o procedimento eletroanalítico, também possibilita obter informações cinéticas e do mecanismo redox envolvido. (143,199) para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0. O estudo da  $f$  foi realizado no intervalo de 5 a 100  $\text{s}^{-1}$ . Os resultados indicam que o aumento no valor da frequência provoca aumento na

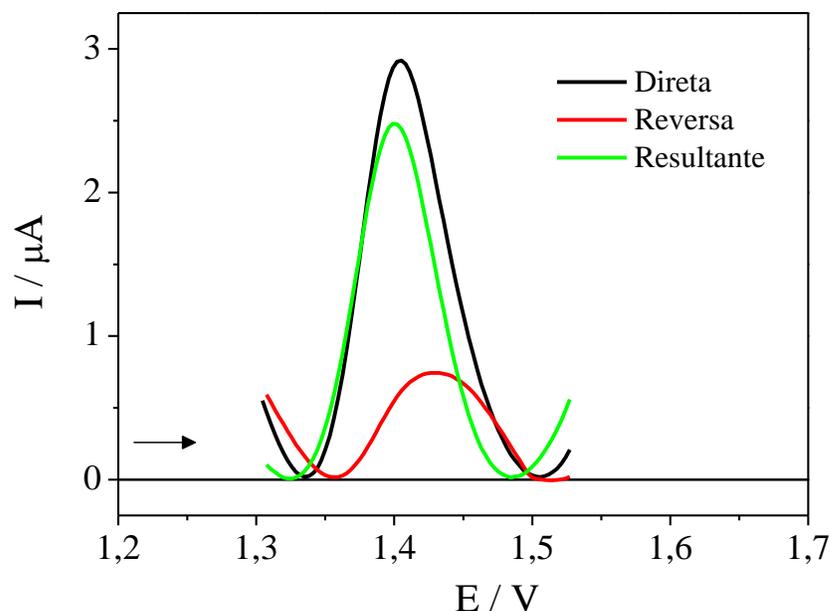
intensidade da  $I_p$ , bem como deslocamento do  $E_p$  para valores mais positivos, característica de sistemas irreversíveis. (143)

A relação entre  $I_p$  e  $f$  apresenta dependência linear somente até  $20 \text{ s}^{-1}$ . Acima deste valor, aumento não linear ocorreu até  $50 \text{ s}^{-1}$ , seguido por decréscimo com o aumento de  $f$ . Os resultados mostraram que as componentes de corrente direta e reversa apareceram no mesmo sentido e que o aumento de  $f$  favoreceu o efeito da componente reversa, proporcionando a diminuição da  $I_p$  da componente resultante. Estes resultados fornecem indícios de reação de oxidação com cinética lenta, devido à reduzida taxa de difusão de espécies eletroativa para a superfície do eletrodo. (200) Os resultados estão de acordo com os resultados de VC, que indicaram a difusão como a etapa determinante da velocidade do processo. Para propósito analítico, o valor de  $20 \text{ s}^{-1}$  foi selecionado para a determinação do TBZ. A influência de  $a$  no sinal analítico foi estudada no intervalo de 1 a 50 mV, com resposta linear entre corrente de pico e amplitude até 20 mV. Acima deste valor praticamente não houve alteração na intensidade dos valores de  $I_p$ , sem contribuição adicional de sensibilidade para efeitos analíticos. Estes resultados estão de acordo com a teoria da VOQ para sistemas irreversíveis.

Como a intensidade de corrente é proporcional à velocidade de varredura, aumento no valor de  $\Delta E_s$  pode contribuir de forma positiva para a sensibilidade da técnica. Observou-se relação linear entre  $I_p$  e  $\Delta E_s$  até 3 mV; acima deste valor, verificou-se outra relação linear com menor inclinação. Portanto, o valor de 3 mV foi escolhido para o desenvolvimento do procedimento analítico. A Figura 27 traz as três componentes de corrente para TBZ sobre EDDDB em meio de trampão BR pH 3,0 com os parâmetros  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .

A similaridade entre as intensidades de corrente das componentes direta e resultante é mais um indício (*vide* o obtido por VC, Figura 26) de que a reação de oxidação da molécula de TBZ é totalmente irreversível. As intensidades de corrente das componentes direta e resultante não são totalmente coincidentes, porque há contribuição da corrente reversa no mesmo sentido da componente direta. Este comportamento demonstra que o pulso de potencial no sentido reverso não consegue reduzir o produto da reação, mas continua a favorecer a reação de oxidação do TBZ. Para fins analíticos, optou-se por coletar os valores de corrente da componente direta.

Figura 27 – Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em tampão BR pH 3,0 com  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.3.4 Proposta de mecanismo de oxidação de tiabendazol

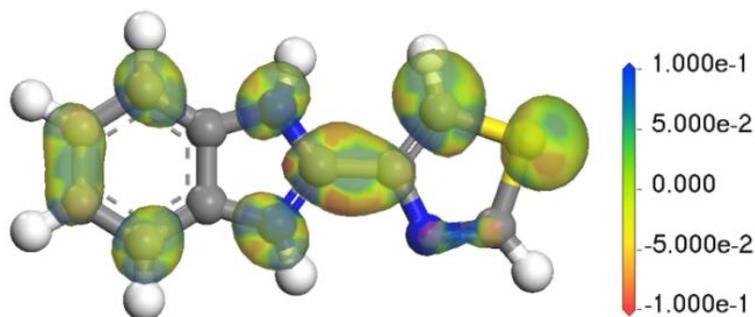
Para elucidação mecanística, foram realizados experimentos de eletrólise de TBZ  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a potencial controlado de 1,4 V por 5 horas em tampão BR pH 3,0. Após eletrólise, as amostras foram analisadas por CG-EM. Os resultados indicaram que o tempo de retenção do TBZ foi de 14,8 minutos e permitiram a identificação da formação dos produtos 4-hidróxi-4-metil-2-pentanona e 4-metil-3-pentan-2-ona, com tempos de retenção de 3,2 e 3,6 minutos, respectivamente, relacionados à possível quebra dos anéis imidazólico e aromático. De acordo com a literatura, outros compostos pertencentes à família dos benzimidazóis são oxidados com a participação de um elétron originando um cátion radical, além de sofrerem decomposição por reações de natureza química, tais como fragmentação ou rearranjo. (195)

Atualmente, os estudos químico-computacionais são ferramentas auxiliares na elucidação de mecanismos das reações redox, pelos cálculos dos orbitais de fronteira, orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), LUMO, densidade eletrônica e cargas de Mülliken. (201 - 205) Assim, foram

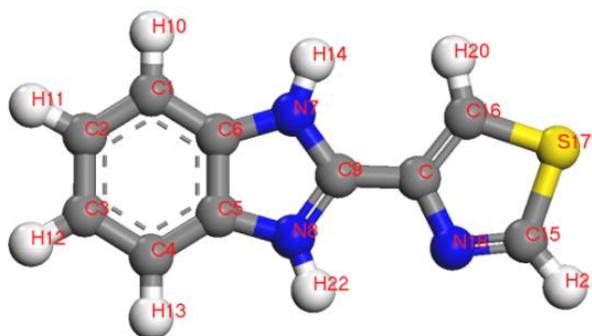
realizados os cálculos químico-computacionais para TBZ. Correlacionando os resultados obtidos no estudo do efeito do pH do meio sobre a resposta eletroquímica do TBZ com o diagrama de distribuição de espécies do TBZ, conclui-se que os maiores valores de  $I_p$  foram obtidos para TBZ na forma protonada ( $TBZH^+$ ). Neste contexto, para aproximar as condições dos cálculos teóricos às condições experimentais, foram realizados os estudos teóricos considerando a espécie  $TBZH^+$ . Como resultado, a Figura 28 ilustra os orbitais HOMO, pois estes são os responsáveis pela cessão de elétrons resultantes da oxidação eletroquímica, acompanhados da densidade eletrônica sobre a espécie  $TBZH^+$  e sua estrutura química.

Figura 28 – (A) Representação dos orbitais HOMO acompanhada da densidade eletrônica distribuída sobre a espécie  $TBZH^+$ . (B) Estrutura da espécie  $TBZH^+$ . Carbono (cinza), hidrogênio (branca), nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo).

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode ser observado que os orbitais HOMO estão dispostos em diferentes posições, mas a região da espécie que mais contribui para a formação dos orbitais HOMO e com maior densidade eletrônica é composta pelos átomos N7, N8 e C9. Para confirmar qual é o sítio mais provável para a reação foram realizados cálculos das cargas de Mülliken para a espécie  $TBZH^+$ ,

com os valores obtidos podendo ser vistos na Tabela 6. A análise populacional de Mülliken descreve a distribuição eletrônica entre os átomos de uma molécula. (206) Assim, para processos de oxidação da espécie química (elétrons removidos dos orbitais HOMO), os sítios mais prováveis de serem oxidados são aqueles que possuem os átomos com valores de carga mais negativos. (207) Ao correlacionar a distribuição dos orbitais HOMO com os valores de cargas de Mülliken, a oxidação nos átomos N(7) e N(8) se torna mais provável.

Tabela 6 – Cargas de Mülliken obtidas para TBZ, considerando o estado protonado da molécula

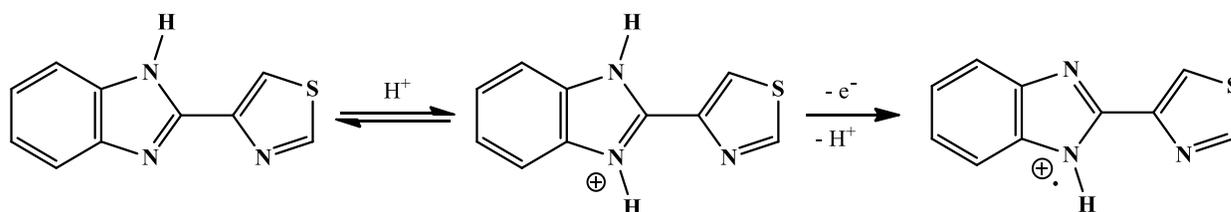
Átomo	Carga	Átomo	Carga	Átomo	Carga	Átomo	Carga
C (1)	-0,168	N (7)	-0,366	H (13)	0,100	C (19)	0,094
C (2)	-0,131	N (8)	-0,341	H (14)	0,250	H (20)	0,106
C (3)	-0,129	C (9)	0,331	C (15)	0,166	H (21)	0,118
C (4)	-0,170	H (10)	0,101	C (16)	-0,185	H (22)	0,247
C (5)	0,182	H (11)	0,095	S (17)	-0,229		
C (6)	0,181	H (12)	0,095	N (18)	-0,348		

Fonte: Elaborada pelo autor.

No entanto, considerando que houve formação do cátion-radical, que os resultados voltamétricos indicaram participação de um elétron na oxidação e que a espécie eletroativa é o  $TBZH^+$ , o responsável pela oxidação é o átomo N(8), pois esse é protonado em meio ácido. A protonação pode ser considerada como uma reação química e, portanto, o processo envolve uma etapa química seguida por uma etapa eletroquímica. (208)

Os possíveis sítios de oxidação do TBZ incluem enxofre e nitrogênio do grupo benzimidazólico. Apesar de não existir na literatura trabalhos relatando o mecanismo de oxidação eletroquímica do TBZ, outros compostos pertencentes à família dos benzimidazóis (omeprazol, pantoprazol, rabeprazol) sofreram oxidação no átomo de nitrogênio do grupo benzimidazol, com a participação de um elétron, formando cátion radical. (193-195) Baseando-se nestas informações acerca do mecanismo de oxidação dos compostos benzimidazólicos e nos resultados até aqui expostos, apresenta-se proposta de mecanismo de oxidação do TBZ, como pode ser visto na Figura 29.

Figura 29 – Proposta de mecanismo de oxidação do TBZ

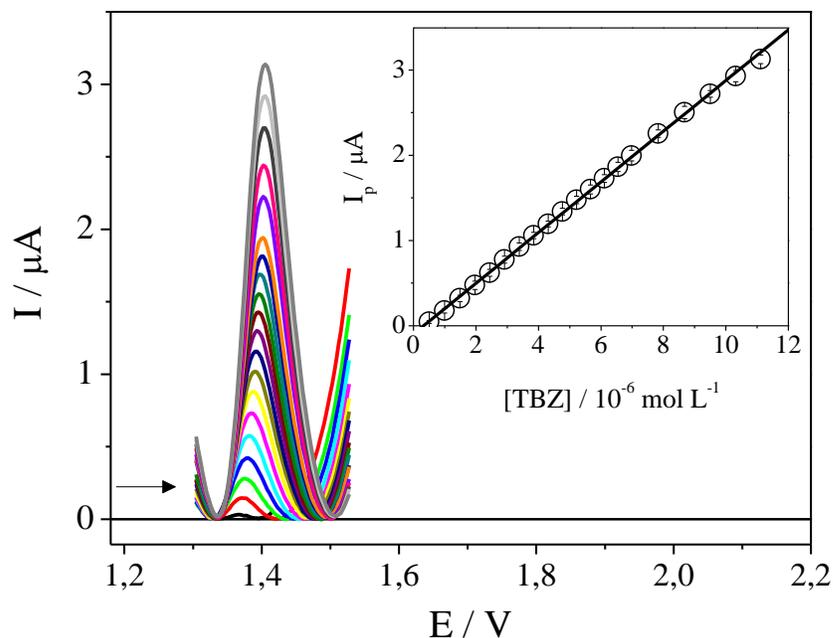


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.3.5 Curvas analíticas para tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro

Com os parâmetros voltamétricos da VOQ otimizados,  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ , foram construídas curvas analíticas para TBZ em tampão BR pH 3,0, empregando adição de padrão. A Figura 30 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de TBZ acompanhados da correlação linear entre  $I_p$  e concentração de TBZ.

Figura 30 – Voltamogramas de onda quadrada para TBZ no intervalo de  $4,98 \times 10^{-7}$  a  $1,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3,0, com  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

A concentração de TBZ variou linearmente de  $4,98 \times 10^{-7}$  a  $1,12 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, apresentando a seguinte equação da reta para a curva analítica com os respectivos intervalos de confiança de 95 %:  $I_p = -5,05 \times 10^{-8} \pm 5,98 \times 10^{-8} + 0,292 \pm 0,0184$  [TBZ] com  $R = 0,9996$ . O intercepto da equação apresentou valor negativo, quando o valor considerado como real é zero. Teste de significância foi empregado e, como o valor calculado de 3,60 foi menor que o  $t_{\text{crítico}}$  de 4,30, os erros foram considerados aleatórios. (152)

Resultados para a determinação de TBZ foram comparados com valores obtidos por UV-Vis e por CLAE, recomendados pela Farmacópeia Brasileira. (136) A Tabela 7 apresenta as figuras de mérito calculadas para o TBZ.

Tabela 7 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre EDDB empregando VOQ, UV-Vis e CLAE

Parâmetro	VOQ	UV-Vis	CLAE
RL / mol L <sup>-1</sup>	$4,98 \times 10^{-7}$ a $1,12 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$ a $7,5 \times 10^{-6}$
Equação da curva	$I_p = -5,05 \times 10^{-8} + 0,292$ [TBZ]	Abs = $1,34 \times 10^{-2} + 2,36 \times 10^4$ [TBZ]	$A = -307,69 + 5,34 \times 10^9$ [TBZ]
IC <sub>a</sub>	$\pm 5,98 \times 10^{-8}$	$\pm 6,95 \times 10^{-3}$	$\pm 436,42$
IC <sub>b</sub>	$\pm 0,0184$	$\pm 24,49$	$\pm 1,74 \times 10^8$
R	0,9996	0,9999	0,9997
S <sub>a</sub>	$2,41 \times 10^{-8}$ A	$2,8 \times 10^{-3}$ u.a.	175,79 u.a.
S <sub>b</sub>	$7,43 \times 10^{-3}$ A mol <sup>-1</sup> L	9,87 (u.a.) mol <sup>-1</sup> L	$7,02 \times 10^7$ (u.a.) mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	$2,61 \times 10^{-7}$ (52,53 ppb)	$6,47 \times 10^{-7}$ (130,21 ppb)	$2,34 \times 10^{-7}$ (47,13 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	$8,82 \times 10^{-7}$ (177,50 ppb)	$2,16 \times 10^{-6}$ (434,70 ppb)	$7,81 \times 10^{-7}$ (157,14 ppb)
%DPR (*)	4,42	1,57	–
%DPR (**)	4,67	3,74	–

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Repetibilidade; (\*\*) Reprodutibilidade

Os valores de LD e de LQ obtidos pela metodologia eletroanalítica foram 59,6% menores que os valores obtidos por UV-Vis e apenas 11,5% maiores que os valores obtidos por

CLAE. Desta forma, a metodologia eletroanalítica empregando EDDB apresentou sensibilidade satisfatória, podendo ser considerada como alternativa viável para fins analíticos. (209 - 212) A precisão do procedimento foi avaliada em termos de repetibilidade e de reprodutibilidade, com os valores de desvio padrão relativo estando abaixo de 5%. Na concepção de Švorc e colaboradores, EDDB pode ser incluído nos conceitos da Química Verde, sendo considerado como alternativa ambientalmente correta para a detecção de pesticidas. (40)

#### ***4.3.6 Determinação de tiabendazol sobre eletrodo de diamante dopado com boro em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais***

Ensaio de recuperação de TBZ foram realizados em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio. O eletrólito de suporte foi preparado com água dos açudes e os testes iniciais não detectaram a presença do pesticida. Portanto, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis de concentração (obtidos a partir da curva analítica) de TBZ, com os resultados apresentados na Tabela 8.

Quanto à avaliação dos percentuais de recuperação, obteve-se valores satisfatórios entre 70 e 130%, de acordo com as regulamentações para procedimentos analíticos. (154,155) Isso sugere que o efeito matriz não prejudicou o emprego do EDDB para análises do TBZ nas amostras complexas. No entanto, comparando matrizes das águas naturais, a metodologia foi mais eficiente em águas provenientes do açude Pacajus, indicando a presença do fator interferente relativamente mais significante nas amostras do açude Acarape do Meio. Os estudos de caracterização das amostras de águas naturais mostraram que o nível de clorofila a foi bem superior nas amostras açude Acarape do Meio ( $26,08 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao nível do açude Pacajus ( $2,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Assim, a diferença dos percentuais de recuperação entre as amostras de águas naturais podem ser atribuídas à clorofila a, que possivelmente interage com o pesticida ou se adsorve na superfície do eletrodo.

Tabela 8 – Determinação eletroanalítica de TBZ sobre EDDB em amostras de cana-de-açúcar, de manga e de águas naturais provenientes dos açúdes Pacajus e Acarape do Meio

$[\text{TBZ}]_{\text{adicionada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,90 \times 10^{-7}$	$4,76 \times 10^{-6}$	$5,66 \times 10^{-6}$
<b>Cana-de-açúcar</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,27 \times 10^{-7}$	$4,91 \times 10^{-6}$	$5,78 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,65 \times 10^{-7}$	$\pm 3,49 \times 10^{-7}$	$\pm 3,99 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	93,68	103,26	102,07
<b>% DPR</b>	2,84	2,86	2,79
<b>Manga</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$1,01 \times 10^{-6}$	$4,63 \times 10^{-6}$	$5,65 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,80 \times 10^{-7}$	$\pm 2,67 \times 10^{-7}$	$\pm 6,58 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	101,35	97,30	99,96
<b>% DPR</b>	3,19	2,32	4,69
<b>Açude Pacajus</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$7,42 \times 10^{-7}$	$4,82 \times 10^{-6}$	$5,82 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,67 \times 10^{-7}$	$\pm 1,07 \times 10^{-7}$	$\pm 1,48 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	74,94	101,11	102,91
<b>% DPR</b>	3,66	0,91	1,02
<b>Acarape do Meio</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{adicionada}} / \text{mol L}^{-1}$	$2,91 \times 10^{-6}$	$4,76 \times 10^{-6}$	$5,66 \times 10^{-6}$
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$1,99 \times 10^{-6}$	$3,71 \times 10^{-6}$	$4,60 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 2,10 \times 10^{-7}$	$\pm 4,91 \times 10^{-7}$	$\pm 3,43 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	70,96	77,95	81,33
<b>% DPR</b>	4,10	5,33	3,01

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### **4.4 Estudo eletroanalítico de tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianinas metálicas**

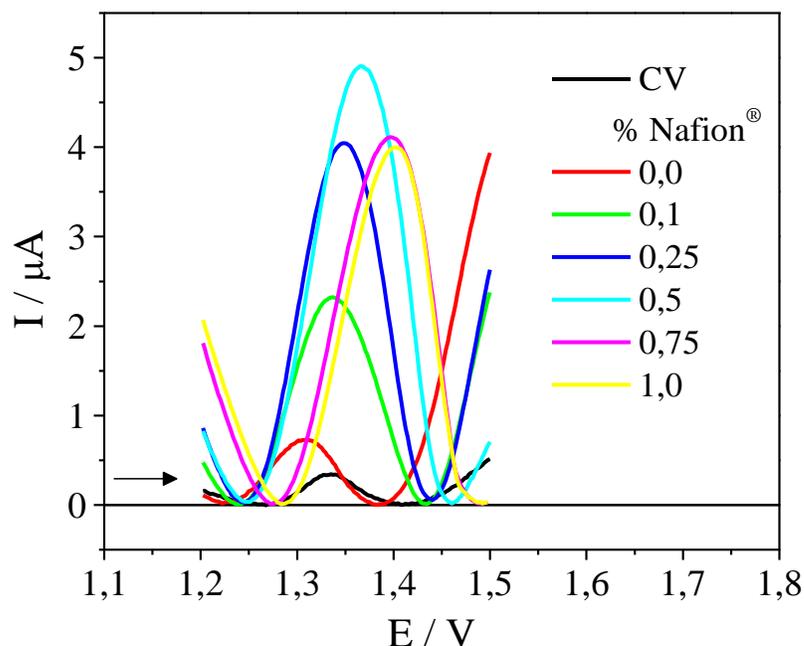
Uma das atuais perspectivas do campo da eletroanálise é o desenvolvimento de eletrodos modificados. Trabalhos aplicando NTC na construção de sensores eletroquímicos têm sido foco de diferentes artigos de revisão. (44; 213-215) Nesse contexto, o presente trabalho se volta para a construção de um eletrodo modificado à base de NTCPMF e FcM para os estudos eletroanalíticos do TBZ.

##### ***4.4.1 Otimização da construção do eletrodo modificado e do procedimento eletroanalítico para determinação de tiabendazol***

Os resultados aqui apresentados são a continuação dos estudos eletroanalíticos para TBZ sobre EDDB. Assim, tampão BR pH 3,0 como eletrólito de suporte, em função dos resultados obtidos para TBZ sobre EDDB, e a técnica de VOQ com os parâmetros  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  (empregadas nos estudos preliminares para TBZ sobre EDDB) foram utilizados para os estudos de otimização da construção do eletrodo modificado baseados em NTCPM e em FcM.

A primeira variável experimental analisada foi o percentual de Nafion<sup>®</sup>, entre 0,0 e 1,0%, na solução modificadora de NTCPMF e FcM, para promover a estabilização dos eletrodos modificados com NTC. (216) De acordo com a literatura, ftalocianinas com diferentes centros metálicos (Co, Fe, Ni, Mn, Zn e Cu) são empregadas na construção de eletrodos modificados. (44) Mais especificamente, as ftalocianinas de cobalto (FcCo) têm sido uma das FcM mais aplicadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos em função de sua elevada atividade eletrocatalítica e forte interação com materiais à base de carbono. (44,118,130,160, 217) Portanto, nesta etapa do trabalho, selecionou-se FcCo para o estudo preliminar do desenvolvimento do eletrodo modificado para a determinação de TBZ. A Figura 31 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre eletrodos modificados preparados a partir da suspensão de NTCPMF e FcCo com diferentes percentuais de Nafion<sup>®</sup>,  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 31 – Voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF/FcCo em tampão BR pH 3,0 com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , preparado a partir de suspensão contendo NTCPMF e FcCo, ambos a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em DMF com percentuais de Nafion<sup>®</sup> variando de 0,0 a 1,0%



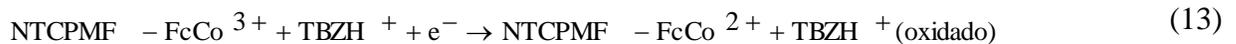
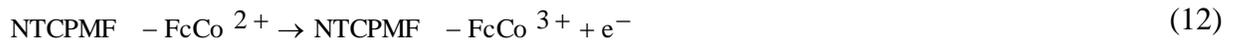
Fonte: Elaborada pelo autor.

TBZ apresentou processo de oxidação com características irreversíveis sobre eletrodo modificado, de modo semelhante ao observado sobre EDDB. Como resultado da modificação do eletrodo, tem-se que a intensidade de  $I_p$  para TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo foi mais elevada que para TBZ sobre CV e que a modificação do eletrodo com o filme de NTCPMF-FcCo, com diferentes percentuais do Nafion<sup>®</sup>, promoveram valores de  $I_p$  ainda mais elevadas para TBZ, como pode ser visto da Figura 31. Estes resultados indicam que a modificação do eletrodo promoveu a reação de transferência de elétrons e a presença do Nafion auxiliou na dispersão das FcCo sobre NTCPMF, estabilizando o eletrodo modificado e resultando em maiores valores de  $I_p$ .

O valor de  $E_p$  para TBZ sobre CV foi 1,33 V. Todavia, após a modificação com NTCPMF-FcCo (curva em vermelho) foi observado o deslocamento de  $E_p$  para valores menos positivos, concomitantemente ao aumento da  $I_p$ . Este comportamento pode ser atribuído ao efeito eletrocatalítico gerado pelo sinergismo NTCPMF-FcCo. De acordo com a literatura,

FcCo atua como mediador de transferência de carga. (218) Assim, os parâmetros termodinâmico (potencial) e cinético (corrente) podem ser influenciados. Isso porque a reação na superfície do eletrodo ocorre entre o centro metálico do sistema conjugado macrocíclico de 18 elétrons  $\pi$  (FcM) e o TBZ. O transporte de carga sobre a superfície do eletrodo modificado ocorre pelo par  $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ , conforme relatado para outros sistemas estudados envolvendo FcCo. (217,219)

Assim, o mecanismo proposto para a oxidação do TBZ em meio ácido sobre o eletrodo modificado com NTCPMF-FcCo pode ser descrito pelas seguintes equações:



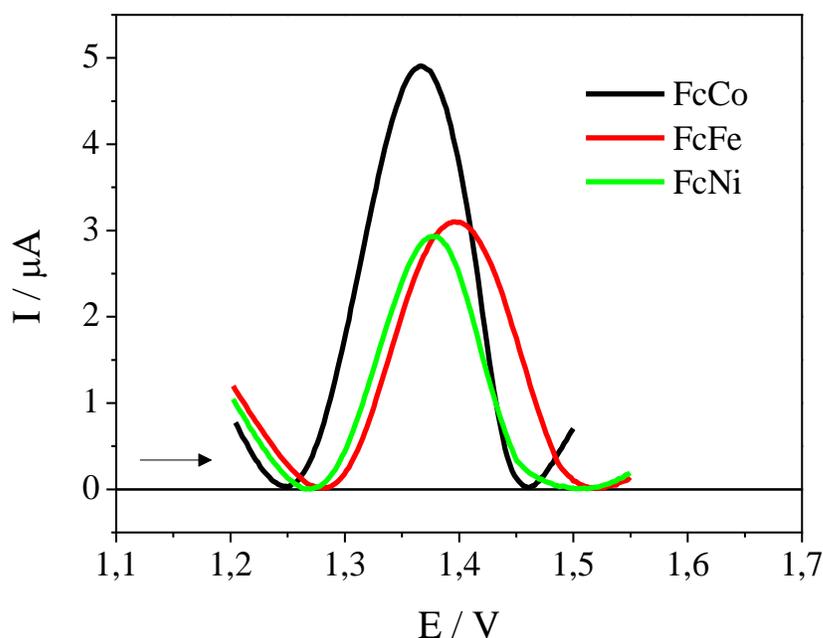
A primeira etapa (equação 11) é marcada pela etapa química de protonação do TBZ gerando a espécie protonada (*vide* diagrama de distribuição das espécies apresentado na Figura 24). Na segunda etapa (equação 12) ocorre a transferência de carga interna, formando  $\text{Co}^{3+}$ . Finalmente,  $\text{TBZH}^+$  difunde até a superfície do eletrodo, onde ocorre a reação de oxidação favorecendo a regeneração da  $\text{FcCo}^{2+}$ , como representado na equação 13.

Os resultados indicam que a  $I_p$  para o processo de oxidação do TBZ aumenta até 0,5% de Nafion<sup>®</sup>. Nesse percentual se observa que o processo de oxidação tem início em potencial menos positivo, evidenciando o efeito eletrocatalítico fornecido pelos agentes modificadores, como discutido. Acima do percentual de 0,5%, tem-se diminuição do sinal analítico, justificada pela resistência à transferência de carga oferecida pelo excesso de Nafion<sup>®</sup>, que é um polímero não condutor. Além da diminuição da  $I_p$ , acima de Naf.0,5% foi observado deslocamento do  $E_p$  para valores mais positivos, indicando que a reação de oxidação do TBZ nessas condições foi energeticamente desfavorecida, possivelmente em função da dificuldade de interação entre analito e NTCPMF-FcCo. Assim, o percentual de 0,5% de Nafion<sup>®</sup> foi selecionado para a realização dos experimentos subsequentes.

Zagal e colaboradores discutiram a utilização de diferentes ftalocianinas metálicas para a construção de sensores eletroquímicos, tais como, FcCo FcFe e FcNi. (220) De acordo com Apetrei e colaboradores, FcM podem atuar como mediadores de transferência de elétrons,

podendo intensificar o sinal analítico. (218) Neste contexto, a próxima etapa do trabalho foi avaliar o efeito do tipo de FcM no sinal voltamétrico do TBZ, por meio de comparação entre a intensidade da  $I_p$  para TBZ empregando eletrodos modificados com NTCPMF e ftalocianinas de Co, Fe e Ni. Os voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcM-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 3,0 podem ser vistos na Figura 32.

Figura 32 – Voltamogramas de onda quadrada para TBZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcM-Naf.0,5% para  $M = \text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  em meio de tampão BR pH 3,0 com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados permitem concluir que a modificação da superfície de CV com NTCPMF/FcCo promoveu maior resposta de corrente para TBZ. Esse comportamento pode ser atribuído à maior interação entre FcCo e NTCPMF, pois há interação favorável entre átomos de oxigênio e de cobalto, devido à semelhança de energia dos orbitais. (221) Assim, os resultados aqui confirmaram que a estratégia de modificação do eletrodo com o par NTCPMF-FcCo é eficiente para a construção de dispositivos para aplicação em metodologias eletroanalíticas.

Com o propósito de otimizar os parâmetros que influenciam na determinação de TBZ aplicando o eletrodo modificado com NTCPMF e FcCo, um conjunto de variáveis, tais como:

concentração dos NTCPMF na suspensão utilizada para a modificação do eletrodo, volume da suspensão, pH, tipo de eletrólito de suporte e parâmetros da VOQ foram avaliados. A Tabela 9 apresenta os parâmetros analisados com o intervalo investigado e o valor selecionado.

Tabela 9 – Parâmetros e condições otimizadas no desenvolvimento do eletrodo modificado com NTPMF e FcCo para a determinação eletroanalítica do TBZ.

Parâmetro em estudo	Intervalo investigado	Condição selecionada
Concentração de NTCPMF / mg mL <sup>-1</sup>	1 a 3	1
Volume da suspensão / µL	0,5 a 1,5	0,5
Eletrólito de suporte	Tampões BR, McI e SOR	BR
pH do meio	2,2 a 10,0	2,2
$f / s^{-1}$	10 a 60	30
$\alpha / mV$	5 a 50	20
$\Delta E_s / mV$	1 a 10	3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Até aqui se tem comprovado que a adição de NTC à superfície eletródica pode intensificar o sinal da corrente do processo faradaico. Para avaliar o efeito da concentração dos NTCPMF sobre o sinal eletroquímico de TBZ, as soluções modificadoras de NTCPMF foram preparadas com concentração entre 1 e 3 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que  $I_p$  apresentou máximo em 1 mg mL<sup>-1</sup> e acima deste valor houve um decréscimo do sinal. Estes resultados estão associados à formação do filme sem estabilidade em altas concentrações de NTCPMF, resultando na diminuição da sensibilidade do sensor.

Outra variável analisada foi o volume da suspensão modificadora adicionada à superfície do eletrodo, onde diferentes alíquotas de NTCPMF e FcCo foram adicionadas à superfície de CV. Alíquota de 0,5 µL proporcionou a obtenção do maior sinal de corrente, pelo fato de que maior espessura do filme modificador resulta em aumento da resistência à transferência de carga.

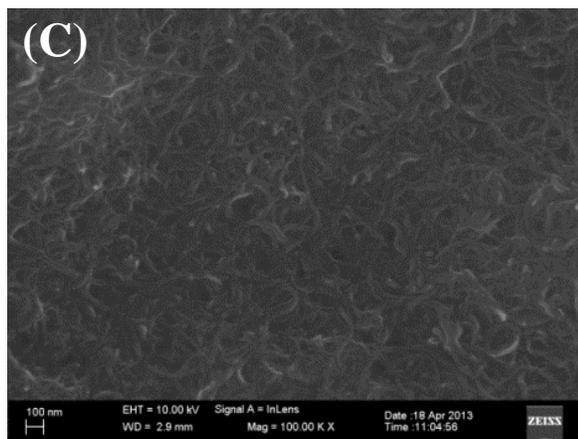
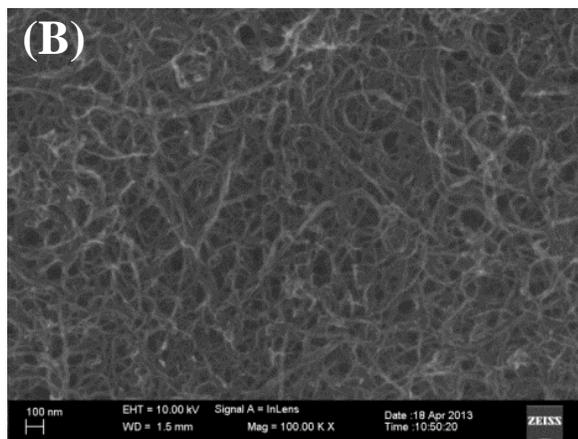
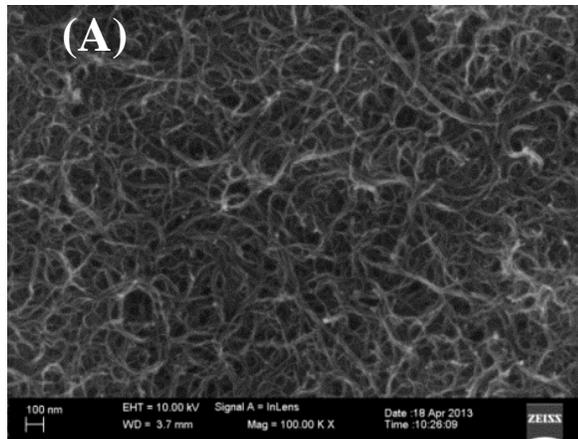
Os ensaios eletroquímicos com diferentes eletrólitos mostraram que o tampão BR foi o que apresentou maior sinal analítico em relação aos tampões McIlvaine (McI) e Sørensen (SOR). Passando para a avaliação do pH do meio, observou-se máximo da  $I_p$  em pH 2,2. Estes resultados estão de acordo com o estudo do pH do meio apresentado para TBZ sobre EDDB, em

que a espécie  $TBZH^+$  é responsável pela oxidação. Portanto, para a continuidade no desenvolvimento do procedimento eletroanalítico pH 2,2 foi selecionado. Nessa sequência, comprovou-se que o mecanismo de oxidação do TBZ sobre eletrodo modificado também envolve a etapa química de protonação antecedendo o processo eletroquímico, pois o  $E_p$  também foi deslocado para valores menos positivos em função do aumento da concentração hidrogeniônica do meio. A relação entre  $E_p$  e pH apresentou inclinação de 66,7 mV/pH, sugerindo a participação de igual número de prótons e elétrons na reação. (137) Portanto, o mecanismo de oxidação do TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% é semelhante ao que foi proposto para EDDB. A próxima otimização realizada foi a dos parâmetros da VOQ, que resultou em  $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Com as condições otimizadas para a determinação de TBZ, realizou-se a caracterização física dos NTCPM e do filme de NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%

#### ***4.4.2 Caracterização física dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e fialocianinas de cobalto***

O caráter hidrofóbico dos NTC prejudica sua dispersão e etapas prévias de funcionalização de sua estrutura são empregadas para promover melhor dispersão em solução e garantir a formação de filme homogêneo no momento da modificação do eletrodo. A funcionalização que mais tem sido empregada consiste no tratamento ácido, com as paredes e terminações dos NTC contendo grupos hidroxila, carbonila e principalmente carboxila. (222,223) Utilizando meio nitrante como descrito no procedimento experimental, após a secagem das amostras foram preparadas suspensões de NTCPM, NTCPMF e NTCPMF-FcCo, todas a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , em meio de DMF contendo Nafion<sup>®</sup> 0,5%, para a modificação da superfície de CV. Estas condições foram baseadas nos resultados obtidos para a otimização da construção do eletrodo modificado e o DMF foi usado por ser o solvente mais compatível com a hidrofobicidade do CV, levando à formação de filme mais homogêneo. (129) A caracterização dos eletrodos modificados foi realizada empregando MEV-EC, com as imagens obtidas podendo ser vistas na Figura 33.

Figura 33 – Imagens por MEV-EC de NTCPM (A) não funcionalizados, (B) funcionalizados e (C) CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%

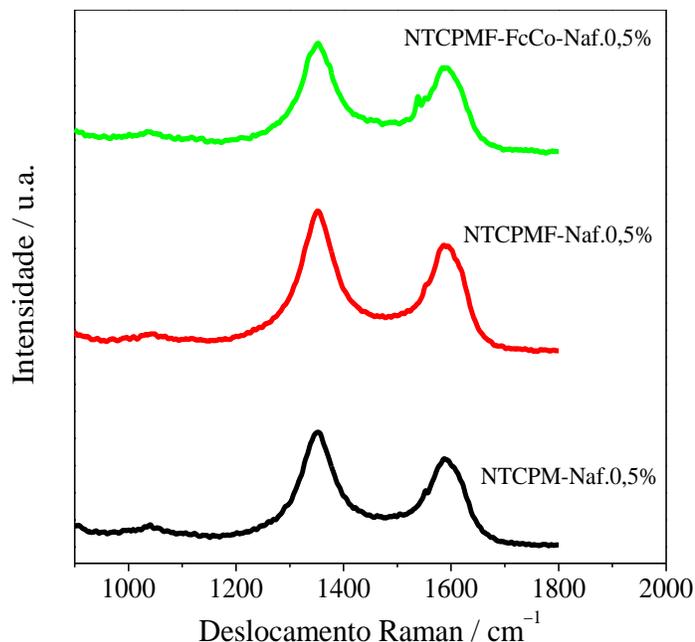


Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelas imagens obtidas é possível observar dispersão homogênea dos NTC sobre CV. O tratamento ácido praticamente não alterou a morfologia dos NTC, mas a funcionalização proporcionou a diminuição do diâmetro médio. Os valores obtidos foram 23,5 nm e 14,5 nm para NTC não funcionalizados e funcionalizados, respectivamente. Segundo Moraes e colaboradores, estes são indícios de que houve funcionalização dos nanotubos. (118) A imagem apresentada na Figura 33 (C) indica que, após a adição das FcCo, houve a formação de um filme homogêneo e mais compacto, devido à forte interação entre NTCPMF e FcCo. Esse resultado está de acordo com o indicado na literatura, pois o processo de funcionalização também é marcado por oferecer a vantagem de promover maior interação entre NTCPM e moléculas de FcCo. (224)

A espectroscopia Raman é um eficiente método para avaliar a integridade estrutural e as propriedades dos materiais baseados em NTC (42), bem como avaliar os efeitos gerados sobre a estrutura dos NTCPM após a funcionalização e a adição de FcCo. Os espectros foram obtidos a partir da excitação com laser de íon argônio ( $\text{Ar}^+$ ) com  $\lambda = 514,5 \text{ nm}$ , com os resultados apresentados na Figura 34 sendo referentes a NTCPM-Naf.0,5%, NTCPMF-Naf.0,5% e NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%.

Figura 34 – Espectros Raman obtidos a partir do laser de íon argônio com  $\lambda = 514,5 \text{ nm}$  para NTCPM-Naf.0,5%, NTCPMF-Naf.0,5% e NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%

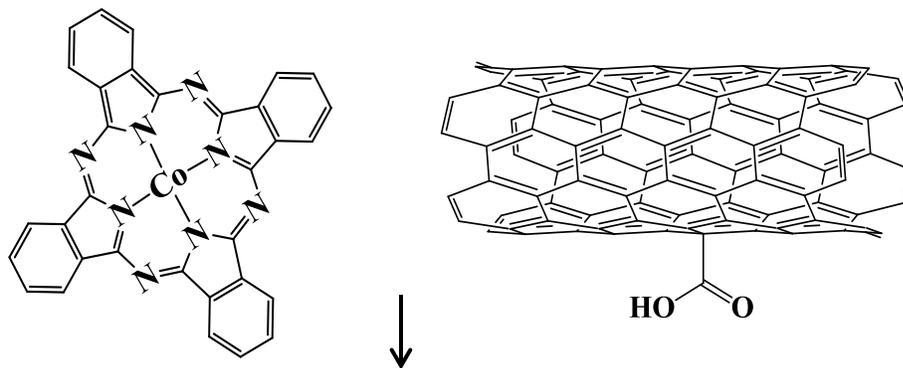
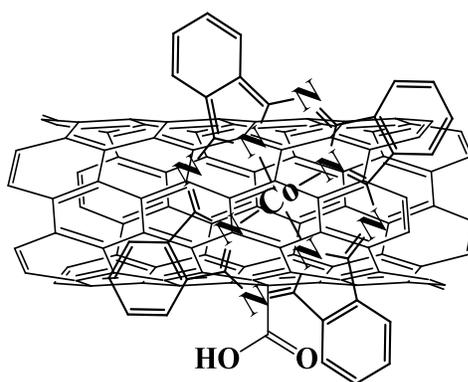


Fonte: Elaborada pelo autor.

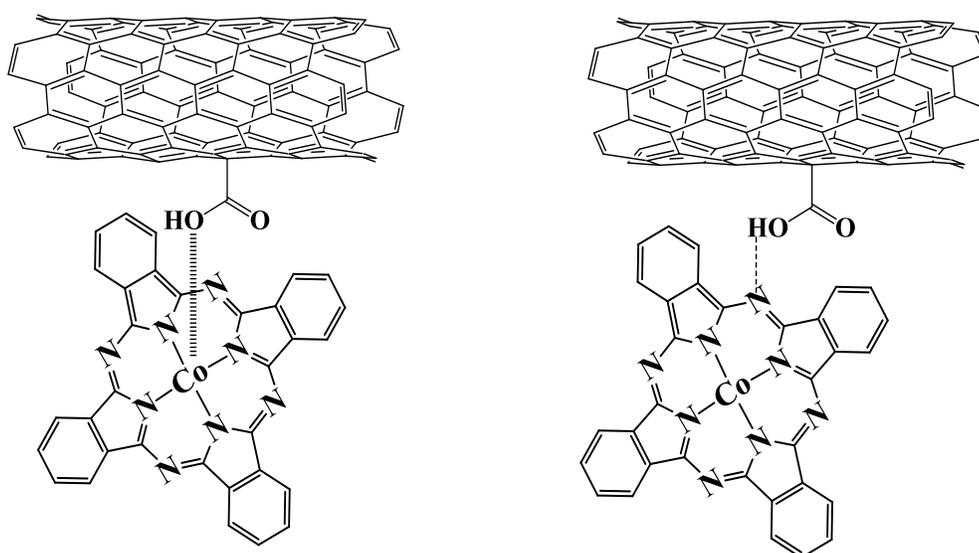
Todas as amostras analisadas apresentaram duas bandas, como pode ser visto na Figura 35. A banda com máximo em torno de  $1350\text{ cm}^{-1}$  é conhecida como banda D, devido ao modo  $A_{1g}$ , sendo referente a defeitos na estrutura e a carbonos com hibridização  $sp^3$ . Já a banda com máximo em torno de  $1586\text{ cm}^{-1}$  se deve ao modo  $E_{2g}$ , reflexo da presença de carbonos com hibridização  $sp^2$  presentes na folha de grafeno. (225) Assim, a presença das bandas D e G antes e após a funcionalização indicam que as folhas de grafeno da estrutura de NTCPM foram preservadas. No entanto, a funcionalização dos NTCPM promoveu o aumento da intensidade da banda D ( $I_D$ ) indicando a inserção dos grupos funcionais, *e.g.* grupos carboxílicos, na estrutura do NTCPM, o que favorece a imobilização de outros agentes modificadores. Outro parâmetro avaliado é o valor da razão ( $I_D/I_G$ ), conhecida com a razão entre carbonos  $sp^3/sp^2$ . Os valores de  $I_D/I_G$  obtidos para NTCPM e NTCPMF foram 1,277 e 1,282, respectivamente. Estes resultados indicam que as inserções dos grupos funcionais ocorreram principalmente nas regiões da estrutura dos NTCPM que apresentavam defeitos. Após a adição das FcCo, a razão  $I_D/I_G$  foi reduzida para 1,234. Isso pode ser atribuído ao ancoramento das FcCo (sistema macrocíclico com carbonos  $sp^2$ ) nos grupos funcionais presentes nos defeitos dos NTCPMF, resultando no aumento da população de ligações  $sp^2$  e, assim, diminuindo a intensidade da banda D.

Já tem sido bem estabelecido que FcM substituídas com grupos amino podem se ligar covalentemente sobre a superfície dos NTC por intermédio de ligações amidícas. No entanto, para FcM não substituídas a interação com NTC ocorre por meio de interações  $\pi - \pi$ . (226) Logo, as FcM não substituídas interagem com NTC sem a formação de ligações covalentes. De acordo com Li e colaboradores, além das interações  $\pi - \pi$  formadas entre os anéis aromáticos da FcM e as paredes dos NTC, pode ainda ocorrer interação entre átomos de oxigênio presentes no NTCPMF e o centro metálico da FcCo, e também a formação de interações de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da ftalocianina e o hidrogênio ácido da carboxila do NTCPMF. (227) Deste modo, as análises de espectroscopia Raman colaboraram com a formação de diferentes tipos de interações entre NTCPMF e FcCo. A Figura 35 ilustra as interações existentes entre os NTCPMF e FcCo.

Figura 35 – Representação esquemática das interações entre NTCPMF e FcCo

I) Interação  $\pi - \pi$ 

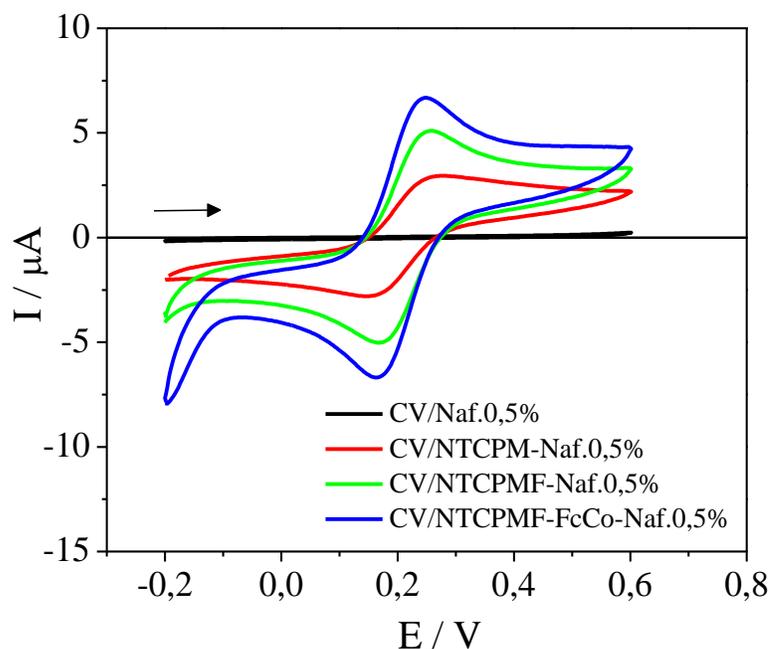
## II) Coordenação e interação de hidrogênio



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de adaptação da referência (227).

O efeito da funcionalização dos NTCPM e a adição de FcM foram avaliados empregando a técnica de VC em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo as espécies  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  e  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados mostraram que a presença de processos redox praticamente não foi observada para CV modificado com Nafion<sup>®</sup> 0,5%. Este polímero está carregado negativamente e isso dificulta a difusão dos ânions  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  em direção à superfície do eletrodo, devido à repulsão eletrostática entre o polímero e os ânions eletroativos. (228) A Figura 36 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes eletrodos modificados.

Figura 36 – Voltamogramas cíclicos obtidos para  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  e  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre CV/Naf.0,5%, CV/NTCPM-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

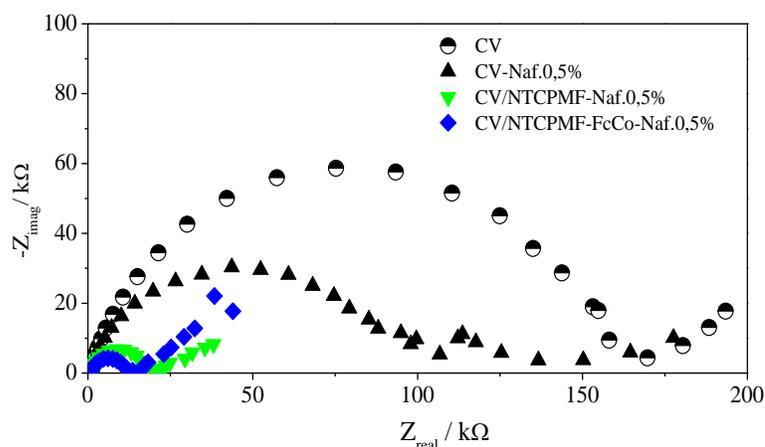
Quando NTCPM foram adicionados à superfície de CV, observou-se aumento da  $I_p$  dos processos de oxidação e de redução. A intensidade da corrente foi ainda maior para o eletrodo modificado com NTCPMF em comparação com NTCPM, indicando que a funcionalização promoveu a reação de transferência de carga. Segundo Bi e colaboradores, as paredes do NTCPM são construídas pela deslocalização dos elétrons  $\pi$  dos orbitais híbridos  $sp^2$ . Quando há presença de grupos carboxílicos nos NTCPM pode ocorrer a deslocalização da ligação  $\pi$ , promovendo o transporte de elétrons, o que justifica o aumento da corrente. (229)

A adição de FcCo promoveu aumento dos valores de corrente em comparação com o eletrodo modificado com NTCPMF. Isso está associado à capacidade das ftalocianinas de promover a mediação da transferência de carga, devido a um efeito sinérgico quando aliadas aos NTC. Os valores  $\Delta E_p$  obtidos para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  sobre os eletrodos CV/Naf.0,5%, CV/NTCPM-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foram 107,1 mV; 132,8 mV; 93,8 mV e 85,4 mV, respectivamente. Os resultados indicam aumento da reversibilidade da reação com a presença de NTCPMF e de FcCo, resultante do efeito electrocatalítico proveniente do sinergismo associado ao par NTCPMF-FcCo.

#### 4.4.3 Ensaios de espectroscopia de impedância electroquímica para as etapas de construção do eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ftalocianina de cobalto

Pela técnica de EIE, os valores de  $R_{tc}$  tendem a aumentar ou diminuir em função da dificuldade ou facilidade de transferência de elétrons oferecida pela superfície electrodródica. Experimentos de EIE foram realizados para TBZ sobre diferentes eletrodos para avaliar o efeito das modificações nas reações de transferência de carga. Na Figura 37 estão apresentados os diagramas de Nyquist obtidos para TBZ  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 2,2 com frequência variando de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV.

Figura 37 – Diagramas de Nyquist para TBZ  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV, CV-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 2,2, intervalo de frequência de 40 kHz a 2 mHz e amplitude de 10 mV



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados apresentaram somente um semicírculo para todos os eletrodos, que é característico da reação de transferência de carga. Como discutido, resultados semelhantes foram obtidos para TBZ sobre EDDB, indicando que não houve mudanças no mecanismo da reação. Os valores de  $R_{tc}$  obtidos a partir dos diagramas de Nyquist para CV, CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foram 154,19 k $\Omega$ ; 86,1 k $\Omega$ ; 15,8 k $\Omega$  e 10,1 k $\Omega$ , respectivamente. Estes resultados indicaram que as sucessivas modificações do eletrodo facilitaram a reação faradaica, uma vez que foi observada uma diminuição dos valores de  $R_{tc}$  após cada modificação. Também fica comprovado que o filme composto por NTCPMF/FcCo foi eficientemente imobilizado na superfície do CV e que houve efeito sinérgico. Além dos valores de  $R_{tc}$ , também foram obtidos os valores de  $k_{ap}$ . A Tabela 10 apresenta os valores dos parâmetros calculados a partir dos ensaios de EIE.

Tabela 10 – Parâmetros obtidos a partir dos experimentos de EIE para os eletrodos CV, CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%

<b>Eletrodo</b>	<b><math>R_{tc}</math> / k<math>\Omega</math></b>	<b><math>k_{ap}</math> / cm s<sup>-1</sup></b>
<b>CV</b>	154,19	4,60 x 10 <sup>-4</sup>
<b>CV/Naf.0,5%</b>	86,06	8,24 x 10 <sup>-4</sup>
<b>CV/NTCPMF-Naf.0,5%</b>	15,82	4,48 x 10 <sup>-3</sup>
<b>CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%</b>	10,13	6,99 x 10 <sup>-3</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

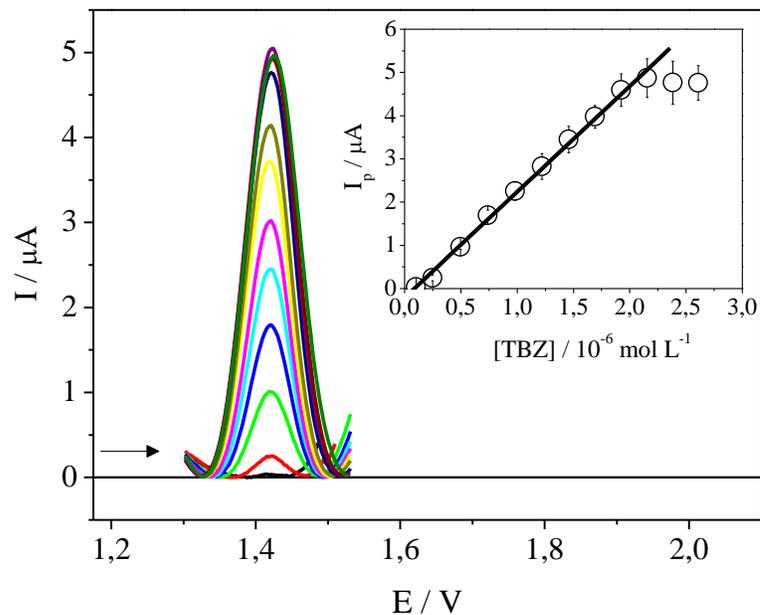
A cinética da reação de transferência de carga aumentou em função das contínuas modificações da superfície do CV, facilitando as transferências eletrônicas entre eletrodo e moléculas de TBZ. Estes resultados ratificaram os resultados obtidos por VC e VOQ, comprovando o sinergismo existente entre NTCPMF e FcCo.

#### ***4.4.4 Curvas analíticas para tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto***

Portanto, após todos os estudos de otimização: construção do eletrodo modificado e parâmetros experimentais e voltamétricos, foram construídas as curvas analíticas para TBZ

sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 2,2 empregando VOQ com  $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . A Figura 38 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidas para diferentes concentrações de TBZ acompanhados da correlação linear entre  $I_p$  e concentração de TBZ.

Figura 38 – Voltamogramas de onda quadrada para TBZ no intervalo de  $9,98 \times 10^{-8}$  a  $2,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 2,2 com  $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor

Empregando CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi observada uma linearidade entre  $9,98 \times 10^{-8}$  e  $2,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  com  $R = 0,9982$ . Após esse valor, observa-se a saturação da superfície do eletrodo. O intervalo de concentração obtido com o eletrodo modificado consistiu em valores de concentração menores que aqueles obtidos para TBZ sobre EDDB, indicando que a modificação com NTCPMF/FcCo forneceu maior sensibilidade analítica.

Os testes de significância para o intercepto negativo da curva analítica mostraram que o valor de  $t_{\text{calculado}}$  de 4,10 é menor que o valor teórico de 4,30, implicando que não há diferença significativa entre o valor observado e o valor ideal. Os valores de LD e de LQ obtidos foram  $9,52 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,019 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e  $3,18 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,064 \text{ mg kg}^{-1}$ ), respectivamente, estando abaixo dos valores de LMR de TBZ em alimentos ( $0,1$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), comparação realizada em função da inexistência de valores de LMR em águas naturais. (87)

Os dados obtidos por VOQ empregando CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foram comparados com os resultados obtidos por CLAE e UV-Vis, pois as técnicas cromatográficas têm sido as mais adotadas para a determinação de TBZ. (230) Além disso, segundo a Farmacópeia Brasileira, as técnicas de CLAE e UV-Vis são recomendadas para a determinação do TBZ. (136) Os dados obtidos para TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% empregando UV-Vis e CLAE são exibidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% empregando VOQ, UV-Vis e CLAE

Parâmetro	VOQ	UV-Vis	CLAE
RL / mol L <sup>-1</sup>	9,98 x 10 <sup>-8</sup> a 2,15 x 10 <sup>-6</sup>	1,00 x 10 <sup>-6</sup> a 5,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-7</sup> a 7,5 x 10 <sup>-6</sup>
Equação da curva	Ip = -2,12 x 10 <sup>-7</sup> + 2,46 [TBZ]	Abs = 1,34 x 10 <sup>-2</sup> + 2,36 x 10 <sup>4</sup> [TBZ]	A = -307,69 + 5,34 x 10 <sup>9</sup> [TBZ]
IC <sub>a</sub>	± 2,22 x 10 <sup>-7</sup>	± 6,95 x 10 <sup>-3</sup>	± 436,42
IC <sub>b</sub>	± 0,87	± 24,49	± 1,74 x 10 <sup>8</sup>
R	0,9982	0,9999	0,9997
S <sub>a</sub>	8,96 x 10 <sup>-8</sup> A	2,8 x 10 <sup>-3</sup> u.a.	175,79 u.a.
S <sub>b</sub>	3,49 x 10 <sup>-1</sup> A mol <sup>-1</sup> L	9,87 (u.a.) mol <sup>-1</sup> L	7,02 x 10 <sup>7</sup> u.a mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	9,52 x 10 <sup>-8</sup> (19,16 ppb)	6,47 x 10 <sup>-7</sup> (130,21 ppb)	2,34 x 10 <sup>-7</sup> (47,13 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	3,18 x 10 <sup>-7</sup> (63,99 ppb)	2,16 x 10 <sup>-6</sup> (434,70 ppb)	7,81 x 10 <sup>-7</sup> (157,14 ppb)
%DPR (*)	4,88	1,57	–
%DPR (**)	3,59	3,74	–

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Repetibilidade; (\*\*) Reprodutibilidade

Os resultados foram inferiores aos obtidos sobre EDDB (LD = 2,61 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> e LQ = 8,82 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>), bem como por UV-Vis e por CLAE, evidenciando que o procedimento eletroanalítico desenvolvido merece posição de destaque para análises de contaminantes ambientais. Outros trabalhos recentemente publicados na literatura mostraram que os métodos eletroanalíticos, principalmente utilizando VOQ, têm apresentado sensibilidades semelhantes e até mesmo menores que aqueles obtidos pelos métodos cromatográficos para a detecção de pesticidas. (231 -233) Também foram alcançados valores de repetibilidade e de reprodutibilidade abaixo de 5%, o que confere precisão satisfatória para análises de TBZ sobre

CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%. Assim, conclui-se que a determinação de resíduos de TBZ em amostras de alimentos e em águas naturais, empregando procedimentos eletroanalíticos pode ser viabilizada, devido aos baixos valores de LD. Além do mais, com a sensibilidade alcançada, ficam disponíveis argumentos para que os órgãos públicos possam discutir sobre a implementação de ferramentas analíticas alternativas para análise de pesticidas em matrizes ligadas à proteção ambiental e à saúde humana. Isso tendo em mente, por exemplo, a criação de um programa cujo objetivo principal consistisse no estabelecimento de LMR para pesticidas em amostras de águas naturais, por se tratar de um dos maiores bens naturais.

#### ***4.4.5 Determinação de tiabendazol sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocinina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar, manga e águas naturais***

Do mesmo modo do estudo eletroanalítico para TBZ sobre EDDB, o procedimento desenvolvido empregando CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi aplicado em amostras de cana-de-açúcar, manga e de águas provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio, com os resultados de recuperação apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Determinação eletroanalítica de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em amostras de cana-de-açúcar, manga e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio

<b>[TBZ]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	2,49 x 10 <sup>-7</sup>	7,39 x 10 <sup>-7</sup>	1,22 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Cana-de-açúcar</b>			
<b>[TBZ]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	2,42 x 10 <sup>-7</sup>	7,46 x 10 <sup>-6</sup>	1,21 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,18 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,70 x 10 <sup>-7</sup>	± 1,39 x 10 <sup>-7</sup>
<b>% Recuperação</b>	97,67	101,0	99,68
<b>% DPR</b>	2,92	3,79	4,62
<b>Manga</b>			
<b>[TBZ]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	2,66 x 10 <sup>-7</sup>	6,80 x 10 <sup>-6</sup>	1,18 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,34 x 10 <sup>-7</sup>	± 4,97 x 10 <sup>-7</sup>	± 1,56 x 10 <sup>-7</sup>

Continua: Tabela 12 – Determinação eletroanalítica de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em amostras de cana-de-açúcar, manga e de águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio

<b>% Recuperação</b>	106,82	92,03	96,69
<b>% DPR</b>	5,15	8,1	5,34
<b>Pacajus</b>			
<b>[TBZ]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$2,39 \times 10^{-7}$	$7,53 \times 10^{-7}$	$1,375 \times 10^{-7}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,11 \times 10^{-7}$	$\pm 1,13 \times 10^{-7}$	$\pm 0,32 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	96,31	101,88	112,82
<b>% DPR</b>	1,82	6,0	0,96
<b>Acarape do Meio</b>			
<b>[TBZ]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	$1,75 \times 10^{-7}$	$6,43 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,16 \times 10^{-7}$	$\pm 0,44 \times 10^{-7}$	$\pm 1,24 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	70,89	86,97	100,04
<b>% DPR</b>	3,67	2,38	4,08

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma das principais motivações para utilização de eletrodos modificados é a possibilidade de aumento da sensibilidade, resultando em menores valores de LD e de LQ. No entanto, a avaliação da robustez frente aos possíveis interferentes presentes em amostras complexas é um item que deve ser investigado quando da utilização de eletrodos modificados.

Os resultados na Tabela 12 mostraram que os valores de recuperação para as frutas ficaram entre 92,03% e 106,82%, o que denota a eficiência do dispositivo para aplicações analíticas relacionadas com segurança alimentar. Quando aplicado nas amostras de águas naturais foram encontrados percentuais entre 70,89% e 112,82%.

O baixo percentual de recuperação no nível 1 para amostra de águas naturais do açude Acarape do Meio pode ser atribuído, possivelmente à clorofila a, que está presente em concentração em torno de dez vezes maior neste corpo hídrico ( $26,08 \mu\text{g L}^{-1}$ ) que na amostra proveniente do açude Pacajus ( $2,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No entanto, mesmo assim, o eletrodo CV/NTCPMF/FcCo-Naf.0,5% em conjunto com a VOQ foi adequado para análises de TBZ em amostras de águas naturais, sem a necessidade da realização de etapas complexas de preparação

de amostra. A utilização do eletrodo modificado possibilitou análises em níveis mais baixos de concentração em relação ao EDDB, evidenciando que maior sensibilidade foi alcançada.

#### **4.5 Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto para a determinação de tiabendazol**

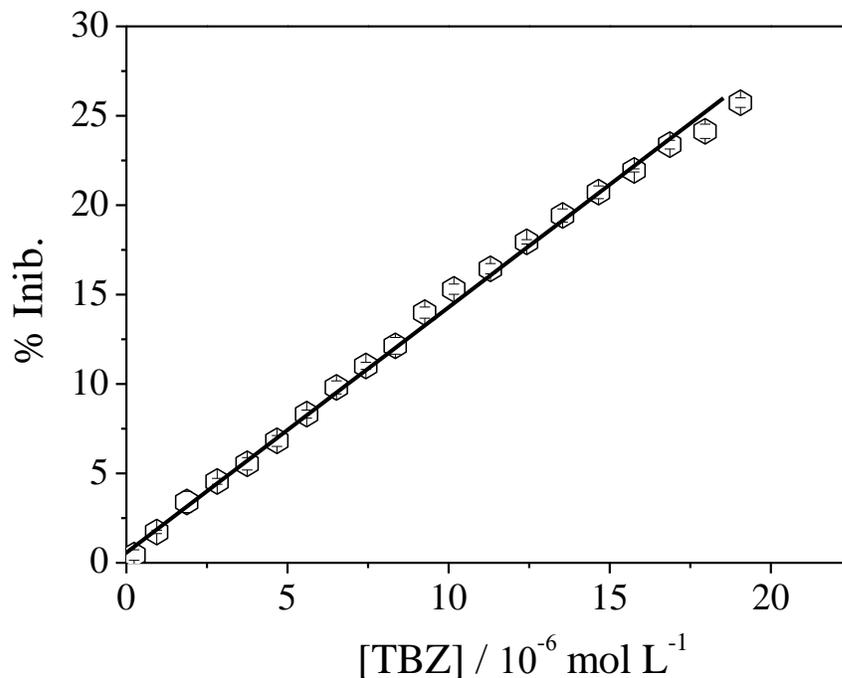
A literatura não apresenta nenhum estudo envolvendo biossensor enzimático para a determinação do pesticida TBZ. Portanto, ressalta-se aqui a motivação de avaliar a possibilidade da utilização do biossensor baseado na enzima Lac para a determinação de TBZ. O dispositivo empregado nos estudos foi o CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%, ou seja, o mesmo empregado na determinação do pesticida organoclorado EDS, uma vez que o ambiente consistindo nos NTCPMF-FcCo apresentou biocompatibilidade com a enzima Lac, ou seja, não prejudicou a sua atividade.

Assim, adotando as mesmas condições empregadas para o biossensor utilizado para a determinação do EDS, tais como: tampão BR pH 5,0, ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e parâmetros da VOQ ( $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ), foram realizados os testes de inibição da atividade enzimática da Lac pelo pesticida TBZ. Para os experimentos, optou-se por iniciar com a concentração do TBZ de  $2,36 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , pois, essa concentração corresponde ao primeiro ponto da curva analítica, em que foi observada a inibição da enzima Lac pelo EDS. Na sequência, foram realizadas sucessivas adições da solução estoque de TBZ à célula eletroquímica contendo tampão BR pH 5,0 e ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados mostraram que para TBZ entre  $2,36 \times 10^{-7}$  e  $4,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% empregando VOQ não foi possível perceber o fenômeno de inibição. Contudo, pelos experimentos empregando VC com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  foi possível perceber a diminuição da  $I_p$  para ABTS indicando que TBZ inibiu a enzima Lac. A inibição pode ocorrer possivelmente em decorrência na interação entre o grupo tiazol (presença do átomo de enxofre) do TBZ e os íons cobre da Lac. Fernandez e colaboradores apresentaram como proposta de inibição da Lac pelo pesticida metomil, as coordenações entre os átomos de N e de S do pesticida com o íon Cu do tipo T1 (N-Cu e S-Cu). (234)

As curvas analíticas para TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 contendo ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foram obtidas na faixa de  $2,36 \times 10^{-7}$  a

$1,68 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 39 apresenta a relação entre % Inib. e concentração do TBZ obtida sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 contendo ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  obtida por VC com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Os resultados indicaram que, após cada adição de alíquotas da solução do pesticida, foi possível observar a diminuição da intensidade da  $I_p$  referente a redução do substrato sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2%. Esses resultados confirmam que o pesticida TBZ inibiu a atividade da Lac.

Figura 39 – Curva analítica para TBZ entre  $2,36 \times 10^{-7}$  e  $1,68 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% na presença de ABTS  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0



Fonte: Elaborada pelo autor

Observou-se correlação entre %Inib. e concentração do pesticida TBZ ( $R = 0,9994$ ), com os valores de  $LD = 4,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 1,55 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sendo maiores que aqueles obtidos para TBZ sobre EDDB ( $LD = 2,61 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 8,62 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) e para TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% ( $LD = 9,52 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 3,18 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). Os resultados obtidos para TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% também foram comparados com os dados obtidos por UV-Vis e CLAE. A Tabela 13 apresenta os valores calculados das figuras de mérito para TBZ empregando biossensor enzimático, UV-Vis e CLAE.

Tabela 13 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Naf.0,5% empregando VC, UV-Vis e CLAE

Parâmetro	Biossensor	UV-Vis	CLAE
RL / mol L <sup>-1</sup>	2,36 x 10 <sup>-7</sup> a 1,68 x 10 <sup>-5</sup>	1,00 x 10 <sup>-6</sup> a 5,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-7</sup> a 7,5 x 10 <sup>-6</sup>
Equação da curva	% Inib. = 0,598 + 1,38 x 10 <sup>6</sup> [TBZ]	Abs = 1,34 x 10 <sup>-2</sup> + 2,36 x 10 <sup>4</sup> [TBZ]	A = -307,69 + 5,34 x 10 <sup>9</sup> [TBZ]
IC <sub>a</sub>	± 0,321	± 6,95 x 10 <sup>-3</sup>	± 436,42
IC <sub>b</sub>	± 3,35 x 10 <sup>4</sup>	± 24,49	± 1,74 x 10 <sup>8</sup>
R	0,999	0,9999	0,9997
S <sub>a</sub>	0,215 %Inib.	2,8 x 10 <sup>-3</sup> u.a.	175,79 u.a.
S <sub>b</sub>	5,51 x 10 <sup>3</sup> %Inib. mol <sup>-1</sup> L	9,87 (u.a.) mol <sup>-1</sup> L	7,02 x 10 <sup>7</sup> (u.a) mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	4,66 x 10 <sup>-7</sup> (93,78 ppb)	6,47 x 10 <sup>-7</sup> (130,21 ppb)	2,34 x 10 <sup>-7</sup> (47,13 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	1,55 x 10 <sup>-6</sup> (311,94 ppb)	2,16 x 10 <sup>-6</sup> (434,70 ppb)	7,81 x 10 <sup>-7</sup> (157,14 ppb)
%DPR (*)	0,25%	1,57%	-
%DPR (**)	3,46%	3,74%	-

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Repetibilidade; (\*\*) Reprodutibilidade

Os valores de LD e de LQ obtidos pela metodologia eletroanalítica foram menores que os valores obtidos por UV-Vis e maiores que os valores obtidos por CLAE. Desta forma, a metodologia eletroanalítica empregando biossensor apresentou sensibilidade satisfatória, podendo ser considerada como alternativa viável para fins analíticos.

#### ***4.5.1 Determinação de tiabendazol sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase, nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de cana-de-açúcar e águas naturais***

O biossensor proposto também teve sua aplicabilidade testada pelos experimentos de recuperação de TBZ em amostras de cana-de-açúcar e águas naturais provenientes dos açudes Pacajus e Acarape do Meio. Os estudos foram realizados com amostras fortificadas em três

diferentes níveis de concentração de TBZ e os resultados apresentados podem ser vistos na Tabela 14.

Tabela 14 – Determinação eletroanalítica de TBZ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% em amostras de cana-de-açúcar e de águas naturais provenientes dos açúdes Pacajus e Acarape do Meio

$[\text{TBZ}]_{\text{adicionada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,42 \times 10^{-7}$	$4,67 \times 10^{-6}$	$6,52 \times 10^{-6}$
<b>Cana-de-açúcar</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$8,87 \times 10^{-7}$	$4,25 \times 10^{-6}$	$6,49 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 1,06 \times 10^{-7}$	$\pm 1,58 \times 10^{-7}$	$\pm 2,62 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	94,19	90,99	99,53
<b>% DPR</b>	4,82	1,50	1,63
<b>Açúde Pacajus</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,81 \times 10^{-7}$	$4,57 \times 10^{-6}$	$6,36 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,90 \times 10^{-7}$	$\pm 1,48 \times 10^{-6}$	$\pm 2,26 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	104,19	101,7	97,62
<b>% DPR</b>	3,71	3,46	4,75
<b>Açúde Acarape do Meio</b>			
$[\text{TBZ}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,66 \times 10^{-7}$	$4,34 \times 10^{-6}$	$6,85 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,85 \times 10^{-7}$	$\pm 4,94 \times 10^{-7}$	$\pm 4,81 \times 10^{-6}$
<b>% Recuperação</b>	102,62	92,98	105,03
<b>% DPR</b>	3,53	4,58	5,54

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os percentuais de recuperação para as amostras ficaram entre 90,99 e 105,03%, com DPR entre 1,50 e 5,54%, indicando que o biossensor CV/NTCPMF-FcCo/Lac-Glu.2% apresentou precisão e exatidão satisfatórias para determinação de TBZ em amostras complexas.

## 4.6 Estudo eletroanalítico do formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro

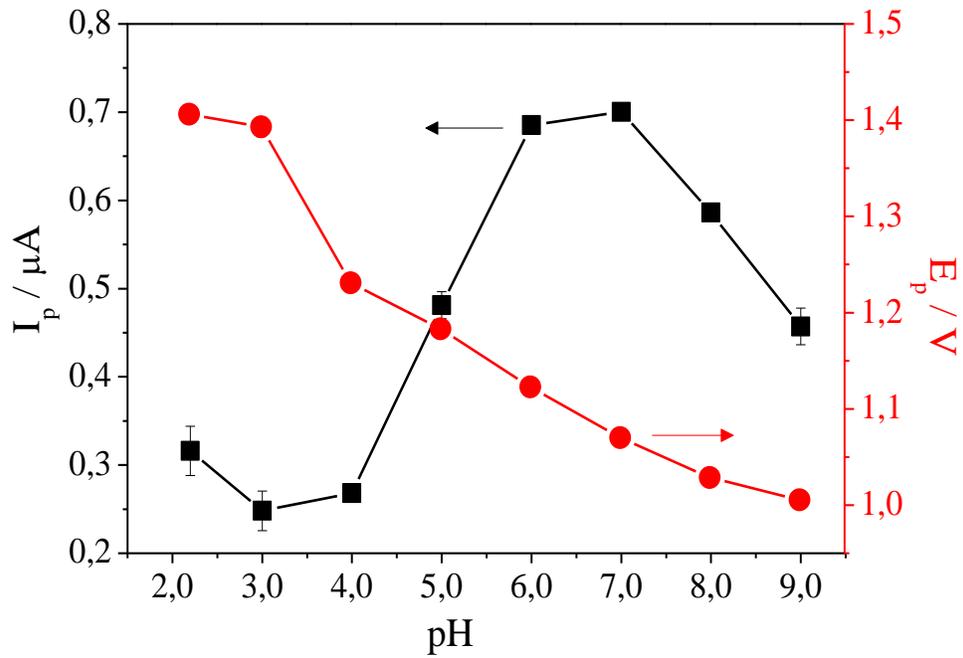
### 4.6.1 Comportamento eletroquímico do formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro

O pesticida formetanato (FMT, classe toxicológica I - ANVISA) pertence à classe dos carbamatos. Na literatura é encontrado somente um trabalho apresentando estudo eletroanalítico do FMT e a técnica empregada foi a polarografia. (121) Neste sentido, o estudo eletroanalítico empregando eletrodo sólido se torna interessante. Inicialmente, foram realizados experimentos de VOQ para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 5,0. Este meio foi selecionado em função dos estudos para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre eletrodo modificado CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% terem apontado maior intensidade de  $I_p$  para a oxidação do FMT em meio de tampão BR pH 5,0. Os estudos preliminares foram realizados comparando o perfil voltamétrico para FMT obtidos em dois diferentes conjuntos de parâmetros de VOQ, a saber,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  (condição A) e  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  (condição B). Os parâmetros da condição B foram escolhidos em função dos resultados apresentados para o estudo do TBZ sobre EDDB (*vide* seção 4.3), já os parâmetros da condição A são os tradicionalmente empregados em estudos iniciais de VOQ. Os resultados mostraram que na condição A não foi possível identificar com precisão o processo de oxidação do FMT. O que pode ser atribuído a cinética lenta de transferência de carga entre FMT e EDDB com dopagem de boro a 8000 ppm.

Já na condição B, observou-se processo de redução irreversível bem definido com  $E_p = 1,19 \text{ V}$  e  $\Delta E_{p/2} = 85,3 \text{ mV}$ . Nestas circunstâncias, adotou-se os parâmetros da condição B para o desenvolvimento da metodologia.

Na sequência, realizou-se estudo do pH do meio para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR com diferentes valores de pH. A Figura 40 apresenta a relação entre  $I_p$ ,  $E_p$  e pH obtidas para FMT sobre EDDB.

Figura 40 – Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em tampão BR com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro

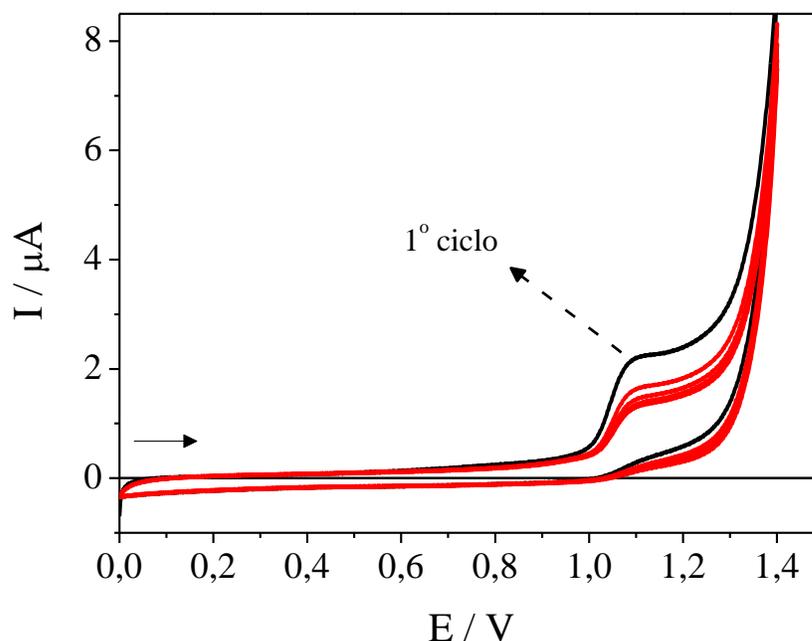


Fonte: Elaborada pelo autor.

A reação de oxidação do FMT sobre EDDB foi influenciada pelo pH do meio, pois seu aumento proporcionou o deslocamento do  $E_p$  para valores menos positivos, como pode ser visto na Figura 40. No entanto, esta influência não resultou no comportamento linear entre  $E_p$  e pH. Estes resultados indicam que prótons participam de uma das etapas do mecanismo da reação, mas que essa etapa não é a determinante do processo. A intensidade de  $I_p$  apresentou o valor máximo em pH 7,0, seguido pelo decréscimo da corrente com o aumento da basicidade do meio. É relatado na literatura que em meio básico o FMT pode ser hidrolisado. (110) A reação de hidrólise do FMT resulta na deficiência da espécie que passa pelo processo eletroquímico, conseqüentemente promovendo o decaimento da  $I_p$ . Em função do maior valor da  $I_p$  foi selecionado o pH 7,0 para os demais estudos.

Além dos experimentos de VOQ também foram realizados experimentos de VC para FMT sobre EDDB. A Figura 41 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos no intervalo entre 0,0 V e 1,4 V para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0 com  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos.

Figura 41 – Voltamogramas cíclicos para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0 a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos



Fonte: Elaborada pelo autor.

O primeiro ciclo apresentou na varredura direta um processo de oxidação em torno de 1,1 V e no sentido reverso não foi observado nenhum processo eletroquímico, como pode ser observado na Figura 41. Portanto, o processo de oxidação do FMT é irreversível. Nos ciclos subsequentes não foi observado nenhum processo eletroquímico adicional no intervalo de varredura estudado. Além disso, a partir do segundo ciclo, foi observada a diminuição da  $I_p$ , possivelmente associada à lenta difusão da espécie eletroativa, pois também não foi observado deslocamento do  $E_p$  nos ciclos posteriores, o que era esperado para processos em que ocorre a adsorção do produto da reação. Além disso, houve estabilização da corrente a partir do quarto ciclo. Estes resultados confirmam a propriedade dos filmes de diamante dopado com boro, que na grande maioria dos sistemas apresenta inércia frente à adsorção de espécies que prejudicam a reprodutibilidade dos experimentos. (235)

De acordo com os critérios diagnósticos da VC para processos irreversíveis, existe uma relação que possibilita calcular o número de elétrons dado pela equação 14. (198,236)

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = \frac{1,857RT}{\alpha nF} \quad (14)$$

em que  $E_{p/2}$  é o potencial no ponto onde a corrente é metade da corrente de pico ( $I_p/2$ ) e os demais termos apresentam os significados já citados.

O valor de  $E_p - E_{p/2}$  calculado a partir do primeiro ciclo do voltamograma cíclico obtido com  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  foi 84 mV e aplicando na equação 14 chegou-se a  $\alpha n = 0,57$  e tomando  $\alpha = 0,5$ , obteve-se número de elétrons igual a um. Apesar de não existir na literatura trabalhos envolvendo a oxidação eletroquímica do FMT, outros pesticidas carbamatos exibiram processos de oxidação com a participação de um elétron envolvendo o átomo de nitrogênio no sistema conjugado. (237) A investigação em diferentes velocidades de varredura ainda resultou na linearidade entre  $I_p$  e raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando a predominância da difusão de FMT no sistema. Esse resultado ratifica uma das principais características do EDDB, que é a de possuir baixa capacidade de reter espécies adsorvidas em sua superfície. (38)

#### 4.6.2 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

A partir dos estudos dos parâmetros da VOQ foi possível perceber que, mesmo com as mudanças das variáveis  $f$ ,  $a$  e  $\Delta E_s$ , o sistema representado pela oxidação do FMT sobre EDDB permaneceu com as características de irreversibilidade, pois foram observados somente processos de oxidação. Para aplicação analítica, os parâmetros otimizados foram  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Estes valores foram selecionados por terem sido o limite da linearidade observada entre  $I_p$  vs  $f$ ,  $I_p$  vs  $a$  e  $I_p$  vs  $\Delta E_s$ , respectivamente.

Os experimentos de VOQ para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0 com  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  demonstraram que a  $I_p$  para componente resultante foi menor que a corrente da componente direta. De acordo com a teoria da VOQ para reações controladas pela cinética de transferência de carga, ou seja, quando a reação não é eletroquimicamente reversível, a resposta depende do coeficiente de transferência de carga e do parâmetro cinético  $\kappa$  expresso pela equação 15. (143)

$$\kappa = \frac{k_s}{\sqrt{Df}} \quad (15)$$

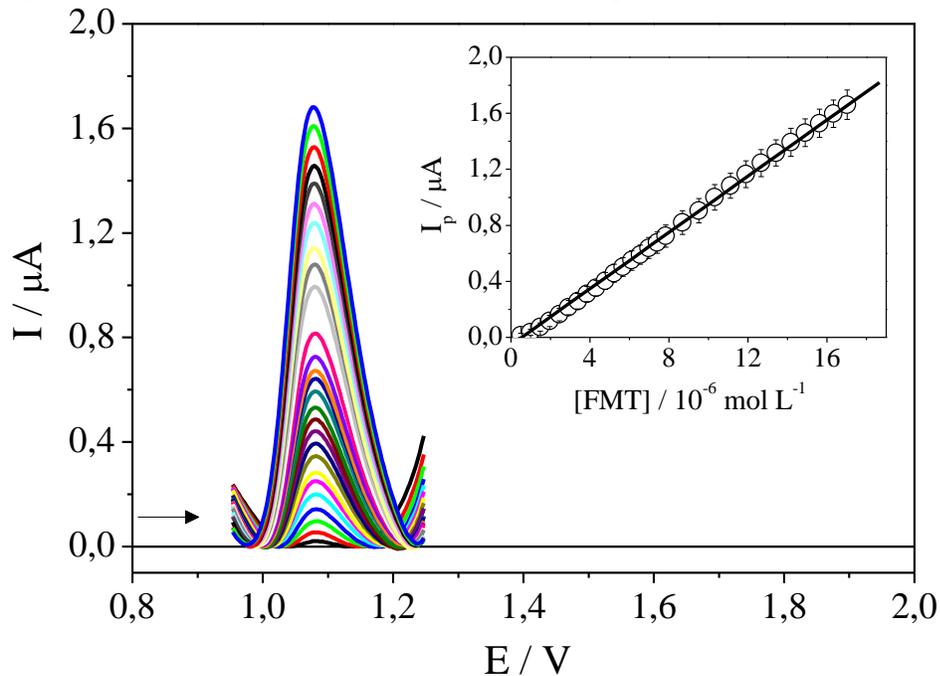
em que  $D$  é o coeficiente de difusão e os demais termos apresentam os significados já citados.

O modelo teórico ainda prevê que, para as reações irreversíveis,  $\kappa$  apresenta valores menores que 0,01 e a intensidade de corrente da componente resultante é menor que a intensidade de corrente da componente direta. (145) Assim, o resultado obtido para FMT sobre EDDDB está em conformidade com o estabelecido pela teoria da VOQ para processos irreversíveis. Neste caso, a componente direta foi empregada para propósitos analíticos.

#### 4.6.3 Curvas analíticas para formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro

As curvas analíticas para FMT sobre EDDDB foram construídas em meio de tampão BR pH 7,0 com  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  entre  $4,98 \times 10^{-7}$  e  $1,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de FMT acompanhados da curva analítica média com as respectivas barras de erro calculadas podem ser observados na Figura 42.

Figura 42 – Voltamogramas de onda quadrada para FMT no intervalo de  $4,98 \times 10^{-7}$  a  $1,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EDDDB em meio de tampão BR pH 7,0, com  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os voltamogramas de onda quadrada exibiram valor médio de  $E_p$  igual a  $1,08 \pm 2,21 \times 10^{-3}$  V com RSD de 0,20%, indicando que praticamente não houve alteração e que não houve efeitos de adsorção de reagentes e/ou produtos na superfície do eletrodo que, porventura, prejudicassem a reprodutibilidade das medidas.

A curva analítica foi descrita pela equação  $I_p = -7,79 \times 10^{-8} \pm 1,56 \times 10^{-7} + 0,103 \pm 0,020$  [FMT]. O teste de significância para o intercepto apresentou  $t_{\text{calculado}} = 2,26$ , permitindo concluir que não houve diferença significativa entre zero e o intercepto da equação da reta descrita. Os valores de LD e de LQ para FMT sobre EDDB foram  $0,094 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,314 \text{ mg kg}^{-1}$  e estão dentro da faixa de LMR recomendada pela ANVISA (0,02 e  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A Tabela 15 apresenta os parâmetros analíticos calculados para FMT sobre EDDB.

Tabela 15 – Parâmetros calculados para a determinação eletroanalítica de FMT sobre EDDB em meio de tampão BR pH 7,0

<b>Parâmetro</b>	<b>EDDB</b>
<b>RL / mol L<sup>-1</sup></b>	$4,98 \times 10^{-7}$ a $1,70 \times 10^{-5}$
<b>Equação da curva</b>	$I_p = -7,79 \times 10^{-8} + 0,103$ [FMT]
<b><math>t_{\text{calculado}}</math></b>	2,26
<b>IC<sub>a</sub></b>	$\pm 1,56 \times 10^{-7}$
<b>IC<sub>b</sub></b>	$\pm 0,020$
<b>R</b>	0,999
<b>S<sub>a</sub></b>	$6,28 \times 10^{-8}$ A
<b>S<sub>b</sub></b>	$8,11 \times 10^{-3}$ A mol <sup>-1</sup> L
<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$3,67 \times 10^{-7}$ (94,58 ppb)
<b>LQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$1,22 \times 10^{-6}$ (314,42 ppb)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando metodologias eletroanalíticas para a determinação direta do FMT, na literatura consta somente o estudo do FMT sobre eletrodo gotejante de mercúrio. (121) Neste trabalho não foram apresentados valores de LD e de LQ. Os valores de LD e de LD obtidos para FMT sobre EDDB foram bem próximos aos obtidos por Oliveira e colaboradores que

empregaram sistema bi-enzimático para a determinação de FMT ( $LD = 2,15 \times 10^{-7}$  e  $LQ = 7,17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) e outros pesticidas carbamatos. (123)

Os procedimentos cromatográficos (CLAE) apresentados na literatura para determinação de FMT apresentaram valores de LD iguais a 0,1 e  $3,33 \mu\text{g kg}^{-1}$ . (111-113) Estes valores foram inferiores aos obtidos para FMT sobre EDDB. No entanto, os procedimentos cromatográficos apresentam como desvantagens, o elevado custo e a impossibilidade de serem empregados em análises de campo. Neste contexto, uma das grandes vantagens dos procedimentos eletroanalíticos é a capacidade de poderem ser implementados fora dos laboratórios, ou seja, em análises em campo, em função da robustez oferecida pelo sistema de análise, apresentando-se como ferramenta alternativa para análise de contaminantes ambientais.

#### ***4.6.4 Determinação de formetanato sobre eletrodo de diamante dopado com boro em amostras de manga e uva***

A manga é uma das frutas mais exportadas pelo Estado do Ceará para o mercado europeu e é de fundamental importância manter a qualidade do fruto em termos de segurança alimentar. (26) A uva e seus derivados movimentam em muito o mercado interno. (238) Portanto, o desenvolvimento de procedimentos para a determinação de resíduos de pesticidas nessas frutas se torna relevante. (239,240)

A metodologia eletroanalítica proposta foi aliada ao método QuEChERS para análise de FMT em amostras de manga e de uva, como descrito no procedimento experimental. Os resultados dos experimentos de recuperação de FMT em amostras de manga e de uva estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Determinação eletroanalítica de FMT sobre EDDB em amostras de manga e de uva

$[\text{FMT}]_{\text{adicionada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,80 \times 10^{-7}$	$2,83 \times 10^{-6}$	$6,60 \times 10^{-6}$
<b>Manga</b>			
$[\text{FMT}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$2,85 \times 10^{-6}$	$6,63 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 1,10 \times 10^{-7}$	$\pm 3,80 \times 10^{-7}$	$\pm 5,43 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	117,32	100,59	100,44
<b>% DPR</b>	3,83	5,38	3,30
<b>Uva</b>			
$[\text{FMT}]_{\text{recuperada}} / \text{mol L}^{-1}$	$9,46 \times 10^{-7}$	$2,92 \times 10^{-6}$	$6,94 \times 10^{-6}$
<b>Intervalo de confiança</b>	$\pm 0,59 \times 10^{-7}$	$\pm 1,53 \times 10^{-7}$	$\pm 5,56 \times 10^{-7}$
<b>% Recuperação</b>	96,54	103,35	105,16
<b>% DPR</b>	2,52	2,11	3,49

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os experimentos iniciais evidenciaram que as amostras não estavam naturalmente contaminadas com FMT. A eficiência do procedimento do procedimento foi testada por meio dos ensaios de recuperação nas amostras fortificadas em três níveis de concentração. Os valores de recuperação calculados foram satisfatórios, indicando que o procedimento eletroanalítico aliado ao método de extração baseado no QuEChERS foram eficientes. Como ilustrado na Tabela 16, os percentuais de recuperação apresentaram valores de % DPR entre 2,52 e 5,38%, indicando que os componentes presentes naturalmente nas amostras naturais tiveram seus potenciais de interferência (açúcares, antioxidantes, carotenóides e compostos fenólicos) minimizados pelo método QuEChERS e pela utilização da metodologia eletroanalítica empregando EDDB.

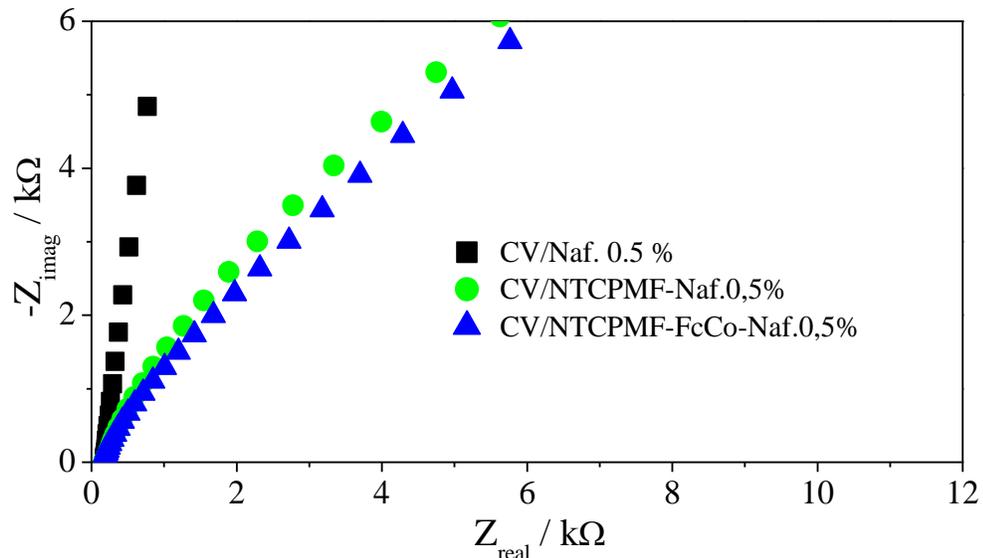
Trabalhos recentes também têm apresentado resultados satisfatórios para análise de pesticidas em matrizes de diferentes naturezas empregando EDDB. (40,207,241) De modo geral, os resultados apresentados vêm colaborar com as demais pesquisas realizadas em todo mundo, dedicadas a desenvolver metodologias eletroanalíticas para a análise de contaminantes ambientais que podem prejudicar a saúde humana e o meio ambiente.

## 4.7 Estudo eletroanalítico do formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto

### 4.7.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto

No intuito de obter informações sobre a cinética de transferência de carga para os eletrodos CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foram realizados ensaios de EIE para a mistura equimolar  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . As condições impostas ao sistema foram potencial formal de meia-onda ( $E_{1/2} = 0,2 \text{ V}$ ), frequência entre 60 kHz e 100 mHz e amplitude de 5 mV. Os diagramas de Nyquist para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  estão apresentados na Figura 43. Para CV/Naf.0,5%, observou-se o perfil característico de capacitor, resultando em elevado valor de resistência de transferência de carga. Este perfil de capacitor foi confirmado pelo valor da inclinação da região linear da representação de Bode ( $\log |Z|$  vs  $\log f$ ) igual a  $-0,9$ .

Figura 43 – Diagramas de Nyquist para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre CV/Naf.0,5%, CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com intervalo de frequência de 60 kHz a 100 mHz e amplitude de 5 mV



Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, esse valor está próximo do valor esperado para o elemento capacitor, que é de  $-1,0$ . (169) Isto se deve à natureza elétrica do Nafion<sup>®</sup>, pois este é um polímero carregado negativamente, de modo semelhante às espécies eletroativas ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ). Deste modo, a repulsão eletrostática atuou dificultando a reação de transferência de carga.

Para os demais sistemas, observou-se a relação linear entre  $Z_{\text{imag}}$  e  $Z_{\text{real}}$ , com ângulo de inclinação próximo a  $45^\circ$ , correspondente a comportamento difusional. Os valores de  $R_{\text{tc}}$  para os eletrodos CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foram  $12,17 \text{ k}\Omega$  e  $8,51 \text{ k}\Omega$ , respectivamente. Os valores de  $k_{\text{ap}}$  calculados foram  $6,99 \times 10^{-4}$  e  $1,00 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  CV/NTCPMF-Naf.0,5% e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, respectivamente. Os resultados comprovam que a modificação do CV com NTCPMF e FcCo promovem a transferência de elétrons, resultado da atividade catalítica proveniente do sinergismo entre NTCPMF-FcCo (existência da interação do tipo  $\pi$ - $\pi$ ), pois a FcM atua como mediador de transferência de carga. (44,130)

#### ***4.7.2 Comportamento eletroquímico do formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto***

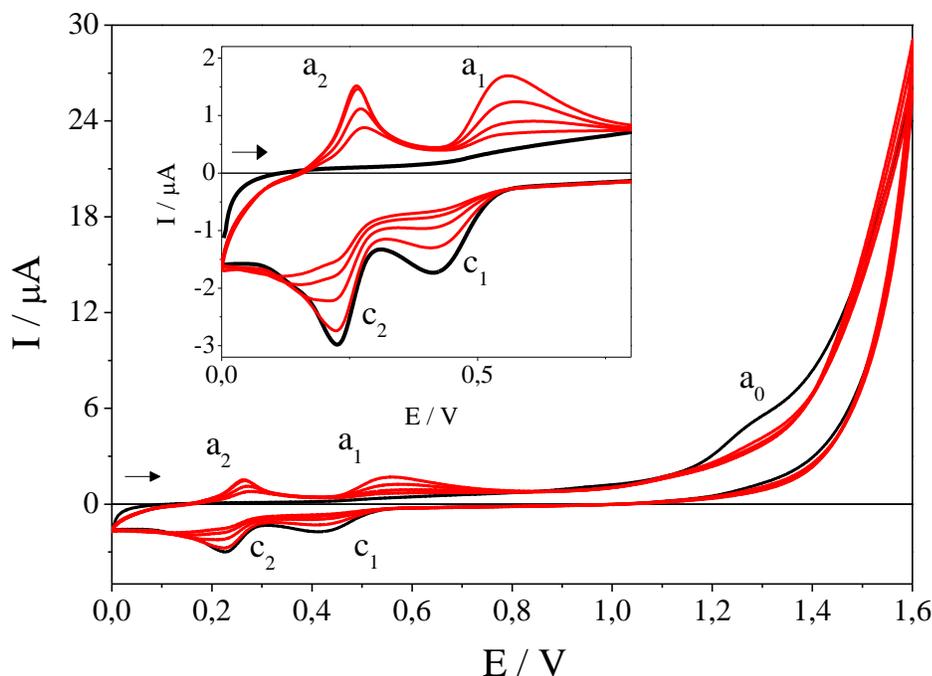
Estudos eletroquímicos iniciais para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR entre 2,2 e 9,0 consistiram em VC por cinco ciclos consecutivos a  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e VOQ com os parâmetros tradicionalmente empregados em estudos iniciais,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Por VC, observou-se a existência de processo de oxidação irreversível na varredura positiva de potencial do primeiro ciclo em todos os valores de pH estudados. No entanto, entre pH 2,2 e 7,0 foi possível verificar a presença de outros processos na varredura reversa no intervalo de 0,0 V a 0,7 V, em todos os ciclos, apontando que a reação de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% é regida pelo mecanismo ECE (eletroquímico-químico-eletroquímico).

É importante ressaltar que nesta situação, uma etapa de pré-concentração do produto formado no primeiro processo de oxidação do mecanismo ECE pode ser empregada para fins analíticos, pois as espécies geradas sofrem processos redox em potenciais mais próximos de 0,0 V, proporcionando maiores intensidades de  $I_p$  mais elevadas. (38) Como ilustração, os

voltamogramas cíclicos para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em tampão BR 5,0 a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos estão apresentados na Figura 44.

Figura 44 – Voltamogramas cíclicos para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  por cinco ciclos consecutivos



Fonte: Elaborada pelo autor.

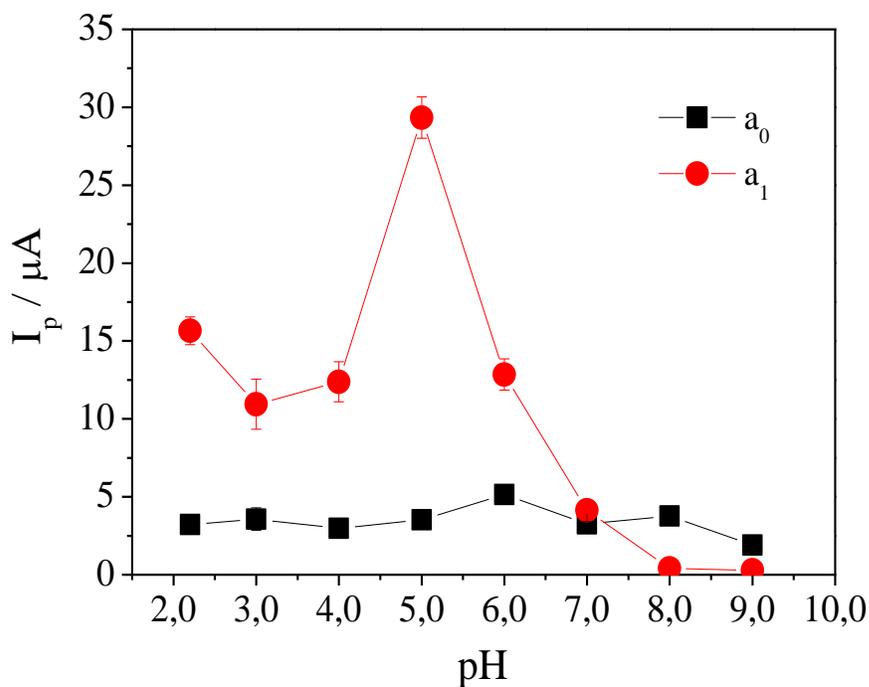
Processos de oxidação foram observados no segundo ciclo em torno de  $0,25 \text{ V}$  ( $a_2$ ) e  $0,5 \text{ V}$  ( $a_1$ ), acompanhados do desaparecimento do processo inicial  $a_0$ . Nos ciclos posteriores, verificou-se que os pares redox  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$  tiveram suas intensidades de corrente diminuídas. Este comportamento indica que os produtos das reações que ocorrem em valores de potenciais no intervalo de  $0,0 \text{ V}$  a  $0,7 \text{ V}$  ficam adsorvidos na superfície do eletrodo impedindo o processo  $a_0$  e, conseqüentemente, os processos  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$ . Portanto, os resultados sugerem que os processos  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$  são dependentes do processo de oxidação que origina  $a_0$ .

Para comprovar esta dependência foram realizados experimentos de VC no intervalo de  $0,0 \text{ V}$  a  $0,8 \text{ V}$  para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0. Os resultados obtidos foram interessantes, porque não apresentaram os processos redox  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$ , confirmando a hipótese de dependência citada anteriormente, ou

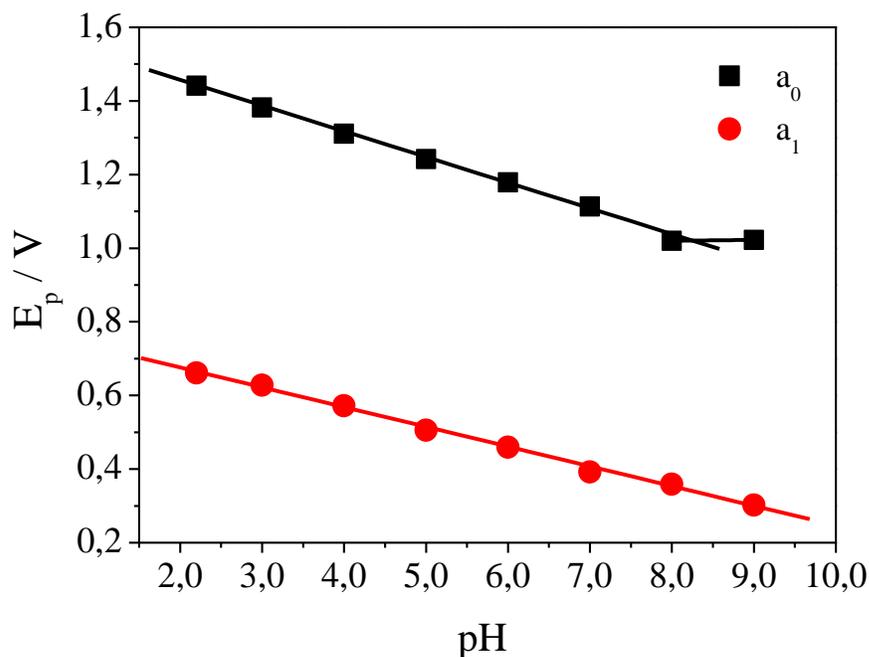
seja,  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$  surgem somente após a ocorrência do processo  $a_0$ . Os valores calculados para o módulo da diferença dos potenciais foram 126,9 mV e 33,7 mV para os pares  $a_1/c_1$  e  $a_2/c_2$ , respectivamente, indicando, de acordo com os critérios diagnósticos da VC, que o par  $a_1/c_1$  é quase-reversível, enquanto que o par  $a_2/c_2$  é um processo reversível com a participação de dois elétrons. (162) As relações entre  $I_p$ ,  $E_p$  e pH obtidas para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR empregando VOQ com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  podem ser vistas na Figura 45.

Figura 45 – Relações entre (A) corrente de pico e pH e (B) potencial de pico e pH obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em tampão BR com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro

(A)



(B)



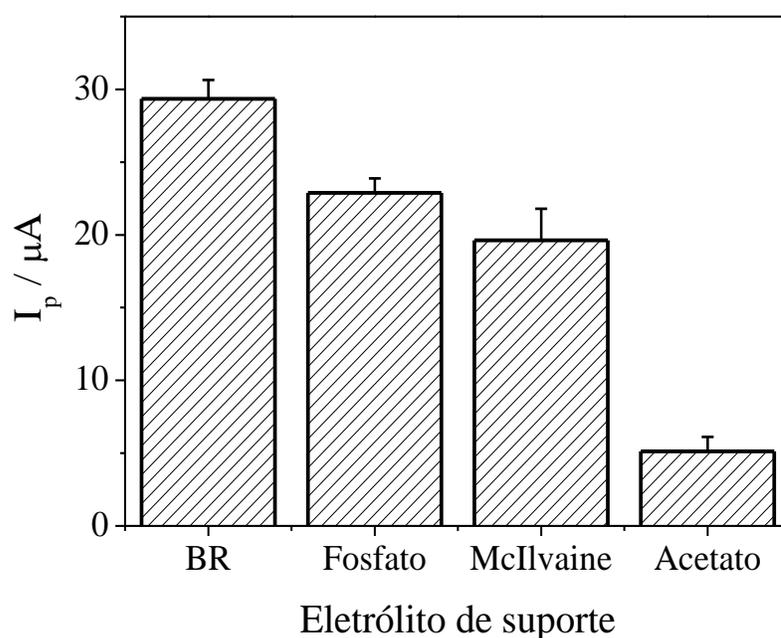
Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação dos resultados obtidos para o processo  $a_0$  mostrou que a relação entre  $I_p$  e pH (■) apresentada na Figura 45 (A) exibiu um máximo em pH 6,0. Entretanto, a relação entre  $E_p$  e pH para FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% se mostrou diferente do comportamento observado para FMT sobre EDDB, pois, como ilustrado na Figura 45 (B), a relação entre  $E_p$  e pH (■) para FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi linear entre pH 2,2 e 8,0 com valor da inclinação igual a 67,8 mV/pH, indicando a participação de igual número de prótons e elétrons na etapa determinante da reação. No entanto, para FMT sobre EDDB foi observado que o valor de  $E_p$  para o processo de oxidação foi influenciado pelo pH do meio, mas a relação entre  $E_p$  e pH não foi linear (*vide* Figura 40). As mudanças de comportamento das relações entre  $E_p$  e pH observadas para FMT sobre EDDB e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% das etapas determinantes da reação sugerem que houve influência do filme NTCPMF-FcCo na reação de transferência de carga.

Para os demais processos redox relativos à FMT, observou-se que as intensidades de  $I_p$  mais elevadas pertencem ao par  $a_1/c_1$  (●). Portanto, para o par redox  $a_1/c_1$  também pode ser verificada correlação linear entre  $E_p$  e pH com inclinação de 53,7 mV/pH. Esta informação é importante, pois indica que o produto da reação química formada após a ocorrência do processo

$a_0$  envolve etapa eletroquímica com igual número de prótons e elétrons. A relação entre  $I_p$  e pH apresentou máximo em pH 5,0 e acima deste valor foi observado um decréscimo da corrente, como visto na Figura 45 (A). A influência do eletrólito de suporte sobre os valores de  $I_p$  para o processo  $a_1/c_1$  foi avaliada em FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em diferentes eletrólitos de suporte com pH ajustado para 5,0, como apresentado na Figura 46.

Figura 46 – Influência do eletrólito de suporte em pH 5,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

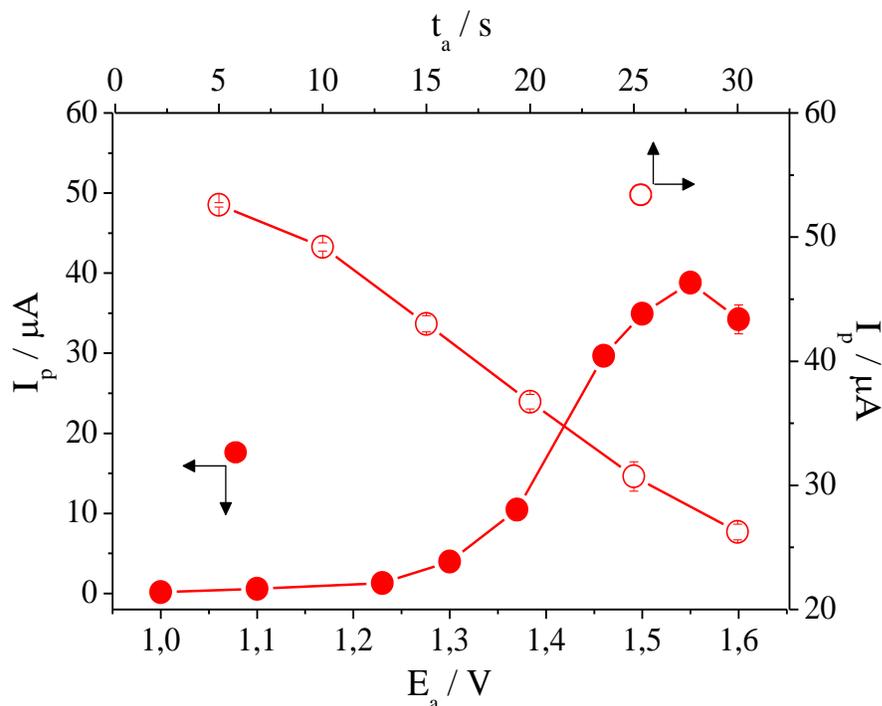
Os resultados indicaram que valores mais elevados de  $I_p$  foram obtidos em meio de tampão BR, na seguinte ordem: BR > fosfato > McIlvaine > acetato. A composição do eletrólito de suporte pode afetar a força iônica, coeficiente de atividade, número de transporte da espécie eletroativa, difusão, espessura da dupla camada elétrica, viscosidade, condutividade e cinética dos processos eletródicos. (242) Assim, o fato da  $I_p$  para FMT ter sido mais intensa em tampão BR pode estar possivelmente associado ao sinergismo entre estas propriedades. Em função dos resultados apresentados para o estudo da influência do pH e do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica do FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, tampão BR pH 5,0 foi selecionado como condição otimizada.

### 4.7.3 Influência do tempo e potencial de acumulação

Como visto, o comportamento eletroquímico do FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi marcado pela interdependência entre os processos existentes, ou seja, a partir da oxidação primária do FMT ( $a_0$ ) surgiram processos eletroquímicos em potenciais próximos de 0,0 V. Neste contexto, avaliou-se o efeito do potencial ( $E_a$ ) e do tempo de acumulação ( $t_a$ ) sobre a resposta eletroquímica do FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Isso se deu pela aplicação de  $E_a$  entre 1,0 e 1,6 V, potenciais escolhidos em diferentes regiões do voltamograma, e  $t_a = 15 \text{ s}$ . Após a otimização do  $E_a$ , realizou-se o estudo do  $t_a$  no intervalo de 5 a 30 s.

A Figura 47 mostra as relações entre  $I_p$  e as variáveis  $E_a$  e  $t_a$  obtidas para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 empregando VOQ com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 47 – Relação entre (○) corrente de pico e potencial de acumulação com  $t_a = 15 \text{ s}$  e (■) corrente de pico e tempo de acumulação com  $E_a = 1,55 \text{ V}$  obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 5,0 sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados indicaram que o aumento do  $E_a$  promoveu o acréscimo da  $I_p$ . Isso porque quanto maior o valor de  $E_a$ , maior é a energia fornecida ao sistema e, conseqüentemente, o avanço da reação de oxidação primária do FMT é favorecido, provendo maior concentração de reagentes na interface eletrodo/solução para a reação eletroquímica envolvendo o par  $a_1/c_1$ . A Figura 48 ainda permite concluir que acima de 1,55 V há diminuição da  $I_p$ , possivelmente associada à interferência de reações paralelas, como a de desprendimento de  $O_2$ . Deste modo, o valor de  $E_a = 1,55$  V foi escolhido como otimizado.

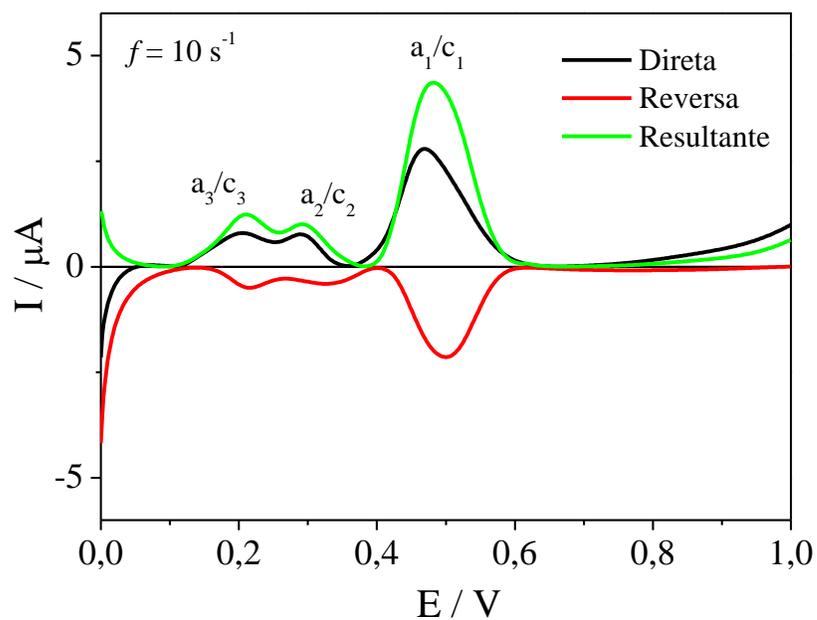
Na seqüência, verificou-se que o aumento do  $t_a$  promoveu a diminuição da  $I_p$ , que pode ser explicado em função do mecanismo complexo ECE para a oxidação do FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%. Além do exposto, encontra-se na literatura que o produto de oxidação primária de pesticidas carbamatos envolve a formação de cátion radical não estável que rapidamente sofre reações químicas originando produtos que podem ser eletrooxidados. (237) Assim, o produto da primeira etapa eletroquímica pode reagir quimicamente tomando diferentes caminhos de reação e diferentes rotas de reações químicas são favorecidas com o aumento do tempo de acumulação. Então, selecionou-se  $t_a = 5$  s.

#### ***4.7.4 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada***

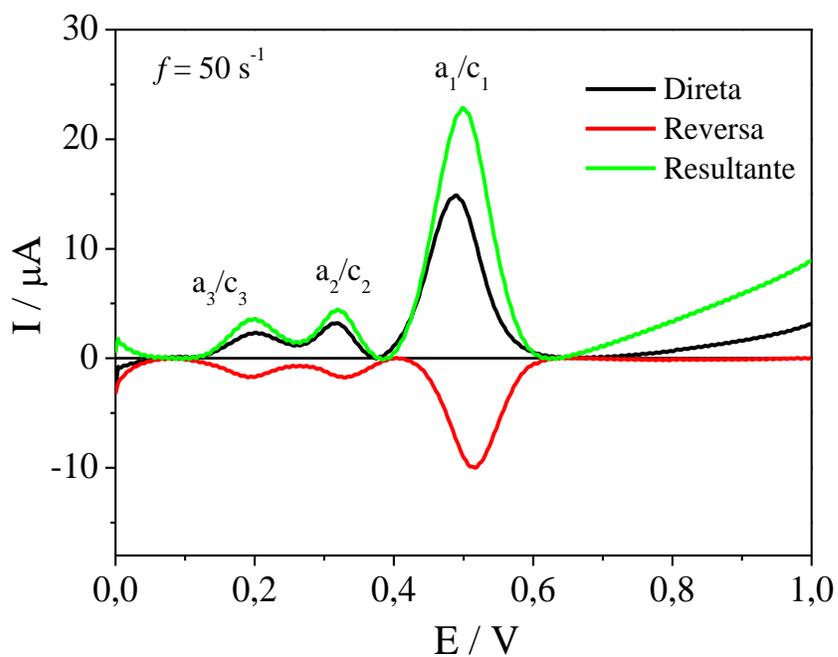
Na seqüência, analisou-se os parâmetros da VOQ para FMT  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55$  V e  $t_a = 5$  s pela variação de  $f$  entre 10 e 300 s<sup>-1</sup> com  $a = 50$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV. Em todo o intervalo de  $f$  estudado, observou-se a presença de três processos eletroquímicos, sendo o processo referente ao par redox  $a_1/c_1$  o de maior intensidade de corrente. A Figura 48 apresenta os voltamogramas de VOQ para FMT  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 10$  s<sup>-1</sup>,  $f = 50$  s<sup>-1</sup> e  $f = 100$  s<sup>-1</sup> todos com  $a = 50$  mV,  $\Delta E_s = 2$  mV,  $E_a = 1,55$  V e  $t_a = 5$  s. Os três processos observados apresentaram as contribuições das componentes direta e reversa, resultando no aumento da corrente para a componente resultante.

Figura 48 – Componentes de corrente dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55 \text{ V}$ ,  $t_a = 5 \text{ s}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  e (A)  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ , (B)  $f = 50 \text{ s}^{-1}$  e (C)  $f = 100 \text{ s}^{-1}$

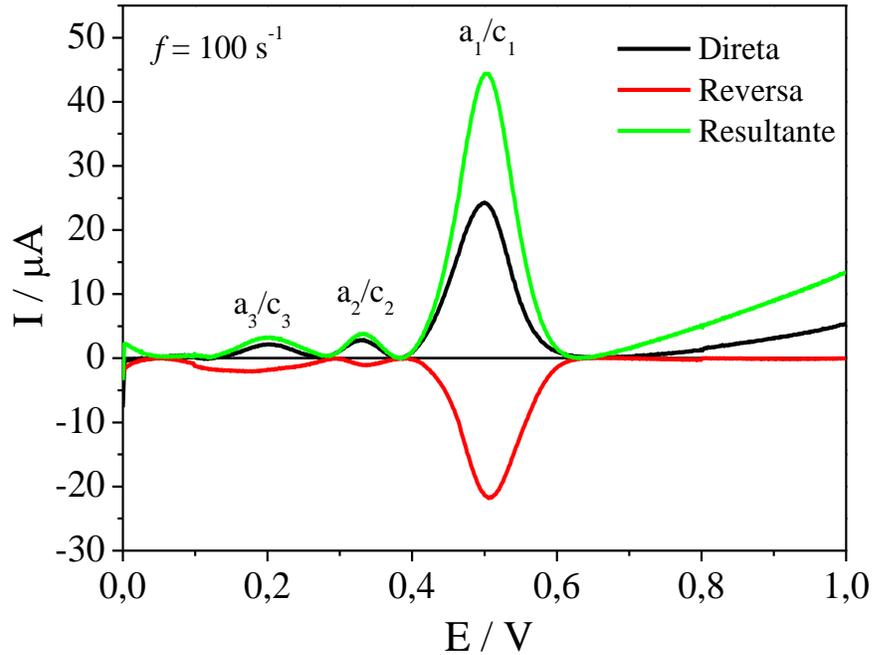
(A)



(B)



(C)



Fonte: Elaborada pelo autor.

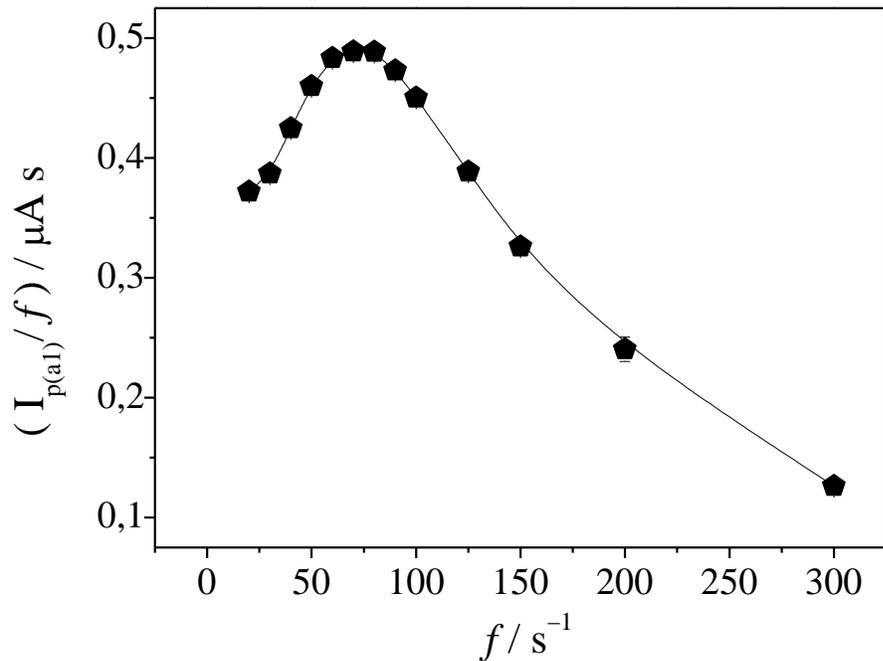
Os processos  $a_1/c_1$  e  $a_3/c_3$  não apresentaram nenhuma dependência entre  $E_p$  e  $\log f$ , indicando, segundo os critérios diagnósticos da VOQ, que são quase-reversíveis. (143) Além do mais, os valores de  $\Delta E_{p/2}$  se revelaram dependentes de  $f$  e de  $a$ . Para sistemas reversíveis não há dependência entre  $\Delta E_{p/2}$  e os parâmetros  $f$  e  $a$ . Deste modo, confirma-se que os processos  $a_1/c_1$  e  $a_3/c_3$  são quase-reversíveis. No entanto, o processo  $a_2/c_2$  apresentou relação linear entre  $E_p$  e  $\log f$  e os valores de  $\Delta E_{p/2}$  se mostraram independentes de  $f$  e  $a$ . Confrontando estes resultados com a teoria da VOQ, tem-se que o processo é reversível com adsorção de reagente. (143) Para processos com essas características, a seguinte equação é válida:

$$\Delta E_{p/2} = \frac{101 \text{ mV}}{n} \quad (16)$$

em que os termos mantêm seus significados usuais. Aplicando o valor  $\Delta E_{p/2} = 48,4 \text{ mV}$  (obtido a partir do experimento de VOQ com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ) na equação 16, conclui-se que o processo envolve a participação de dois elétrons, ratificando os resultados obtidos por VC. Os processos  $a_1/c_1$  e  $a_3/c_3$  ainda apresentaram máximo quase-reversível confirmando as atribuições estabelecidas anteriormente para estes dois processos. A Figura 49

apresenta a relação entre  $I_p/f$  e  $f$  para o processo  $a_1/c_1$  para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55 \text{ V}$ ,  $t_a = 5 \text{ s}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 49 – Relação entre razão corrente de pico/frequência e frequência obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para FMT  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55 \text{ V}$ ,  $t_a = 5 \text{ s}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  considerando o processo  $a_1/c_1$ . Valores de frequência no intervalo de 20 a  $300 \text{ s}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

O processo  $a_3/c_3$  apresentou um máximo quase-reversível em  $f_{\text{máx}} = 20 \text{ s}^{-1}$ ; aplicando este valor na equação  $k_s = \kappa_{\text{máx}} \cdot f_{\text{máx}}$  e tomando o  $\kappa_{\text{máx}} = 1,18 \pm 0,05$ , tem-se  $k_s = 23,6 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$ , que é consistente com uma reação de transferência de carga lenta, se comparado com valores mais altos de  $k_s$  (e.g.  $350 \text{ s}^{-1}$  e  $1400 \text{ s}^{-1}$ ) para sistemas quase-reversíveis apresentados na literatura. (243,244)

O máximo quase-reversível para o processo  $a_1/c_1$  surgiu com  $f_{\text{máx}} = 70 \text{ s}^{-1}$  e o valor calculado para a constante foi  $k_s = 82,6 \pm 3,5 \text{ s}^{-1}$ . Estes resultados indicam que a cinética de reação de transferência de carga foi mais rápida para o processo  $a_1/c_1$ , implicando em maiores valores de  $I_p$  mais elevados. Assim, para fins analíticos, a otimização dos parâmetros da VOQ foi realizada considerando o processo  $a_1/c_1$ , em função da sua maior sensibilidade. A relação

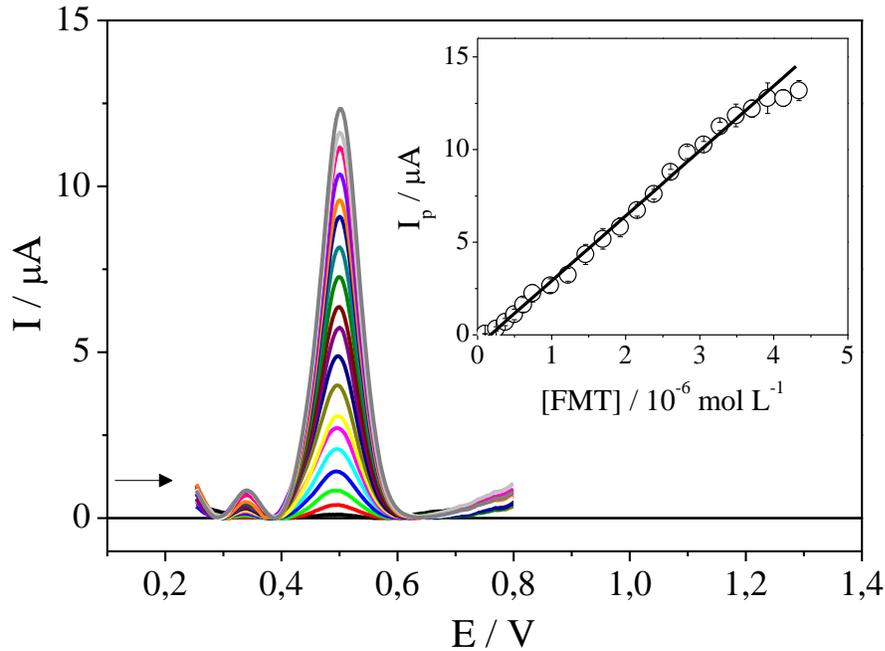
entre  $I_p$  e  $f$  apresentou linearidade até  $100 \text{ s}^{-1}$  e o aumento de  $f$  não proporcionou alteração significativa nos valores de  $I_p$ . Portanto, o valor de  $100 \text{ s}^{-1}$  foi selecionado para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico de determinação de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%.

O estudo da  $a$  foi realizado entre 5 e 70 mV. Os resultados indicaram que o aumento da amplitude proporcionou o deslocamento dos potenciais de pico das componentes direta ( $E_{p,d}$ ) e reversa ( $E_{p,r}$ ) do processo  $a_1/c_1$ . A condição experimental, com  $a = 5 \text{ mV}$  resultou na diferença entre os potenciais de pico das componentes direta e reversa,  $E_{p,d} - E_{p,r} = 29,7 \text{ mV}$ . Já para  $a = 70 \text{ mV}$ , o valor calculado foi  $E_{p,d} - E_{p,r} = -19,8 \text{ mV}$ . Este comportamento é mais um indício característico de processos quase-reversíveis. (143,245) A relação entre  $I_p$  e  $a$  apresentou linearidade até o valor de 30 mV. Deste modo, o valor de 30 mV foi selecionado para aplicação analítica. Valores de  $\Delta E_s$  foram analisados entre 1 e 8 mV. Como previsto pelo modelo teórico da VOQ para processos quase-reversíveis, não se observou alteração nos valores de  $E_{p,d} - E_{p,r}$  com o aumento de  $\Delta E_s$ , pelo fato do coeficiente de transferência de carga  $\alpha$  ser independente deste parâmetro. Para compor o conjunto de parâmetros otimizados,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  foi selecionado, sendo a otimização realizada baseando-se no critério de linearidade entre  $I_p$  e  $\Delta E_s$ , que apresentou linearidade até 3 mV.

#### ***4.7.5 Curvas analíticas para formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto***

A estratégia baseada na etapa prévia de pré-concentração do produto da oxidação primária do FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi empregada para a construção das curvas analíticas entre  $9,80 \times 10^{-8}$  e  $3,92 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 50 apresenta os voltamogramas de VOQ sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55 \text{ V}$ ,  $t_a = 30 \text{ s}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ , acompanhados da curva analítica média com as respectivas barras de erro calculadas.

Figura 50 – Voltamogramas de onda quadrada para FMT no intervalo de  $9,80 \times 10^{-8}$  a  $3,92 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $E_a = 1,55 \text{ V}$ ,  $t_a = 5 \text{ s}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . Na inserção, tem-se a curva analítica média com as respectivas barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os voltamogramas de VOQ apresentaram-se bem definidos e sem variação dos valores de  $E_p$ , indicando que não houve efeitos de adsorção com a variação da concentração de FMT. Com o dispositivo CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% foi possível analisar concentrações do pesticida em níveis de concentrações mais baixos que aqueles no estudo do FMT sobre EDDB. Além disso, a sensibilidade que é dada pela inclinação da curva analítica foi em torno de 34 vezes maior para o procedimento empregando eletrodo modificado ( $3,51 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ ) quando comparado com a sensibilidade calculada utilizando EDDB ( $0,103 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ ). Estes resultados comprovam que o efeito electrocatalítico advindo do sinergismo entre NTCPMF-FcCo representa poderosa estratégia para o desenvolvimento de metodologias electroanalíticas para análise de pesticidas. As figuras de mérito calculadas a partir das curvas analíticas para FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e EDDB podem ser vistas na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e sobre EDDB em meio de tampão BR pH 5,0

<b>Parâmetro</b>	<b>CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%</b>	<b>EDDB</b>
<b>RL / mol L<sup>-1</sup></b>	9,80 x 10 <sup>-8</sup> a 3,92 x 10 <sup>-6</sup>	4,98 x 10 <sup>-7</sup> a 1,70 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Equação da curva</b>	$I_p = -6,02 \times 10^{-7} + 3,51 [\text{FMT}]$	$I_p = -7,79 \times 10^{-8} + 0,103[\text{FMT}]$
<b>t<sub>calculado</sub></b>	1,73	2,26
<b>IC<sub>a</sub></b>	± 9,61 x 10 <sup>-8</sup>	± 1,56 x 10 <sup>-7</sup>
<b>IC<sub>b</sub></b>	± 0,495	± 0,020
<b>R</b>	0,9982	0,9990
<b>S<sub>a</sub></b>	1,07 x 10 <sup>-8</sup> A	6,28 x 10 <sup>-8</sup> A
<b>S<sub>b</sub></b>	5,51 x 10 <sup>-2</sup> A mol <sup>-1</sup> L	8,11 x 10 <sup>-3</sup> A mol <sup>-1</sup> L
<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	9,67 x 10 <sup>-8</sup> (24,92 ppb)	3,67 x 10 <sup>-7</sup> (94,58 ppb)
<b>LQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>	3,22 x 10 <sup>-7</sup> (82,98 ppb)	1,22 x 10 <sup>-6</sup> (314,42 ppb)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de LD (0,025 mg kg<sup>-1</sup>) e de LQ (0,082 mg kg<sup>-1</sup>) ficaram abaixo dos valores encontrados para FMT sobre EDDB, tendo mesma ordem de grandeza dos valores de LMR recomendados pela ANVISA para FMT em amostras de produtos agrícolas, mostrando que o procedimento eletroanalítico aliado ao eletrodo modificado com NTCPMF e FcCo pode ser empregado em análises de pesticida em amostras de alimentos.

Em comparação com os estudos apresentados na literatura, os valores de LD e de LQ vistos na Tabela 17 foram bem próximos aos calculados por meio do fenômeno da inibição de FMT sobre biossensor à base de pasta de carbono-grafeno/azul da prússia/Lac (LD = 0,013 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,045 mg kg<sup>-1</sup>). (122) No entanto, esses valores foram menores que os calculados para biossensor bi-enzimático empregando pasta de carbono-grafeno/quitosana/NpAu/Lac-Tir (LD = 0,048 mg kg<sup>-1</sup> e LQ = 0,158 mg kg<sup>-1</sup>). (123) Assim, a potencialidade do eletrodo modificado com NTCPMF-FcCo para análise de FMT é comparável com a dos biossensores enzimáticos.

#### 4.7.6 Determinação de formetanato sobre eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto em amostras de manga e uva

A eficiência do dispositivo CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% teve sua eficiência verificada na análise de resíduos de FMT em amostras de manga e de uva. As amostras foram tratadas com o método de QuEChERS de modo semelhante ao estudo sobre EDDB. Os parâmetros calculados a partir dos ensaios de recuperação estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Determinação eletroanalítica de FMT sobre CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% em amostras de manga e de uva

<b>[FMT]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	4,95 x 10 <sup>-7</sup>	9,80 x 10 <sup>-7</sup>	2,83 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Manga</b>			
<b>[FMT]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	5,09 x 10 <sup>-7</sup>	9,61 x 10 <sup>-7</sup>	2,99 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,80 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,69 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,13 x 10 <sup>-6</sup>
<b>% Recuperação</b>	102,81	98,05	105,69
<b>% DPR</b>	6,38	2,91	1,79
<b>Uva</b>			
<b>[FMT]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	4,66 x 10 <sup>-7</sup>	9,86 x 10 <sup>-7</sup>	2,81 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,53 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,36 x 10 <sup>-7</sup>	± 0,63 x 10 <sup>-7</sup>
<b>% Recuperação</b>	94,24	100,62	99,18
<b>% DPR</b>	4,54	1,48	0,90

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os brancos das amostras não apresentaram processos eletroquímicos referentes ao FMT, indicando que amostras estavam livres de resíduos. Assim, com os ensaios de recuperação das amostras fortificadas ficou evidente a eficiência do procedimento proposto pelo cálculo de percentuais de recuperação entre 94,24 e 105,69% e por valores de DPR inferiores aos recomendados. (184) Esses valores foram semelhantes àqueles obtidos para FMT em amostras de manga e de uva (96,54 a 117,32 %), utilizando EDDB. Os valores também foram semelhantes aos calculados por Oliveira e colaboradores para resíduos de FMT em amostras de limão, laranja e tangerina (94,8 a 96,6%) e amostras de tomate e batata (91,0 a 97,1 %), também empregando o método QuEChERS.

O procedimento eletroanalítico baseado no CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% apresentou precisão, exatidão e sensibilidade, podendo ser adotado para análise de resíduos de pesticidas FMT em diferentes amostras visando garantir a segurança alimentar e até ser estendido para análises em amostras de interesse ambiental e biológico.

#### **4.8 Biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase para a determinação do pesticida formetanato**

O pesticida FMT possui a capacidade de comprometer a atividade das enzimas acetilcolinesterase, Lac e Tir. (108,123) Neste contexto, essa parte do trabalho foi voltada para a construção e aplicação do biossensor eletroquímico, baseado na enzima Lac e NpAu, para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico de determinação do pesticida FMT em amostras de manga e uva.

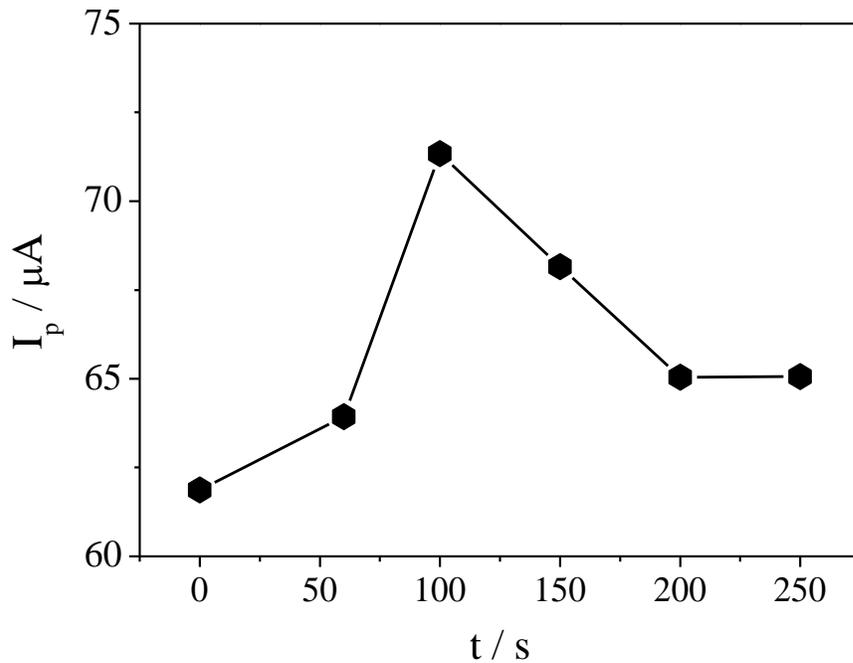
##### ***4.8.1 Obtenção das nanopartículas de ouro***

O desempenho dos biossensores depende muito do ambiente no qual a biomolécula está sendo imobilizada. NpAu aumentam a área superficial, o que beneficia a imobilização da enzima. Além do mais, as propriedades oferecidas pelas NpAu, tais como condutividade, estabilidade superficial para imobilização da enzima, capacidade eletrocatalítica, biocompatibilidade e facilidade de transferência de carga garantem a funcionalidade do biossensor desenvolvido. (54)

Deste modo, a primeira etapa avaliada para a construção do biossensor eletroquímico foi a otimização da obtenção das NpAu. O método adotado para obtenção das nanopartículas foi eletrodeposição com base no procedimento proposto por Park e colaboradores. (246) O estudo consistiu na aplicação de  $-0,2$  V entre 60 e 250 s, com a otimização desse parâmetro sendo realizada pela análise da intensidade da corrente obtida no processo redox do indicador eletroativo, que consistiu na mistura equimolar dos sais  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$  na presença de KCl  $0,1$  mol  $L^{-1}$ . A Figura 51 apresenta a relação entre  $I_p$  e tempo de eletrodeposição das NpAu sobre Au obtidas a partir dos voltamogramas de VOQ para

$K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 51 – Relação entre corrente de pico e tempo de eletrodeposição das NpAu sobre Au com aplicação de  $-0,2 \text{ V}$  obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos indicaram que a  $I_p$  aumentou em função do tempo de eletrodeposição até 100 s. No entanto, um decréscimo da  $I_p$  para tempos superiores a 100 s foi observado, e a partir de 200 s a corrente praticamente não apresentou variação. Alguns autores relatam que esse comportamento pode estar associado à agregação das NpAu, resultando em redução da área superficial e aumento da resistência e da capacitância da dupla camada elétrica. (247,248) Sanz e colaboradores apresentaram que, por eletrodeposição, foram obtidas partículas com tamanho em torno de 80 nm. (247) Portanto, para a continuação dos estudos, 100 s foi selecionado como valor otimizado para a preparação das NpAu.

#### 4.8.2 Parâmetros que influenciam a resposta do biossensor eletroquímico baseado na lacase

A imobilização de enzimas sobre a superfície de um eletrodo tem contemplado aplicações, tais como construção de biocélulas a combustível, degradação de corantes e biossensores. (173) Os biossensores eletroquímicos vêm se destacando como alternativa promissora no desenvolvimento de metodologias analíticas para monitoramento de pesticidas no meio ambiente e em amostras de alimentos, em função da inibição da atividade enzimática. Neste contexto, a Lac tem a sua atividade, frente a compostos fenólicos, minimizada pela presença dos carbamatos, tornando possível o desenvolvimento de biossensores.

Por revisões na literatura não se encontrou trabalhos empregado 4-AF.HCl como substrato fenólico no desenvolvimento de biossensores com Lac para determinação de pesticidas. Assim, optou-se por iniciar os estudos de otimização dos parâmetros sobre biossensor utilizando 4-AF.HCl em meio de tampão BR pH 5,0, pois, estudos apresentados na literatura mostra que o tampão BR não prejudica a atividade da enzima Lac. (47,122) A enzima Lac apresenta atividade máxima na faixa de pH 4,0 a 5,0. (249) Entretanto, em pH 5,0 tem sido a condição otimizada de outros biossensores baseado na enzima Lac. (250,251). Portanto, juntamente com 4-AF.HCl, optou-se iniciar os estudos empregando tampão BR pH 5,0.

Para a construção do biossensor foi utilizado o método de imobilização conhecido como ligação covalente cruzada (*cross-linking*). A espécie empregada nesse método foi Glu, que tem a capacidade de fazer ligações cruzadas com proteínas tornando eficiente a imobilização da biomolécula, evitando a sua lixiviação ao entrar em contato com a solução (133), conforme comentários anteriores.

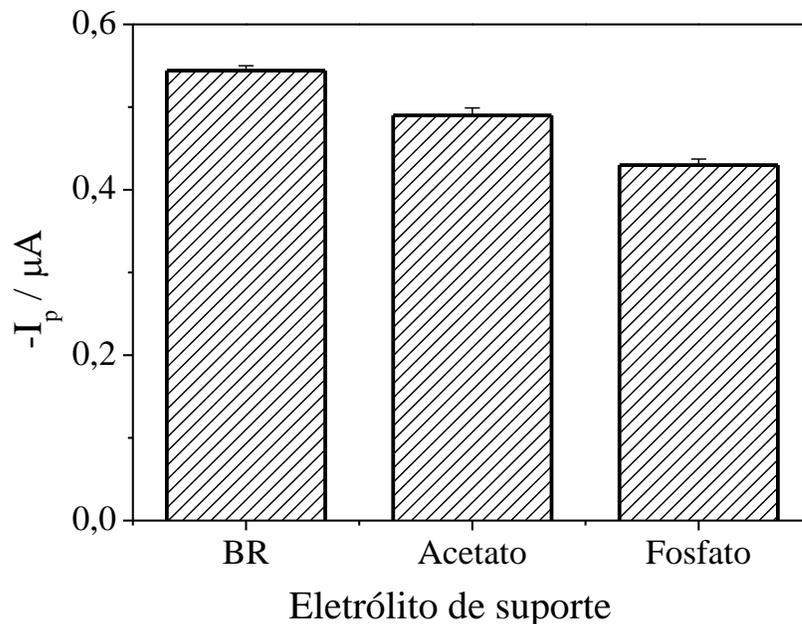
Inicialmente, avaliou-se o efeito da concentração de 4-AF.HCl sobre a resposta eletroquímica empregando o biossensor Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 entre  $5,12 \times 10^{-6}$  e  $1,57 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0 empregando VOQ com  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ , para manter a mesma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  dos estudos de VC (*vide* seção 4.2.1). Detectou-se duas regiões de linearidade: a primeira entre  $5,12 \times 10^{-6}$  e  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , com  $R = 0,9991$  e sensibilidade de  $5,38 \times 10^{-3} \pm 4,15 \times 10^{-4} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ , e a segunda região de linearidade entre  $6,74 \times 10^{-5}$  e  $1,57 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  com  $R = 0,9987$  e sensibilidade de  $4,15 \times 10^{-3} \pm 9,50 \times 10^{-5} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ . A mudança de inclinação pode estar associada com a saturação dos sítios da enzima Lac ou com um impedimento estérico

devido à maior quantidade de substrato oxidado sobre a superfície do biossensor. Acima da concentração  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de 4-AF.HCl foi observado diminuição da sensibilidade do biossensor baseado na enzima Lac. Assim, esta concentração foi considerada como otimizada para dar continuidade aos estudos.

Na sequência, realizou-se otimização dos parâmetros da VOQ, com  $f$  entre 10 e  $100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a$  entre 5 e 50 mV e  $\Delta E_s$  entre 1 e 4 mV. Os resultados obtidos permitiram estabelecer os valores otimizados como:  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Em seguida, avaliou-se o efeito do eletrólito de suporte pela comparação da resposta voltamétrica para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% utilizando os tampões BR, acetato e fosfato, todos a pH 5,0. A Figura 52 apresenta a relação entre  $I_p$  e tampão para 4-AF.HCl sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2%.

Figura 52 – Influência do eletrólito de suporte em pH 5,0 sobre a corrente de pico dos voltamogramas de onda quadrada para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

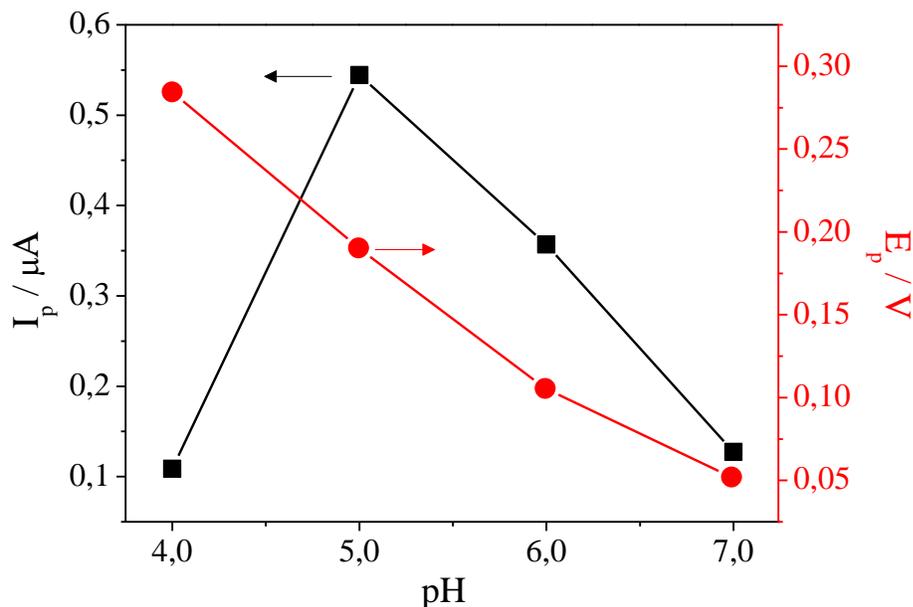


Fonte: Elaborada pelo autor.

Como observado na Figura 52 a maior intensidade de  $I_p$  foi obtida em meio de tampão BR. Assim, o tampão BR foi considerado como otimizado.

O efeito do pH na resposta voltamétrica do 4-AF.HCl sobre o biossensor eletroquímico baseado na enzima Lac foi avaliado entre 4,0 e 7,0. Esta região contempla a faixa ótima de pH para a enzima Lac. (249) A Figura 53 apresenta as relações entre  $I_p$ ,  $E_p$  e pH obtidos para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR em diferentes valores de pH com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Figura 53 – Relação entre corrente de pico, potencial de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com as respectivas barras de erro



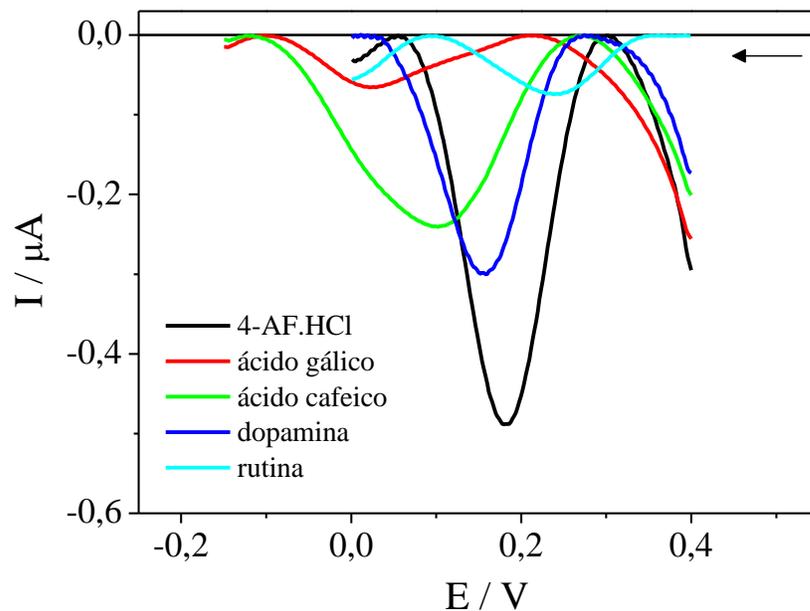
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao avaliar a intensidade da  $I_p$  em função do pH, foi possível observar valor máximo em pH 5,0, como pode ser visto na Figura 53. Estudos anteriores, apresentados na literatura, relataram também que maiores valores de  $I_p$  em pH 5,0 ao utilizar biossensores eletroquímicos baseado na Lac. (47,250-252) O fato dos resultados terem indicado que o pH otimizado para a resposta do 4-AF.HCl sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% está no intervalo adequado para a Lac confirma que o processo de imobilização não afetou a atividade enzimática. Este resultado é interessante, pois revela a elevada estabilidade da enzima mesmo fora do meio biológico, tornando sua aplicação viável para fins analíticos.

Pelos resultados mostrados com o estudo da influência do pH do meio sobre a resposta eletroquímica do 4-AF.HCl sobre o biossensor, observou-se que os valores de  $E_p$  foram deslocados para valores menos positivos com o aumento do pH, indicando que a etapa de protonação do 4-AF.HCl faz parte do mecanismo da reação. Pela relação entre  $E_p$  e pH, o valor de inclinação resultou em 76,6 mV/pH, valor próximo a 59 mV/pH, previsto para a participação de igual número de prótons e de elétrons. (137)

A enzima Lac tem a capacidade de oxidar diferentes compostos fenólicos, pois promove a abstração de elétrons dos substratos fenólicos após a interação do grupo fenol do substrato com íons Cu (T1) presente na proteína; concomitantemente a esse processo, ocorre a redução de oxigênio molecular a água. (174) Por este motivo, o efeito do tipo de substrato sobre a resposta do biossensor construído foi investigado. Os compostos estudados foram 4-AF.HCl, ácido gálico, ácido cafeico, rutina e dopamina. (253 - 258) A resposta foi avaliada por VC a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e VOQ com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , com a concentração de cada composto fenólico fixada em  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR a pH 5,0. Os voltamogramas de VOQ obtidos para os diferentes substratos sobre o biossensor Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 pode ser observado na Figura 54.

Figura 54 – Voltamogramas de onda quadrada para diferentes substratos fenólicos  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 com  $f = 40 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

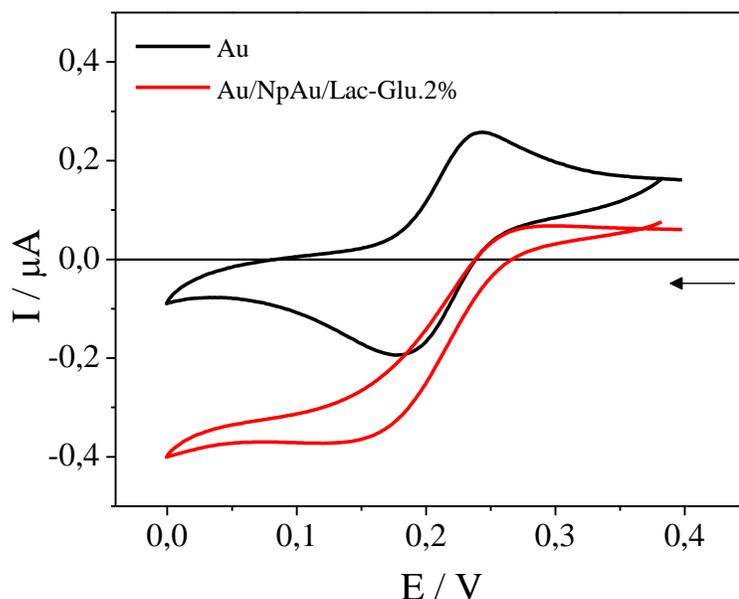


Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelos resultados foi possível observar que a ordem de sensibilidade em relação aos valores de  $I_p$  foi 4-AF.HCl > dopamina > ácido cafeico > rutina > ácido gálico, como pode ser visto na Figura 54. Esses resultados são consistentes com os da literatura, pois Lac oxida preferencialmente monofenóis para-substituídos (4-AF.HCl) em comparação com difenóis para-substituídos (ácido cafeico, dopamina e rutina) e polifenol (ácido gálico). (253,255,259)

Também se avaliou o efeito da imobilização da enzima Lac sobre a superfície do Au/NpAu na resposta eletroquímica do 4-AF.HCl. Os experimentos foram realizados empregando VC entre 0,4 e 0,0 V a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , com 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0. Na Figura 55 podem ser vistos os voltamogramas cíclicos obtidos para 4-AF.HCl sobre Au e Au/NpAu/Lac-Glu.2%.

Figura 55 – Voltamogramas cíclicos obtidos para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au e sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  por um ciclo



Fonte: Elaborada pelo autor.

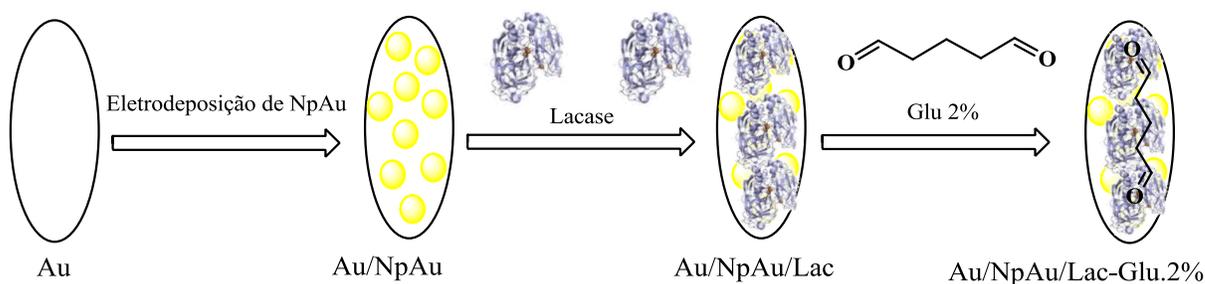
O comportamento eletroquímico do 4-AF.HCl sobre Au liso indicou a presença de processos de oxidação e de redução em torno de 0,20 V e 0,25 V, respectivamente. A diferença entre os potenciais de pico ( $\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa}$ ) para o processo redox apresentou um valor de 66,4 mV. De acordo com estudos apresentados na literatura, o comportamento eletroquímico, 4-

AF.HCl exibe um processo quase-reversível com a participação de dois elétrons e dois prótons, com o produto da oxidação sendo 4-iminoquinona. (260,261)

Na presença de Lac, o comportamento eletroquímico do 4-AF.HCl foi modificado. O voltamograma cíclico apresentou um processo de redução intenso com o perfil característico da presença de catálise enzimática, devido à presença de patamar de corrente. (262) Na continuação da varredura, o processo de oxidação teve sua intensidade de corrente diminuída, demonstrando que 4-AF.HCl é oxidado pela Lac formando 4-iminoquinona. Essa espécie é, então, reduzida na superfície do eletrodo, retornando a 4-AF.HCl. Todavia, o ciclo da reação enzimática é contínuo, fazendo com que ocorra novamente a reação de oxidação enzimática do 4-AF.HCl. Conseqüentemente, não faltará espécie oxidada na interface eletrodo/solução para ser reduzida, proporcionando a formação do patamar de corrente.

A Figura 56 apresenta o esquema de construção do biossensor eletroquímico baseado em Lac e em NpAu, empregando o método de ligação covalente cruzada com Glu.

Figura 56 – Representação esquemática de preparação do biossensor baseado na enzima Lac



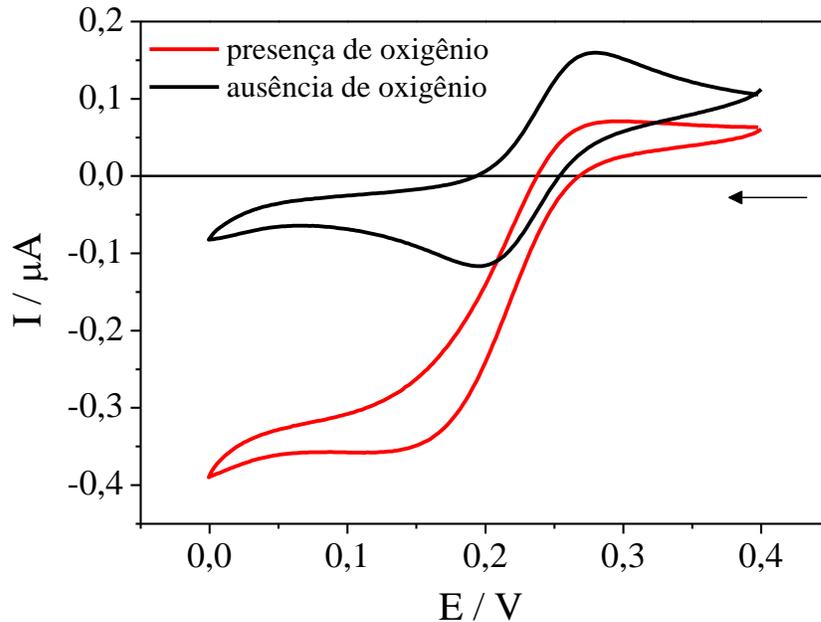
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos por VC para 4-AF.HCl sobre biossensor com Glu proporcionaram estabilidade e reprodutibilidade ao sinal de corrente. Ainda foram realizados experimentos sem a presença de Glu e os resultados indicaram que os biossensores Au/Lac e Au/NpAu/Lac apresentaram nos primeiros ciclos o perfil característico do processo eletroquímico antecedido pela ação enzimática da Lac, como descritos anteriormente. Todavia, nos ciclos posteriores, o perfil voltamétrico para 4-AF.HCl foi modificado, surgindo processos de oxidação e de redução para 4-AF.HCl, indicando que a enzima estava sendo removida da superfície do eletrodo. Portanto, há necessidade de utilizar o agente *cross-linking* para a eficiente imobilização da

enzima sobre a superfície do eletrodo. Ainda é importante ressaltar que os sítios ativos da Lac não foram prejudicados com a presença do Glu, garantindo a sua atividade característica, ratificando que Au/NpAu é um suporte adequado.

Como o mecanismo de catálise enzimática da Lac envolve a redução do oxigênio presente na solução para formar a molécula de água, foram realizados experimentos de VC para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  na ausência e na presença de oxigênio para comprovar a presença da Lac na superfície do eletrodo. Para experimentos sem oxigênio, a solução eletrolítica foi submetida a borbulhamento de  $\text{N}_{2(\text{g})}$  por 10 minutos. A Figura 57 apresenta os voltamogramas cíclicos para 4-AF.HCl sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na ausência e na presença de oxigênio.

Figura 57 – Voltamogramas cíclicos para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na presença e ausência de oxigênio a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  por um ciclo



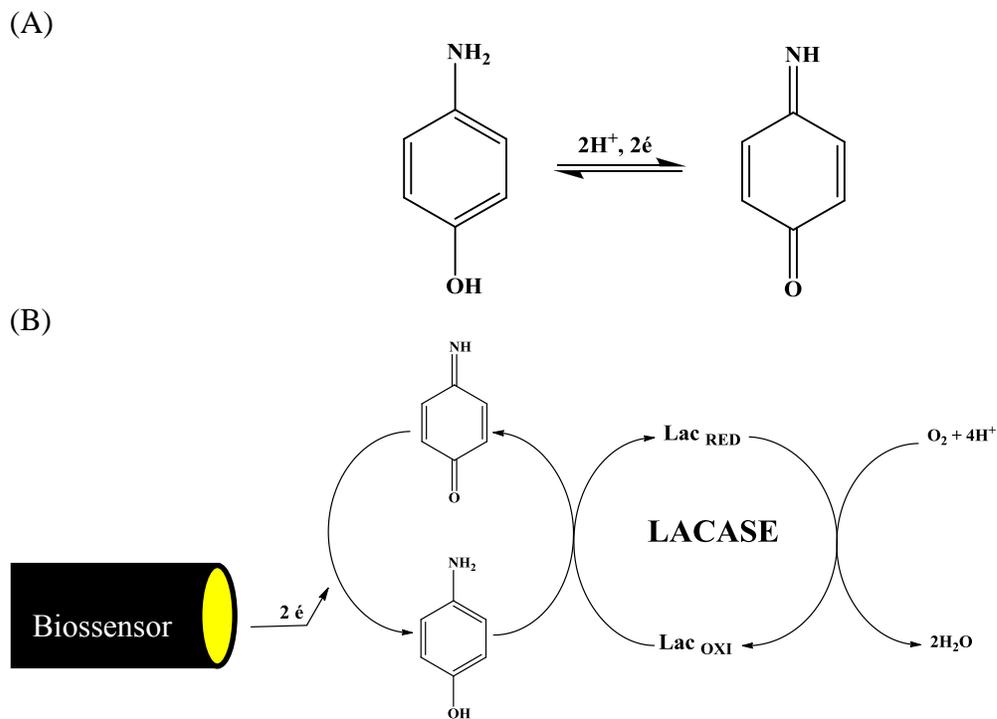
Fonte: Elaborada pelo autor.

Observou-se que na ausência de oxigênio o perfil voltamétrico para 4-AF.HCl foi semelhante àquele observado sobre Au. Portanto, a ausência do oxigênio na solução acabou por impedir o ciclo catalítico da enzima. Contudo, na presença do oxigênio, a ação enzimática foi evidenciada. O mecanismo de catálise da Lac inicia com a doação de elétrons do substrato para

o cobre T1 e, em seguida, ocorre transferência interna de elétrons para o *cluster* T2/T3 que está interagindo com o oxigênio. Esses elétrons são empregados na redução de oxigênio formando água. (174) Deste modo, fica explicado o porquê das diferenças existentes nos voltamogramas obtidos para 4-AF.HCl sobre biossensor Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na ausência e na presença de oxigênio. Também fica evidente que a imobilização da enzima foi eficaz, com o biossensor desenvolvido podendo ser utilizado para fins analíticos.

A Figura 58 apresenta os processos que ocorrem na superfície do biossensor eletroquímico baseado na Lac frente ao 4-AF.HCl na ausência e na presença de oxigênio.

Figura 58 – (A) Representação do mecanismo de reação para 4-AF.HCl na ausência da enzima Lac. (B) Representação da reação enzimática entre 4-AF.HCl e a enzima lacase, com redução eletroquímica da iminoquinona formada na superfície do biossensor



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de adaptação da referência (258).

Na ausência de oxigênio, não há reação enzimática, logo os processos eletroquímicos observados para 4-AF.HCl sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% consistem na interconversão das espécies 4-AF.HCl e 4-iminoquinona, com a participação de dois elétrons e dois prótons como apresentado na Figura 58 (A). No entanto, como observado na Figura 58 (B), em meio

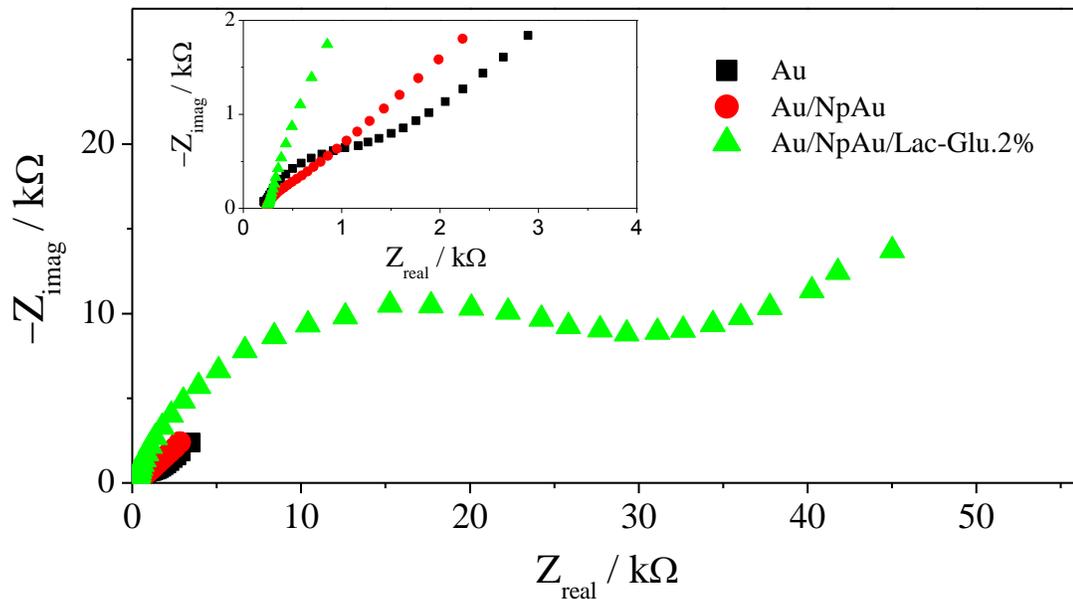
contendo oxigênio, a enzima Lac catalisa a oxidação de 4-AF.HCl formando 4-iminoquinona (espécie que é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo). Este processo de redução produz novamente o substrato, que está inserido no ciclo catalítico da enzima Lac.

#### 4.8.3 Caracterização do biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase

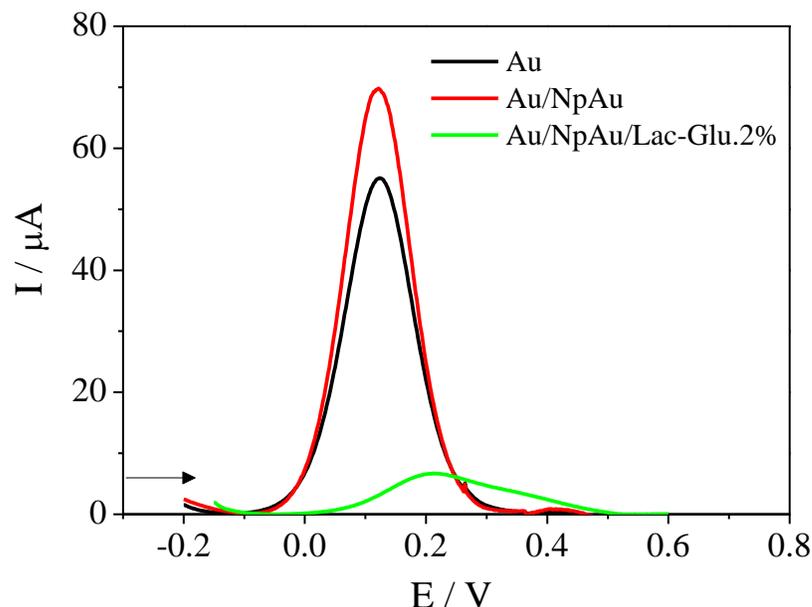
A caracterização do biossensor foi realizada por EIE e VOQ sobre eletrodos de Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% na presença de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , de modo similar ao empregado no estudo de obtenção das NpAu. A Figura 59 apresenta os diagramas de Nyquist com frequência de 100 kHz a 100 mHz e amplitude de 10 mV e os voltamogramas de onda quadrada com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  para os eletrodos.

Figura 59 – (A) Diagramas de Nyquist para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sobre Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com frequência no intervalo de 100 kHz a 100 mHz e amplitude de 10 mV. (B) Voltamogramas de onda quadrada para  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ambos a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos diagramas de Nyquist foi possível calcular  $R_{tc}$  para os eletrodos de Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2%, sendo iguais a 960  $\Omega$ , 350  $\Omega$  e 9,37 k $\Omega$ , respectivamente. Os valores de  $k_{ap}$  obtidos para Au, Au/NpAu e Au/NpAu/Lac-Glu.2% foram  $2,77 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ;  $7,61 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$  e  $2,84 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados comprovam que a presença de NpAu promoveu a reação de transferência de carga, devido o aumento da condutividade do sistema. (53) Por outro lado, quando Lac foi adicionada sobre Au/NpAu, observou-se aumento significativo do valor de  $R_{tc}$  e diminuição da  $k_{ap}$ , indicando que a enzima foi imobilizada sobre a superfície do eletrodo, sendo confirmado também por VOQ, pois a presença de NpAu proporcionou o aumento na  $I_p$  (*vide* Figura 51).

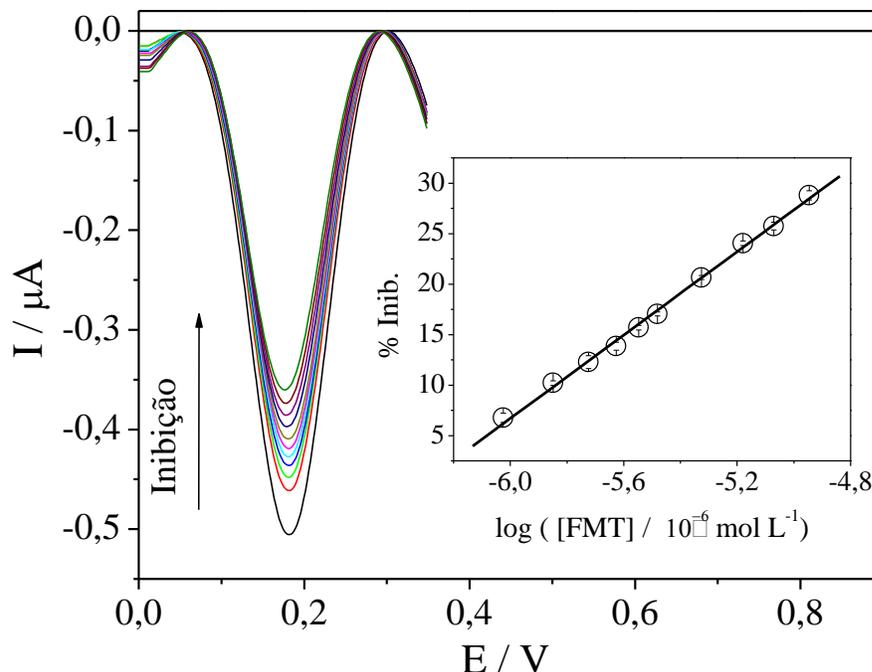
No entanto, quando a enzima Lac foi imobilizada na superfície do eletrodo, o valor da  $I_p$  diminuiu drasticamente, sendo acompanhada pelo deslocamento de  $E_p$  para valores mais positivos. A enzima Lac não catalisa a reação do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Portanto, a presença da proteína, frente a este par redox, atuou como bloqueador da superfície eletródica, dificultando a reação de transferência de elétrons, hipótese confirmada pelo elevado valor de  $R_{tc}$ . Conseqüentemente, observou-se a diminuição da  $I_p$  e esses resultados reforçaram que a enzima foi imobilizada com sucesso sobre a superfície do eletrodo Au/NpAu.

#### 4.8.4 Curvas analíticas para formetanato sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase

Com todos os parâmetros otimizados, as curvas analíticas para FMT foram construídas. O procedimento para análise do FMT foi realizado como segue. Inicialmente, obteve-se a resposta voltamétrica ( $I_0$ ), a corrente de pico do processo de redução do 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão BR pH 5,0 sem a presença do FMT. Em seguida, alíquotas sucessivas de 10  $\mu$ L da solução padrão de FMT  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> foram adicionadas a célula eletroquímica, após 2 min foi realizado um experimento de VOQ.

As curvas analíticas foram construídas com base no %Inib. em função do aumento da concentração de FMT entre  $4,71 \times 10^{-7}$  e  $1,13 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. A Figura 60 apresenta a relação entre % Inib. e logaritmo da concentração do FMT obtida sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em tampão BR pH 5,0 contendo 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> com  $f = 40$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV.

Figura 60 – Curva analítica para FMT construída a partir do percentual de inibição e logaritmo da concentração de FMT entre  $9,43 \times 10^{-7}$  e  $1,13 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em meio de tampão BR pH 5,0 na presença de 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Condições da VOQ:  $f = 40$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV. Na inserção, tem-se a curva analítica média com barras de erro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados mostraram que, após cada adição de alíquota da solução do pesticida, foi observada diminuição da  $I_p$  referente ao processo de redução do 4-AF.HCl. Esses resultados confirmaram que o pesticida FMT possui a capacidade de inibir a atividade enzimática da Lac.

A equação de regressão linear foi  $\% \text{ Inib} = 130,23 \pm 1,86 + 20,57 \pm 0,35 \log [\text{FMT}]$ , com  $R = 0,9993$ . Os valores de LD e de LQ calculados foram  $3,48 \times 10^{-7}$  ( $0,0897 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e  $1,16 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,299 \text{ mg kg}^{-1}$ ), respectivamente. Estes resultados permitem concluir que o biossensor desenvolvido é apto para aplicação em análises de resíduos de FMT em amostras de alimentos por apresentarem valores de LD e de LQ de acordo com o preconizado pela ANVISA 0,02 e  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . (109) As figuras de mérito calculadas a partir das curvas analíticas obtidas para FMT sobre eletrodo não modificado (EDDB), eletrodo modificado (CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%) e biossensor (Au/NpAu/Lac-Glu.2%) podem ser vistos na Tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para a determinação de FMT sobre EDDB, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% e Au/NpAu/Lac-Glu.2%

Parâmetro	EDDB	EM*	Biossensor**
RL / mol L <sup>-1</sup>	$4,98 \times 10^{-7}$ a $1,70 \times 10^{-5}$	$9,80 \times 10^{-8}$ a $3,92 \times 10^{-6}$	$9,43 \times 10^{-7}$ a $1,13 \times 10^{-5}$
Equação da curva	$I_p = -7,79 \times 10^{-8} + 0,103[\text{FMT}]$	$I_p = -6,02 \times 10^{-7} + 3,51 [\text{FMT}]$	$\% \text{ Inib} = 130,23 + 20,57 \log [\text{FMT}]$
IC <sub>a</sub>	$\pm 1,56 \times 10^{-7}$	$\pm 9,61 \times 10^{-8}$	$\pm 1,86$
IC <sub>b</sub>	$\pm 0,020$	$\pm 0,495$	$\pm 0,35$
R	0,9997	0,9982	0,9993
S <sub>a</sub>	$6,28 \times 10^{-8} \text{ A}$	$1,07 \times 10^{-8} \text{ A}$	2,60 %Inib.
S <sub>b</sub>	$8,11 \times 10^{-3} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$5,51 \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	0,487 %Inib. mol <sup>-1</sup> L
LD (mol L <sup>-1</sup> )	$3,67 \times 10^{-7}$ (94,58 ppb)	$9,67 \times 10^{-8}$ (24,92 ppb)	$3,48 \times 10^{-7}$ (87,70 ppb)
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	$1,22 \times 10^{-6}$ (314,42 ppb)	$3,22 \times 10^{-7}$ (82,98 ppb)	$1,16 \times 10^{-6}$ (299,0 ppb)

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5% ; (\*\*) Au/NpAu/Lac-Glu.2%

Os valores de LD e de LQ para FMT sobre biossensor foram menores que os obtidos para FMT sobre EDDB e 3,5 vezes maior que aqueles empregando CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, indicando que os eletrodos modificados (sensores e biossensores) são promissores para análise de FMT. De modo geral, cada dispositivo empregado apresenta suas vantagens,

mas é importante ressaltar que atualmente o desenvolvimento de eletrodos modificados (sensores ou biossensores) tem ganho destaque em estudos eletroanalíticos.

A reprodutibilidade na construção do biossensor proposto foi avaliada a partir dos dados de  $I_p$  para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 5,0 para três eletrodos construídos com o mesmo procedimento a partir de 10 determinações realizadas na mesma solução de 4-AF.HCl e no mesmo dia. Os valores de %DPR determinados para a reprodutibilidade e a repetibilidade foram 1,77% e 1,36%, respectivamente. Os ensaios de estabilidade do biossensor foram realizados pela análise dos valores da  $I_p$  para 4-AF.HCl  $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 5,0, a partir dos experimentos de VOQ realizados em dias diferentes. Os resultados indicaram que, após 19 dias, a resposta do biossensor passou a ser 94,2% da resposta inicial. Estudos apresentados na literatura mostraram ensaios de estabilidade de biossensores baseados em Lac no intervalo de 7 a 60 dias, sem a perda significativa da atividade enzimática. (234, 258- 264) Portanto, o eletrodo Au/NpAu/Lac-Glu.2% desenvolvido apresentou estabilidade adequada. A Tabela 20 apresenta uma visão geral de alguns biossensores baseados em enzimas oxirredutases para a detecção de pesticidas pertencentes à classe dos carbamatos. Informações como configuração do eletrodo, substrato fenólico empregado, pesticida estudado, aplicações e valores de LD foram listados.

Pode-se perceber que os carbamatos possuem a capacidade de inibir a atividade de diferentes enzimas oxirredutases, sendo que a lacase e a tirosinase receberam mais destaque. Os valores de LD obtidos com a utilização do Au/NpAu/Lac-Glu.2% foram comparáveis aos calculados nos demais trabalhos. Deste modo, o biossensor desenvolvido pode ser considerado como ferramenta viável para a detecção do pesticida FMT.

Tabela 20 – Biossensores baseados em oxirredutases para a determinação de carbamatos

<b>Eletrodo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Pesticida</b>	<b>Aplicações</b>	<b>LD / mol L<sup>-1</sup></b>	<b>Ref.</b>
Grafite/ Tirosinase	Fenol	Ziram Diram DEDTC de Zn	Maçã	$7,4 \times 10^{-8}$ $1,3 \times 10^{-6}$ $1,7 \times 10^{-6}$	(265)
EI/Tirosinase	Catecol	DEDTC de Na	Água de rio	$2,0 \times 10^{-6}$	(266)

Continua: Tabela 20 – Biossensores baseados em oxirredutases para a determinação de carbamatos

Pt/Tirosinase	Catecol	Carbaril	–	$2,0 \times 10^{-7}$	(267)
Au/SAM/ Peroxidase	Hidroquinona	Tiodicarbe	Batata, maçã e morango	$5,75 \times 10^{-7}$	(268)
ECC/Lac	Escurlatina	Metomil	Cenoura, pepino, alface, pimenta, batata e tomate	$2,0 \times 10^{-7}$	(234)
EPC/CHcych -PFO	Hidroquinona	Tiodicarbe	Alface, uva e pêssego	$1,58 \times 10^{-7}$	(269)
EPC/Pt-BMI.BF4- MMT/Lac	Dopamina	Metomil	Cenoura e tomate	$2,35 \times 10^{-7}$	(258)
EPC/NTCPM/Lac	4-AF.HCl	Pirimicarbe	Tomate e alface	$1,8 \times 10^{-7}$	(47)
Au/NpAu/Lac-Glu.2%	4-AF.HCl	FMT	Manga e uva	$3,48 \times 10^{-7}$	(*)

Fonte: Elaborada pelo autor. (\*) Esse trabalho.

#### ***4.8.5 Determinação de formetanato sobre biossensor eletroquímico baseado na enzima lacase em amostras de manga e de uva***

Au/NpAu/Lac-Glu.2% foi empregado para análise de FMT em amostras de manga e de uva, como ilustrado pela Tabela 21 para os valores de concentração adicionada e recuperada, percentuais de recuperação, intervalo de confiança e % DPR. Ressalta-se que não foram encontradas na literatura aplicações de biossensor eletroquímico baseado na Lac para determinação de pesticidas em amostras de manga e de uva

Tabela 21 – Determinação de FMT sobre Au/NpAu/Lac-Glu.2% em amostras de manga e de uva

<b>Manga</b>			
<b>[FMT]<sub>adicionada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	1,89 x 10 <sup>-6</sup>	2,83 x 10 <sup>-6</sup>	6,60 x 10 <sup>-6</sup>
<b>[FMT]<sub>recuperada</sub> / mol L<sup>-1</sup></b>	2,05 x 10 <sup>-6</sup>	2,72 x 10 <sup>-6</sup>	6,87 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,13 x 10 <sup>-6</sup>	± 0,25 x 10 <sup>-6</sup>	± 0,03 x 10 <sup>-6</sup>
<b>% Recuperação</b>	108,62	96,08	104,04
<b>% DPR</b>	2,52	3,71	0,18
<b>Uva</b>			
<b>[FMT]<sub>adicionada</sub> /mol L<sup>-1</sup></b>	2,83 x 10 <sup>-6</sup>	4,72 x 10 <sup>-6</sup>	6,60 x 10 <sup>-6</sup>
<b>[FMT]<sub>recuperada</sub> /mol L<sup>-1</sup></b>	2,80 x 10 <sup>-6</sup>	4,62 x 10 <sup>-6</sup>	6,59 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Intervalo de confiança</b>	± 0,41 x 10 <sup>-6</sup>	± 0,71 x 10 <sup>-6</sup>	± 0,19 x 10 <sup>-6</sup>
<b>% Recuperação</b>	98,88	97,99	99,79
<b>% DPR</b>	5,89	6,15	1,17

Fonte: Elaborada pelo autor.

. Para experimentos realizados em triplicata, os percentuais de recuperação variaram entre 96,08% e 108,62% e entre 97,99% e 99,79% para amostras de manga e de uva, respectivamente. Os resultados foram precisos e exatos, estando satisfatórios para aplicações analíticas. Esses dados também podem indicar que as espécies antioxidantes (compostos fenólicos) presentes nas amostras originais não interferiram nas análises, indicando que o método QuEChERS aliado ao biossensor proposto foi empregado com sucesso para a quantificação de FMT em amostras complexas.

## 5 CONCLUSÕES

Pelo exposto, demonstrou-se que sensores e biossensores eletroquímicos baseados nas seguintes superfícies: HMDE, EDDB, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%, CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%/Lac-Glu.2% e Au/NpAu/Lac-Glu.2% foram aplicados com sucesso para a determinação dos pesticidas EDS, TBZ e FMT em amostras de cana-de-açúcar (EDS e TBZ), tomate (EDS), manga (TBZ e FMT), uva (TBZ e FMT) águas naturais (EDS e TBZ).

A redução de EDS sobre HMDE em meio ácido apresentou processo quase-reversível com a participação de dois elétrons. No entanto, em meio básico, observou-se dois processos de redução devido à reação de hidrólise de EDS, que originou endosulfanodiol. Em ambos os sensores eletroquímicos, TBZ apresentou processo de oxidação irreversível com a participação de um elétron removido do anel imidazólico, controlado por mecanismo químico-eletroquímico, com a reação eletroquímica ocorrendo, preferencialmente, com a forma protonada do TBZ. O mecanismo de oxidação do FMT sobre EDDB foi do tipo químico-eletroquímico, mas a reação foi do tipo eletroquímico-químico-eletroquímico sobre eletrodo modificado.

Comprovou-se que a funcionalização dos nanotubos de carbono foi um procedimento fundamental para intensificar seu efeito eletrocatalítico, sem alteração da morfologia, mas com a diminuição do valor do diâmetro médio. O eletrodo de carbono vítreo foi facilmente modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto e a junção destes promoveu efeito sinérgico, que intensificou a resposta eletroquímica do TBZ e FMT.

A enzima lacase foi eficientemente imobilizada empregando o método de ligações cruzadas com glutaraldeído sobre as superfícies de Au/NpAu e CV/NTCPMF-FcCo-Naf.0,5%. A resposta do biossensor eletroquímico foi otimizada em meio de tampão BR pH 5,0, estando esse valor na faixa ótima de pH para a enzima lacase.

Determinou-se que o pesticida EDS (organoclorado), TBZ (benzimidazólico) e FMT (carbamato) inibiram a atividade enzimática da lacase, sendo possível o desenvolvimento de metodologia para a determinação destes pesticidas, baseada no fenômeno de inibição enzimática. Portanto, os sensores e os biossensores eletroquímicos aqui desenvolvidos podem ser considerados como ferramentas alternativas e promissoras para a determinação de pesticidas em matrizes alimentares e ambientais.

## REFERÊNCIAS

- 1 ZHANG, L.; FANG, M. Nanomaterials in pollution trace detection and environmental improvement. **Nano Today**, v. 5, p. 128-142, 2010.
- 2 GUILLÉN, D.; GINEBREDA, A.; FARRÉ, M.; DARBRA, R. M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Priorization of chemicals in the aquatic environment based on risk assesment: Analytical, modeling and regulatory perspective. **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 236-252, 2012.
- 3 WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25-32, 2014.
- 4 GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, F. M.; PRETTY, J.; ROBINSO, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food Security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, p. 812-818, 2010.
- 5 FUNDO DE POPULAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. População. Disponível em: <<http://www.unfpa.org.br/novo/index.php/populacao>>. Acesso em: 24 mai. 2014.
- 6 VÖRÖSMARTY, C. J.; MCINTYRE, P. B.; GESSNER, M. O.; DUGGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P.; GLIDDEN, S.; BUNN, S. E.; SULLIVAN, C. A.; LIERMANN, C. R.; DAVIES, P. M. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, p. 555-561, 2010.
- 7 RULL, V. Food security: Green revolution drawbacks. **Science**, v. 328, p. 169, 2010.
- 8 BRASIL. Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/17802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm)>. Acesso em 09 de ago. 2014.
- 9 FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L. P.; ELSNER, M. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. **Science**, v. 341, p. 752-758, 2013.
- 10 RATHORE, H.S.; NOLLET, L. M. L. **Pesticides: Evaluation of environmental**. New York: CRC, 2012.
- 11 LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011.
- 12 STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis**. Rijeka: InTech, 2011.

- 
- 13 GUILLETTE JR., L. J.; IGUCHI, T. Life in a contaminated world. **Science**, v. 337, p. 1614-1615, 2012.
  - 14 KÖHLER, H.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.
  - 15 CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, E. B.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11918-11926, 2011.
  - 16 MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect on endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2265-2303, 2011.
  - 17 ALAVANJA, M. C.; ROSS, M. K.; BONNER, M. R. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 120-142, 2013.
  - 18 WEBER, J.; HALSALL, C. J.; MUIR, D.; TEIXEIRA, C.; SMALL, J.; SOLOMON, K.; HERMANSON, M.; HUNG, H.; BIDDLEMAN, T. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the arctic, **Science of the Total Environment**. v. 408, p. 2966-2984, 2010.
  - 19 BAKIRCI, G. T.; ACAY, D. B. Y.; BAKIRCI, F.; ÖTLES, S. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. **Food Chemistry**, v. 160, p. 379-392, 2014.
  - 20 STOYTCHIEVA, M. **Pesticide – Formulations, Effects, Fate**. Intech, 2011.
  - 21 MADHAVAN, J.; GRIESER, F.; ASHOKKUMAR, M. Degradation of formetanate hydrochloride by combined advanced oxidation processes. **Separation and Purification Technology**, v. 73, p. 409-414, 2010.
  - 22 LAI, H.; CHEN, C.; CHANG, Y.; LU, C.; WU, R. Efficient photocatalytic degradation of thiobencarb over BiVO<sub>4</sub> driven by visible light: parameter and reaction pathway investigations. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 78-86, 2014.
  - 23 BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; SOUSA, J. P. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontosclex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013.
  - 24 KUGLER, H. **Paraíso dos agrotóxicos**. Disponível em: <[http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2012/296/pdf\\_aberto/agrotoxicos296.pdf](http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2012/296/pdf_aberto/agrotoxicos296.pdf)>. Acesso em: 19 abr. 2013.

- 
- 25 GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, p. 462-467, 2013.
- 26 PROGRAMA DE PROMOÇÃO DAS EXPORTAÇÕES DAS FRUTAS BRASILEIRAS E DERIVADOS . Disponível em: < <http://www.brazilianfruit.org.br/Pbr/Inteligencia/Estatisticas/Exportacao.asp>>. Acesso em: 06 ago. 2014.
- 27 <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/negocios/ce-fecha-semester-como-maior-exportador-do-ne-1.369706>>. Acesso em: 20 mai. 2014.
- 28 PICO, Y.; FONT, G.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 153-173, 2000.
- 29 PINTO, M. I.; SONTAG, G.; BERNARDINHO, R. J.; NORONHA, J. P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 225-237, 2010.
- 30 DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- 31 CHEN, A.; SHAH, B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2158-2173, 2013.
- 32 FISHER, J.; DEJMKOVA, H.; BAREK, J. Electrochemistry of pesticides and its analytical applications. **Current Organic Chemistry**, v. 15, p. 2923-2935, 2011.
- 33 SERRANO, S. H.; BARROS, R. C. M.; JULIÃO, M. S. S.; PAULA, F. R. em: SQUELLA, J. A.; BOLLO, S. **Electroanalytical aspects of biological significance compounds**. Kerala: Thansworld Research Network, 2006.
- 34 COMMINELLES, C.; CHEN, G. **Electrochemistry of the environment**. New York: Springer, 2010.
- 35 WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, New York: Wiley VCH, 2001.
- 36 BAREK, J.; FOGG, A. G.; MUCK, A.; ZIMA, J. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 291-309, 2001.
- 37 RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Electrochemical mechanism and kinetics studies of haloperidol and its assay in commercial formulations. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 2036-2044, 2011.
- 38 KRAFT, A. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355-385, 2007.

- 
- 39 LEVENT, A. Electrochemical determination of determination of melatonin using a boron-doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 21, p. 114-119, 2012.
- 40 ŠVORC, L.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticide: determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 294-300, 2013.
- 41 ALKIRE, R. C.; KOLB, D. M.; LIPKOWSKI, J.; ROSS, P. N. **Chemically modified electrodes**, Weinheim: WILEY-VCH, 2009.
- 42 O'CONNELL, M. J. **Carbon Nanotubes: properties and applications**. New York: CRC, 2006.
- 43 ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensor, biosensor and their biomedical applications**, USA: Academic press, 2008.
- 44 ZAGAL, J. H.; GRIVEAU, S.; SANTANDER-NELLI, M.; GRANADOS, S. G.; BEDIQUI, F. Carbon nanotubes and metalloporphyrins and metallophthalocyanines based materials for electroanalysis. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.16, p. 713-740, 2012.
- 45 PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensor for pesticide determination: a review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, p. 19-31, 2012.
- 46 DYK, J. S. V.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291-307, 2011.
- 47 OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. **Talanta**, v. 106, p. 137-143, 2013.
- 48 SHLEEV, S.; TKAC, J.; CHRISTENSON, A.; RUZGAS, T.; YAROLOV, A. I.; WHITTAKER, J. W.; GORTON, L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 20, p. 2517-2554, 2005.
- 49 TORTOLINI, C.; FUSCO, M. D.; FRASCONI, M.; FAVERO, G.; MAZZEI, F. Laccase-polyazetidine prepolymer-MWCNT integrated system: biochemical properties and application to analytical determination in real samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 301-307, 2010.
- 50 UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. Enzyme inhibition based biosensors: A review. **Analytical Letters**, v. 46, p. 225-241, 2013.

- 
- 51 AMINE, A.; MOHAMMADI, H. Electrochemical biosensors for heavy metals based on enzyme inhibition. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 49, p. 299-310, 2007.
- 52 ZHANG, W.; ASIRI, A. M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 54, p. 1-10, 2014.
- 53 PIGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLES-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5848-5866, 2008.
- 54 DANIEL, M.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293-346, 2004.
- 55 GOSWAMI, S.; VIG, K.; SINGH, D. K. Biodegradation of  $\alpha$  and  $\beta$  endosulfan by *Aspergillus sydoni*. **Chemosphere**, v. 75, p. 883-888, 2009.
- 56 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografia endosulfam. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af90f080474580548c47dc3fb4c6735/E02++Endossulfam\\_FINAL.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af90f080474580548c47dc3fb4c6735/E02++Endossulfam_FINAL.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 24 mai. 2014.
- 57 SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 24 mai. 2014.
- 58 SILVA, M. H.; CARR JR, W. C. Human health risk assessment of endosulfan: II. dietary exposure assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 18-27, 2010.
- 59 COSTA, S. M.; MAZZOLA, P. G.; SILVA, J. C. A. R.; PAHL, R.; PESSOA JR.; COSTA, S. A. Use of sugar cane straw as a source of cellulose for textile fiber production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 189-194, 2012.
- 60 VAGI, M. C.; PETSAS, A. S.; KOSTOPOULOU, M. N.; KARAMANOLI, M. K.; LEKKAS, T.D. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. **Desalination**, v. 210, p. 146-156, 2007.
- 61 MOLLAHOSSEINI, A.; NOROOZIAN, E. Polyphosphate-doped polypyrrole coated on steel fiber for the solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 169-174, 2009.
- 62 WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

- 
- 63 MARCHIS, D.; FERRO, G. L.; BRIZIO, P.; SQUADRONE, S.; ABETE, M. C. Detection of pesticides in crops: a modified QuEChERS approach. **Food Control**, v. 25, p. 270-273, 2012.
- 64 FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1283-1287, 2011.
- 65 RALLIS, G. N.; SAKKAS, V. A.; BOUMBA, V. A.; VOUGIOUKLAKIS, T.; ALBANIS, T. A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 1-9, 2012.
- 66 KURANCHIE-MENSAH, H.; ATIEMO, S. M.; PALM, L. M. N.; BLANKSON-ARTHUR, S.; TUTU, A. O.; FOSU, P. Determination of organochlorine pesticide residue in sediment and water from the Densu river basin, Ghana. **Chemosphere**, v. 86, p. 286-292, 2012.
- 67 ANDRADE, G. C. R. M.; FREGLUGLIA, R. M. O.; FURLANI, R. P. Z.; TORRES, N. H.; TORISIELO, V. L. Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1701-1708, 2011.
- 68 BOONJOB, W.; QUINTANA, J. B.; RODIL, R.; CELA, R.; MIRÓ, M. In-line sequential injection-based hollow-fiber sorptive microextraction as a front-end to gas chromatography-mass spectrometry: a novel fully automatic sample processing technique for residue analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 8653-8662, 2013.
- 69 LI, YEE.; CHEN, P.; HUANG, S. Water with low concentration of surfactant in dispersed solvent-assisted emulsion dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 51-57, 2013.
- 70 ZHOU, Q.; WU, W.; XIE, G.; HUANG, Y. Enrichment and analysis of typically persistent organic pollutants at trace level using micro-solid phase extraction based on titanium dioxide nanotube arrays. **Analytical Methods**, v. 6, p. 295-301, 2014.
- 71 SHAIKH, H.; MEMON, N.; BHANGER, M. I.; NIZAMANI, S. M.; DENIZLI, A. Core-shell molecularly imprinted polymer-based solid-phase microextraction fiber for ultra trace analysis of endosulfan I and II in real aqueous matrix through gas chromatography-micro electron capture detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1337, p. 179-187, 2014.

- 
- 72 HE, Z.; WANG, P.; LIU, D.; ZHOU, Z. Hydrophilic–lipophilic balanced magnetic nanoparticles: Preparation and application in magnetic solid-phase extraction of organochlorine pesticides and triazine herbicides in environmental water samples. **Talanta**, v. 128, p. 1-8, 2014.
- 73 GARCIA, A. J. R.; BARRIO, A. R.; CARRAZÓN, J. M. P.; DÍEZ, L. M. P. Polarographic study of organochlorine pesticides in micellar solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 246, p. 293-300, 1991.
- 74 RAVIEJO, A. J.; GONZÁLEZ, A.; PINGARRÓN, J. M.; PLO, L. M. Determination of organochlorine pesticides in apple samples by differential-pulse polarography in emulsified medium. **Analytica Chimica Acta**, v. 264, p. 141-147, 1992.
- 75 PRABU, H. G.; MANISANKAR, P. Determination of endosulfan by stripping voltammetry. **Analyst**, v. 119, p. 1867-1873, 1994.
- 76 MATHEW, L.; RADDY, M. L. P.; RAO, T. P.; IYER, C. S. P. Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of endosulfan. **India Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical and Analytical Chemistry**, v. 37, p. 1027-1028, 1998.
- 77 MANISANKAR, P.; SELVANATHAN, G.; VISWANATHAN, S.; PRABU, H. G. Electrochemical determination of some organic pollutants using wall-jet electrode. **Electroanalysis**, v. 14, p. 1722-1727, 2002.
- 78 MANISANKAR, P.; VEDHI, C.; VISWANATHAN, S.; PRABU, H. G. Investigation on the usage of clay modified electrode for the electrochemical determination of some pollutants. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. B39, p. 89-100, 2004.
- 79 BAKOURI, H. E.; PALACIOS-SANTANDER, J. M.; CUBILLANA-AGUILERA, L.; OUASSINI, A.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; CISNEROS, J. L. H. Electrochemical analysis of endosulfan using a C18-modified carbon-paste electrode. **Chemosphere**, v. 60, p. 1565-1571, 2005.
- 80 LIU, G.; WANG, S.; LIU, J.; SONG, D. An Electrochemical immunosensor based on chemical assembly of vertically aligned carbon nanotubes on carbon substrates for direct detection of the pesticide endosulfan in environmental water. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 3921-3928, 2012.
- 81 DICK, J. S. V.; PLETSCHKE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticide in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291-307, 2011.

- 
- 82 CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides. **Electrochimica Acta**, v. 67, p. 79-86, 2012.
- 83 GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, p. 462-467, 2013.
- 84 BERNABEU, A.; VERCHER, R. F.; SANTOS-JUANES, L.; SIMÓN, P. J.; LARDÍN, C.; MARTÍNEZ, M. A.; VICENTE, J. A.; GONZÁLEZ, R.; LIOSÁ, C.; ARQUES, A.; AMAT, A. M. Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. **Catalysis Today**, v. 161, p. 235-240, 2011.
- 85 CARRA, I.; MALATO, S.; JIMÉNEZ, M.; MALDONADO, M. I.; PÉREZ, J. A. S. Microcontaminant removal by solar photo-Fenton at natural pH run with sequential and continuous iron additions. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 132-140, 2014.
- 86 PERÉZ, J. A. S.; CARRA, I.; SIRTORI, C.; AGÜERA, A.; ESTEBAN, B. Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at µg/L scale. **Water Research**, v. 51, p. 55-63, 2014.
- 87 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografia tiabendazol. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/151ded0047459779a043f43fbc4c6735/T12\\_Tiabendazol.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/151ded0047459779a043f43fbc4c6735/T12_Tiabendazol.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 20 mai. 2014.
- 88 MANABE, M.; KANDA, S.; FUKUNAJA, K.; TSUBURA, A.; NISHIYAMA, T. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, p. 413-421, 2006.
- 89 BAYEN, S.; ZHANG, H.; DESAI, M. M.; OOI, S. K.; KELLY, B. C. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physicochemical properties. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 1-8, 2013.
- 90 JALIL, M. E. R.; VIEIRA, R. S.; AZEVEDO, D.; BASCHINI, M.; SAPAG, K. Improvement in the adsorption of thiabendazole by using aluminum pillared clays. **Applied Clay Science**, v. 71, p. 55-63, 2013.
- 91 POTER, J.; O'LOAN, N.; BELL, B.; MAHONEY, J.; MCGARRITY, M.; MCCONNELL, R. I.; FITZGERALD, S. P. Development of an evidence biochip array kit for the multiplex screening of more than 20 anthelmintic drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 3051-3056, 2012.

- 
- 92 MORENO, M.; PLANA, E.; MANCLÚS, J. J.; MONTOYA, A. Comparative study of monoclonal and recombinant antibody-based immunoassays for fungicide analysis in fruit juices. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 481-489, 2014.
- 93 MALÁ, Z.; PANTŮČKOVÁ, P.; GEBAUER, P.; BOČEK, P. Advanced electrolyte tuning and selectivity enhancement for highly sensitive analysis of cations by capillary ITP-ESI MS. **Electrophoresis**, v. 34, p. 777-784, 2013.
- 94 CORREA, R. A.; ESCANDAR, G. M. A new analytical application of nylon-induced room-temperature phosphorescence: determination of thiabendazole in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, p. 58-65, 2006.
- 95 ANDRADE, S. R. C.; SCARMINIO, L. S.; NERY, M. M. F.; OLIVEIRA, A. C. Comparison of multivariate calibration methods to determine simultaneously mebendazole–cambendazole and mebendazole–thiabendazole in pharmaceutical preparations by UV–visible spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 655-665, 2003.
- 96 MALAJ, N.; OUYANG, Z.; SINDONA, G.; COOKKS, R. G. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 43, p. 1913-1919, 2012.
- 97 HE, L.; CHEN, T.; LABUZA, T. P. Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 148, p. 42-46, 2014.
- 98 ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4808-4816, 2011.
- 99 WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; GNUSOWSKI, B. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1856-1870, 2011.
- 100 CHEN, Z.; YING, G.; LAI, H.; CHEN, F.; SU, H.; LIU, Y.; PENG, F.; ZHAO, J. Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 3175-3188, 2012.
- 101 SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples. **Analytical Methods**, v. 4, p. 3864, 2012.

- 
- 102 DENG, X.; CHEN, X.; LIN, K.; DING, G.; YAO, P. Rapid and selective determination of trace benzimidazole fungicides in fruit juices by magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 1576-1582, 2013.
- 103 BOERIS, V.; ARANCIBIA, J. A.; OLIVIERI, A. C. Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 814, p. 23-30, 2014.
- 104 SMOLA, U.; SONTANG, G. Polarographic determination of thiabendazole. **Microchimica Acta**, v. 3, p. 239-251, 1985.
- 105 MSAGATI, T. A. M.; NGILA, J. C. Voltammetric determination of a benzimidazole anthelmintic mixture at a poly(3-methylthiophene)-modified glassy carbon electrode. **South African Journal of Chemistry**, v. 56, p. 5-9, 2003.
- 106 PRADA, A. G.; MENA, M. L.; REVIEJO, A. J.; PIGARRÓN, J. M. Voltammetric behavior and determination by flow injection with amperometric detection of benzimidazoles. **Analytical Letters**, v. 37, p. 65-79, 2004.
- 107 LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. a review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.
- 108 PADILLA, S.; MARSHALL, R. S.; HUNTER, D. L.; LOWIT, A. Time course of cholinesterase inhibition in adult rats treated acutely with carbaryl, carbofuran, formetanate, methomyl, methiocarb, oxamyl or propoxur. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 219, p. 202-209, 2007.
- 109 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografia formetanato. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73813200474592869ab9de3fbc4c6735/F40.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 mai. 2014.
- 110 DIVITO, C. B.; DAVIES, S.; MASOUDI, S.; MUHORO, C. N. Relative stability of Formamidine and carbamate groups in the bifunctional pesticide formetanate hydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5377-5382, 2007.
- 111 WANG, J.; CHEUNG, W.; GRANT, D. Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 528-537, 2005.
- 112 WANG, J. A.; CHEUNG, W.; Determination of pesticides in soy-based infant formula using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 89, p. 214-224, 2006.

- 
- 113 PODHORNIAK, L. V.; KAMEL, A.; RAINS, D. M. Determination of formetanate hydrochloride in fruit samples using liquid chromatography-mass selective detection or-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5862-5867, 2010.
- 114 RAJSKI, Ł.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109-120, 2013.
- 115 GARCIA, J. M.; JIMENEZ, A. I.; ARIAS, J. J.; KHALAF, K. D.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. Application of the partial least-squares calibration method to the simultaneous kinetic determination of propoxur, carbaryl, ethiofencarb and formetanate. **Analyst**, v. 120, p. 313-317, 1995.
- 116 ESCURIOLA, M. J.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. A clean analytical method for the spectrophotometric determination of formetanate incorporating an on-line microwave assisted hydrolysis step, **Analytica Chimica Acta**, v. 390, p. 147-154, 1999.
- 117 LUND, H.; HAMMERICH, H. **Organic Electrochemistry**, New York: Marcel Dekker, Inc., 2001.
- 118 MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, v. 79, p. 1406-1411, 2009.
- 119 INAM, R.; BILGIN, C. Square wave voltammetric determination of methiocarb insecticide based on multiwall carbon nanotube paste electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 43, p. 425-432, 2013.
- 120 WANG, M.; HUANG, J.; WANG, M.;ZHANG, D.; CHEN, J. Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 151, p. 191-197, 2014.
- 121 SUBBALAKSSHMAMMA, M.; REDDY, S. J. Electrochemical behavior of formetanate and chlordimefor pesticides. **Electroanalysis**, v. 6, p. 612-615, 1994.
- 122 OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; CORREIA, A. N.; DE LIMA-NETO, P.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C.; Laccase-Prussian blue film-graphene doped carbon paste modified electrode for carbamate pesticides quantification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 292-299, 2013.

- 
- 123 OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; CORREIA, A. N.; DE LIMA-NETO, P.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C.; Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidases–gold nanoparticles–chitosan hybrid film–graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection. **Bioelectrochemistry**, v. 98, p. 20-29, 2014.
- 124 BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of the Chemical Society**, v. 458, p. 1456-1462, 1931.
- 125 MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. São Paulo: Blucher, 2007.
- 126 OLIVEIRA, R. T. S.; SALAZAR-BANDA, G. S.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Electroanalytical determination of N-nitrosamines in aqueous solution using a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 20, p. 396-401, 2008.
- 127 PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J.; BAREK, J. Boron-doped diamond film electrodes—new tool for voltammetric determination of organic substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 148-172, 2009.
- 128 SALAZAR-BANDA, G.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R.; AVACA, L. A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 4612-4619, 2006.
- 129 MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, v. 79, p. 1406-1411, 2009.
- 130 GERALDO, D. A.; CHAMUNORWA, A. T.; LIMSON, J.; NYOKONG, T. Electrooxidation of hydrazine catalyzed by noncovalently functionalized single-walled carbon nanotube with CoPc. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 8051-8057, 2008.
- 131 WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; QIN, X.; ZHAO, Z.; MIAO, Z.; HUANG, N.; CHEN, Q. A novel glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles-modified Pb nanowires. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 142-146, 2009.
- 132 PINHO, A.; VISWANATHAN, S.; RIBEIRO, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Electroanalysis of urinary L-dopa using tyrosinase immobilized on gold nanoelectrode ensembles. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, p. 131–137, 2012.
- 133 MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

- 
- 134 OZOEMENA, K. I.; NYOKONG, T.; NKOSI, D.; CHAMBRIER, I.; COOK, M. J. Insights into the surface and redox properties of single-walled carbon nanotube-cobalt(II) tetra-aminophthalocyanine self-assembled on gold electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 4132-4143, 2007.
- 135 RATHER, J. A.; PILEHVAR, S.; DE WAEL, K.; A biosensor fabricated by incorporation of a redox mediator into a carbon nanotube/nafion composite for tyrosinase immobilization: detection of matairesinol, an endocrine disruptor. **Analyst**, v. 138, p. 204-210, 2013.
- 136 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacópeia Brasileira. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf)>. Acesso em: 22 abr. 2013.
- 137 COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding Voltammetry**. London: World Scientific Publishing, 2007.
- 138 FRY, A. J. **Synthetic Organic Electrochemistry**, New York: John Wiley, 1989.
- 139 MIRČESKI, V.; LOVRIĆ, M. Split square-wave voltammograms of surface redox reactions. **Electroanalysis**, v. 9, p. 1283-1287, 1997.
- 140 DANTAS, A. N. S.; DE SOUZA, D.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Correia, Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode, **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 9083-9089, 2010.
- 141 OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Square-wave adsorptive voltammetry of dexamethasone: redox mechanism, kinetic properties, and electroanalytical determinations in multicomponent formulations, **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 148-156, 2011.
- 142 GOSSER, JR. K. D.; **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**, New York: UCH Publishers., 1993.
- 143 MIRČESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; LOVRIĆ, M. **Square Wave Voltammetry Theory and Application**, República da Macedônia: Springer, 2007.
- 144 LOVRIĆ, M.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 248, p. 239-253, 1988.
- 145 MIRČESKI, V.; GULABOSKI, R.; JORDANOSKI, B.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; Square-wave voltammetry of 5-fluorouracil. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 490, p. 37-47, 2000.
- 146 KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; LOVRIĆ, M. Kinetic measurements of a surface-confined redox reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, p. 248-255, 1995.

- 
- 147 SANTOS, V. N.; MENDONÇA, G. L. F.; FREIRE, V. N.; HOLANDA, A. K. M.; SOUSA, J. R.; LOPES, L. G. F.; ELENA, J. CORREIA, A. N. Electrochemical and Monte Carlo studies of self-assembled trans-[Fe(cyclam)(NCS)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complex ion on gold surface as electrochemical sensor for nitric oxide. **Electrochimica Acta**, v. 91, p. 1-10, 2013.
- 148 CALLE-VALLEJO, F.; KOPER, M. T. M. First-principles computational electrochemistry: Achievements and challenges. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 3-11, 2012.
- 149 ÖZALP-YAMAN, Ş.; ÖNAL, A.M.; TÜRKER L. Electrochemical and quantum chemical studies on mitomycin and Adriamycin. **Journal of Molecular Structure**, v. 654, p. 81-93, 2003.
- 150 STEVIĆ, M. C.; IGNJATOVIĆ, L. M.; CIRIC-MARJANOVIĆ, G.; MARJANOVIC, B.; BAREK, J.; ZIMA, J. Electrochemical oxidation of 6-hydroxyquinoline on a glassy carbon paste electrode: voltammetric and computational study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 677, p. 69-77, 2012.
- 151 OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; NASCIMENTO, J. M.; SOARES, J. E. S.; FREIRE, V. N.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Direct electrochemical analysis of dexamethasone endocrine disruptor in raw natural waters, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 110-119, 2012.
- 152 MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, United Kingdom: Pearson Prentice Hall, 2005.
- 153 OLIVEIRA, T. M. B. F.; Di Souza, L.; CASTRO, S. S. L. Dinâmica da série nitrogenada nas águas da bacia hidrográfica Apodi/Mossoró – RN – Brasil. **Eclética Química**, v. 34, p. 17-26, 2009.
- 154 Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation, and use of the detection limit. **Analyst**, v. 112, p. 199–204, 1987.
- 155 ICH-Q2B<sub>n</sub> - **Validations of analytical procedures: methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)**. Geneva, 1996.
- 156 ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensor, biosensor and their biomedical applications**, USA: Academic press, 2008.
- 157 YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; RIU, J.; PINGARRÓN, J. M.; RIUS, F. X. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 939-953, 2010.

- 
- 158 VASHIST, S. K.; ZHENG, D.; AL-RUBEAN, K.; LUONG, J. H. T.; SHEU, F. Advances in carbon nanotube based electrochemical sensor for bioanalytical applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 169-188, 2011.
- 159 FENG, W.; JI, P. Enzymes immobilized on carbon nanotube. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 889-895, 2011.
- 160 YIN, H.; ZHOU, Y.; XU, J.; AI, S.; CUI, L.; ZHU, L. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 144-150, 2010.
- 161 OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. **Talanta**, v. 106, p. 137-143, 2013.
- 162 GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Chichester: ELLIS HORWOOD LIMITED, 1985.
- 163 TORTOLINI, C.; FUSCO, M. D.; FRASCONI, M.; FAVERO, G.; MAZZEI, F. Laccase-polyazetidine prepolymer-MWCNT integrated system: Biochemical properties and application to analytical determination in real samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 301-307, 2010.
- 164 XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, p. 7608-7614, 1996.
- 165 MOUSTY, C.; VIEILLE, L.; COSNIER, S. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1733-1738, 2007.
- 166 LIU, Y.; QU, X.; GUO, H.; CHEN, H.; LIU, B.; DONG, S. Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 2195-2201, 2006.
- 167 SCHELLER, F.; SCHUBERT, F. **Biosensors**. Amsterdam: Elsevier, 1982.
- 168 LAIDLER, K. J. **Chemical Kinetics**. New York: Harper Collins Publishers, 1987.
- 169 PILLAY, J.; OZOEMENA, K. I. Electrochemical properties of surface-confined films of single-walled carbon nanotubes functionalised with cobalto(II) tetra-aminophthalocyanine: Electrocatalysis of sulfhydryl degradation products of V-type nerve agents. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 2630-3640, 2007.

- 
- 170 GAMERO, M.; PARIENTE, F.; LORENZO, E.; ALONSO, C. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2038-2044, 2010.
- 171 CESARINO, I.; MORAES, F. C.; MACHADO, S. A. S. A Biosensor based on polyaniline-carbon nanotube core-shell for electrochemical detection of pesticides. **Electroanalysis**, v. 23, p. 2586-2593, 2011.
- 172 SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V.; KHOHLOV, P. S.; GAZARYAN, I. G.; YAROLOV, A. I. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators, **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 16-24, 2006.
- 173 FERNANÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.
- 174 ARDHAOU, M.; ZHENG, M.; PULPYTEL, J.; DOWLING, D.; JOLIVALT, C.; KHONSARI, F. A. Plasma functionalized carbon electrode for laccase-catalyzed oxygen reduction by direct electron transfer. **Bioelectrochemistry**, v. 91, p. 52-61, 2013.
- 175 JENKINS, P.; TUURALA, S.; VAARI, A.; VALKIAINEN, M.; SMOLANDER, M.; LEECH, D. A comparison of glucose oxidase and aldose dehydrogenase as mediated anodes in printed glucose/oxygen enzymatic fuel cells using ABTS/laccase cathodes. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 172-177, 2012.
- 176 CARDOSO, F. P.; NETO, S. A.; CREPALDI, L. B.; NIKOLAOU, S.; BARROS, V. P.; DE ANDRADE, A. R. Biocathodes for enzymatic biofuel cells using laccase and different redox mediators entrapped in polypyrrole matrix. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 161, p. 445-450, 2014.
- 177 DU, D.; CHEN, S.; CAI, J.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 130-134, 2007.
- 178 DU, D.; HUANG, X.; CAI, J.; ZHANG, A. Amperometric detection of triazophos pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on multiwall carbon nanotube-chitosan matrix. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 127, p.531-535, 2007.
- 179 GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2285-2288, 2009.
- 180 QU, Y.; SUN, Q.; XIAO, F.; SHI, G.; JIN, L. Layer-by-Layer self-assembled acetylcholinesterase/PAMAM-Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 139-144, 2010.

- 
- 181 WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite. **Analytica Chimica Acta**, v. 695, p. 84-88, 2011.
- 182 ZHOU, Q.; YANG, L.; WANG, G.; YANG, Y.; Acetylcholinesterase biosensor based on SnO<sub>2</sub> nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modied electrode for detection of pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 25-31, 2013.
- 183 FIRDOZ, S.; MA, F.; YUE, X.; DAI, Z.; KUMAR, A.; JIANG, B. A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water. **Talanta**, v. 83, p. 269-273, 2010.
- 184 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 142029**: Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos. 2005.
- 185 SUN, J.; LU, H.; LIN, H.; DU, L.; HUANG, W.; LI, H.; CUI, T. Electrochemical oxidation of aqueous phenol at low concentration using Ti/BDD electrode. **Separation and Purification Technology**, v. 88, p. 116–120, 2012.
- 186 BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. parte I. histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, p. 317-325, 2005.
- 187 PORTELA, R. R.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; JULIÃO, M. S.; LINHARES-JUNIOR, G.; LIMA, J. E. S. Square wave voltammetric determination of nitrofurantoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents. **Talanta**, v. 80, p. 1730-1736, 2010.
- 188 JIA, F.; BAI, Y.; QU, F.; ZHAO, J.; ZHUANG, C.; JIANG, X. Effect of B/C ratio on the physical properties of highly boron-doped diamond films. **Vacuum**, v. 84, p. 930-934, 2010.
- 189 O’DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 345, p. 287-301, 1993.
- 190 MORAL, A.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Supramolecular solvent-based extraction of benzimidazolic fungicides from natural waters prior to their liquid chromatographic/fluorimetric determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3740-3745, 2009.
- 191 ASENSIO-RAMOS, M.;HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4808-4816, 2011.

- 
- 192 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Analytical Chemistry: an Introduction**, 7. ed. USA: Brooks/Cole, 2000.
- 193 SLUGGETT, G. W.; STONG, J. D.; ADAMS, J. H.; Zhao, Z. Omeprazole determination using HPLC with coulometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 357-361, 2001.
- 194 ERK, N. Differential pulse anodic voltammetric determination of pantoprazole in pharmaceutical dosage forms and human plasma using glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 323, p. 48-53, 2003.
- 195 RADI, A.; EL-GRANY, N. A.; WAHDAN, T. Voltammetric behaviour of rabeprazole at a glassy carbon electrode and its determination in tablet dosage form. **II Farmaco**, v. 59, p. 515-518, 2004.
- 196 FRANÇA, R. F.; OLIVEIRA, H. P. M.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L. Electroanalytical determination of carbendazim and fenamiphos in natural waters using a diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 27-28, p. 54-59, 2012.
- 197 GOSSER, JR. K. D. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**, New York: UCH Publishers, 1993.
- 198 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações**, Coimbra: Livraria Almedina, 1996.
- 199 DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 790-797, 2004.
- 200 KOMORSKI-LOVRIĆ, S.; LOVRIĆ, M. Square-wave voltammetry of quasi-reversible surface redox reactions. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 384, p. 115-122, 1995.
- 201 ÖZALP-YAMAN, Ş.; ÖNAL, A. M.; TÜRKER, L. Electrochemical and quantum chemical studies on mitomycin and Adriamycin. **Journal of Molecular Structure**, v. 654, p. 81-93, 2003.
- 202 TOLEDO, R. A.; MAZO, L. H.; SANTOS, M. C.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, v. 28, p. 456-461, 2005.
- 203 STEVIĆ, M. C.; IGNJATOVIĆ, L. M.; CRIC-MARJANOVIĆ, G.; MARJANOVIĆ, B.; BAREK, J.; ZIMA, J. Electrochemical oxidation of 6-hydroxyquinoline on a glassy carbon paste electrode: voltammetric and computational study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 677, p. 69-77, 2012.

- 
- 204 OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P. R.; NASCIMENTO, J. M.; SOARES, J. E. S.; FREIRE, V. N.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Direct electrochemical analysis of dexamethasone endocrine disruptor in raw natural waters. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 110-119, 2012.
- 205 RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; SILVA, F. L. F.; MENDONÇA, G. L. F.; HOMEM-DE-MELLO, P.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; FREIRE, V. N. Sensitive voltammetric responses and mechanistic insights into the determination of residue levels of endosulfan in fresh foodstuffs and raw natural waters. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 40-47, 2013.
- 206 MÜLLIKEN, R. S. Electronic population analysis on LCAO–MO molecular wave functions. I. **The Journal of Chemical Physics**, v. 23, p. 1833-1840, 1955.
- 207 LUCAS, F. W. S.; NASCIMENTO, J. M.; FREIRE, V. F.; CAMELO, A. L. M.; LONGHINOTTI, E.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Dimethomorph electrooxidation: Analytical determination in grape-derived samples and mechanistic aspects. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 350-357, 2013.
- 208 NOEL, M.; VASU, K. I. **Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry**. London: Aspect Publications Ltd., 1990.
- 209 RADOVAN, C.; MANEA, F. Determination of sodium diethyldithiocarbamate in water by anodic voltammetry using a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 19, p. 91-95, 2007.
- 210 MELO, L. C.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Sensitive Determination of the diquat herbicide in fresh food samples on a highly boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 21, p. 2502-2510, 2010.
- 211 PEREIRA, G. P.; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. Electrochemical determination of bisfenol A using a boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 82, p. 3-8, 2012.
- 212 ŠVORC, L.; SOCHR, J.; RIEVAJ, M.; TOMCIK, P.; BUSTIN, D. Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 36-41, 2012.
- 213 AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SADEÑO, PINGARRÓN, J. M. Role of carbon nanotube in electroanalytical chemistry a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 11-47, 2008.
- 214 JACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, B. J. Review: carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 105-127, 2010.

- 
- 215 PÉREZ-LOPES, B.; MERKOÇI, A. Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. **Microchimica Acta**, v. 179, p. 1-16, 2012.
- 216 GONG, K.; DONG, Y.; XIONG, S.; CHEN, Y.; MAO, L. Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 253-259, 2004.
- 217 ZUO, X.; ZHANG, L.; LI, N. Na electrochemical biosensor for determination of ascorbic acid by cobalto (II) phthalocyanine-multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, p. 1074-1079, 2012.
- 218 APETREI, I. M.; RODRIGUES-MENDEZ, M. L.; APETREI, C.; SAJA, J. A. Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalto(II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 138-144, 2013.
- 219 HONG, X.; MA, J. Electrochemical study of sulfadiazine on a novel phthalocyanine-containing chemically modified electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 329-331, 2013.
- 220 ZAGAL, J. H.; GRIVEAU, S.; SILVA, J. F.; NYOKONG, T.; BEDIQUI, F. Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 2755-2791, 2010.
- 221 WAEL, K. D.; ADRIAENS, A. Comparison between the electrocatalytic properties of different metal ion phthalocyanines and porphyrins towards the oxidation of hydroxide. **Talanta**, v. 74, p. 1562-1567, 2008.
- 222 FILHO, A. G. S.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, p. 1695-1703, 2007.
- 223 MORAES, F. C.; CABRAL, M. F.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. **Surface Science**, v. 605, p. 435-440, 2011.
- 224 BANIMUSLEM, H.; HASSAN, A.; BASOVA, T.; GÜLMEZ, A. D.; TUNCEL, S.; DURMUŞ, M.; GÜREK, A. G.; AHSEN, V. Copper phthalocyanine/single walled carbon nanotubes hybrid thin films for pentachlorophenol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 990-998, 2014.
- 225 VINAYAN, B. P.; JAFFRI, R. I.; NAGAR, R.; RAJALAKSHMI, N.; SETHUPATHI, K.; RAMAPRABHU, S. Catalytic activity of platinum-cobalt alloy nanoparticles decorated functionalized multiwalled carbon nanotubes for oxygen reduction reaction in PEMFC. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 412-421, 2012.

- 
- 226 VERMA, A. I.; SAXENA, S.; SAINI, G. S. S.; GAUR, V.; JAIN, V. K. Hydrogen peroxide vapor sensor using metal-phthalocyanine functionalized carbon nanotube. **Thin Solid Films**, v. 519, p. 8144-8148, 2011.
- 227 LI, H.; XU, Z.; LI, K.; HOU, X.; CAO, G.; ZHANG, Q.; CAO, Z. Modification of multi-walled carbon nanotube with cobalto phthalocyanine: effects of the templates on the assemblies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 1181-1186, 2011.
- 228 LUO, P.; LIU, J.; MIAO, Y.; YE, B. Voltammetric determination of methylparaban in cosmetics using a multi-wall carbon nanotube/nafion composite modified glassy carbon electrode. **Analytical Letters**, v. 45, p. 2445-2454, 2012.
- 229 BI, H.; LI, Y.; LIU, S.; GUO, P.; WEI, Z.; LV, C.; ZHANG, J.; ZHAO, X. S. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid: The effect of functional groups. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 171-172, p. 1132-1140, 2012.
- 230 CARRISE, O. **Fungicides**. Rijeka: InTech, 2010.
- 231 MELO, C. M.; SALAZAR-BANDA, G. R.; MACHADO, S. A. S.; DE LIMA-NETO, P.; DE SOUZA, D.; CORREIA, A. N. A simple and sensitive detection of diquat herbicide using a dental amalgam electrode: A comparison using the chromatographic technique. **Talanta**, v. 79, p. 1216-1222, 2009.
- 232 OLIVEIRA, T. M. B. F.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Carbon-fibre microelectrodes coupled with square-wave voltammetry for the direct analysis of dimethomorph fungicide in natural waters. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 84-92, 2013.
- 233 GARCIA, L. L. C.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; OLIVEIRA, G. G.; FATIBELLO-FILHO, O.; BANKS, C. E. Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 306-311, 2013.
- 234 FERNANDES, S. F.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Methomyl detection by inhibition of laccase using a carbon ceramic biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1623-1630, 2011.
- 235 LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: Synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **Analyst**, v.134, p. 1965-1979, 2009.
- 236 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methodos Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.

- 
- 237 BATLEY, G. E.; AFGAN, B. K. Voltammetric Analysis of some carbamate pesticides. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 125, p. 437-445, 1981.
- 238 SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. O Cultivo e o Mercado da Uva. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/O-cultivo-e-o-mercado-da-uva>>. Acesso em: 17 jun. 2014.
- 239 MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, 2010.
- 240 BENERJEE, K.; OULKAR, D. P.; DASGUPTA, S.; PATIL, S. B.; PATIL, S. H.; SAVANT, R.; ADSULE, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 98-109, 2007.
- 241 DORNELLAS, R. M.; FRANCHINI, R. A. A.; DA SILVA, A. R.; MATOS, R. C.; AUCELIO, R. Q. Determination of the fungicide kresoxim-methyl in grape juices using square-wave voltammetry and a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 46-53, 2013.
- 242 AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; ARANHA, H. O. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.
- 243 MIRČSKI, V.; LOVRIC, M.; JORDANOSKI, B. Redox kinetics measurements of probucol using square-wave voltammetry. **Electroanalysis**, v. 11, p. 660-663, 1999.
- 244 MARCHIANDO, N. C.; ZÓN, M. A.; FERNÁNDEZ, H. Characterization of the surface redox process of adsorbed cercosporin (CER) at glassy carbon electrodes by anodic stripping square-wave voltammetry. **Electroanalysis**, v. 15, p. 40-47, 2003.
- 245 LOVRIC, M.; JADREŠCO, D. Theory of square-wave voltammetry of quasireversible electrode reactions using an inverse scan direction. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 948-951, 2010.
- 246 PARK, B.; YOON, D.; KIM, D. Formation and modification of a binary self-assembled monolayer on a nano-structured gold electrode and its structural characterization by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 661, p. 329-335, 2011.
- 247 SANZ, V. C.; MENA, M. L.; GONZÁLEZ-CORTÉZ, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PIGARRÓN, J. M. Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, p. 1-8, 2005.

- 
- 248 HUO, Z.; ZHOU, Y.; LIU, Q.; HE, X.; LIANG, Y.; XU, M. Sensitive simultaneous determination of catechol and hydroquinone using a gold electrode modified with carbon nanofibers and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 119-125, 2011.
- 249 YAPOLOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VASTANOV, S. S.; VARFOLOMEYEV. laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, p. 257-280, 1994.
- 250 FRANZOI, A. C.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta**, v. 77, p. 1322-1327, 2009.
- 251 XU, X.; GUO, M.; LU, P.; WANG, R. Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, p. 722-729, 2010.
- 252 SHIMOMURA, T.; ITOH, T.; SUMIYA, T.; HANAOKA, T.; MIZUKAMI, F.; ONO, M. Amperometric detection of phenolic compounds with enzyme immobilized in mesoporous silica prepared by electrophoretic deposition. **Sensors and Actuators B**, v. 153, p. 361-368, 2011.
- 253 HAGHIGHI, B.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; JÖNSSON, L. J. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *trametes vesicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, p. 3-14, 2003.
- 254 FUSCO, M. D.; TORTOLINI, C.; DERIU, D.; MEZZEI, F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta**, v. 81, p. 235-240, 2010.
- 255 GIL, D. M. A.; RABELO, M. J. F. Gallic acid interference on polyphenolic amperometric biosensing using *Trametes versicolor* laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 193-198, 2011.
- 256 GOMES, S. A. S. S.; RABELO, M. J. F. A new laccase biosensor for polyphenol determination. **Sensors**, v. 3, p. 166-175, 2003.
- 257 FRANZOI, A. C.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid for the determination of rutin. **Analytica Chimica Acta**, v. 639, p. 90-95, 2009.
- 258 ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, p. 331-339, 2011.

- 
- 259 JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Amperometric detection of mono- and diphenols at cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. **Talanta**, v. 66, p. 1219-1224, 2005.
- 260 ZHANG, X.; WANG, S.; SHEN, Q. The Electrochemical behavior of p-aminophenol at a  $\omega$ -mercaptopropionic acid self-assembled gold electrode. **Microchimica Acta**, v. 149, p. 37-42, 2005.
- 261 YIN, H.; MA, Q.; ZHOU, Y.; AI, S.; ZHU, L. Electrochemical behavior and voltammetric determination of 4-aminophenol based on graphene-chitosan composite film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 7102-7108, 2010.
- 262 TORTOLINE, C.; REA, S.; CAROTA, E.; CANNISTRARO, S.; MAZZEI, F. Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of Trametes versicolor laccase based bioelectrode. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 8-13, 2012.
- 263 PANG, H. L.; LIU, J.; ZHANG, X. H.; CHEN, J. H. Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 6611-6616, 2010.
- 264 XU, X.; GUO, M.; LU, PING, WANG, R. Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 722-729, 2010.
- 265 PITA, M. T. P.; REVIEJO, A. J.; VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. Amperometric selective biosensing of dimethyl- and diethyldithiocarbamates based on inhibition processes in a medium of reversed micelles. **Analytica Chimica Acta**, v. 340, p. 89-97, 1997.
- 266 WANG, J.; NASCIMENTO, V. B.; KANE, S. A.; ROGERS, K.; SMYTH, M. R.; AGNES, L. Screen-printed tyrosinase-containing electrodes for the biosensing of enzyme inhibitors. **Talanta**, v. 43, p. 1903-1907, 1996.
- 267 WANG, X.; CHEN, L.; XIA, S.; ZHU, Z.; ZHAO, J.; CHOVELON, J.; RENAUL, N. J. Tyrosinase Biosensor Based on Interdigitated electrodes for herbicides determination. **Internation Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 55-61, 2006.
- 268 MOCCELINE, S. K.; VIEIRA, I. C.; LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 82, p. 164-170, 2010.

- 
- 269 LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.; MOCCELINE, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRRA, I. C. Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 153-158, 2010.

---

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### ARTIGOS:

RIBEIRO, F. W. P.; CARDOSO, A. S.; PORTELA, R. R.; LIMA, J.E.S.; S., S.A.; DE LIMA-NETO, P.; DE SOUZA, D.; CORREIA, A.N. Electroanalytical Determination of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations on Highly Boron-Doped Diamond Electrodes Using Square-Wave Adsorptive Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, p. 2021-2039, 2008.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Square-wave adsorptive voltammetry of dexamethasone: Redox mechanism, kinetic properties, and electroanalytical determinations in multicomponent formulations. **Analytical Biochemistry**, v.413, p. 148-156, 2011.

RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D. ; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Electrochemical mechanism and kinetics studies of haloperidol and its assay in commercial formulations. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 2036-2044, 2011.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; NASCIMENTO, J. M.; SOARES, J. E. S.; FREIRE, V. N.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Direct Electrochemical Analysis of Dexamethasone Endocrine Disruptor in Raw Natural Waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 110-119, 2012.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, S. N.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; MASCARO, L. H.; MATOS, R.; SOUZA, E. C. P.; LANZA, M. R. V. Eletrodegradação de Ponceau 2R utilizando ânodos dimensionalmente estáveis e Ti/Pt. **Química Nova**, v. 36, p. 85-90, 2013.

SANDRINO, B.; CLEMENTE, C. S.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; PAVINATTO, F. J.; MAZZETTO, S. E.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; PESSOA, C. A.; WOHNATH, K. Amphiphilic porphyrincardanol derivatives in Langmuir and Langmuir Blodgett films applied for sensing. **Colloids and Surfaces. A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 425, p. 68, 2013.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; DA SILVA, F. L. F.; MENDONÇA, G. L. F.; HOMEM-DE-MELLO, P.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; FREIRE, V. N. Sensitive voltammetric responses and mechanistic insights into the determination of residue levels of endosulfan in fresh foodstuffs and raw natural waters. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 40-47, 2013.

RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, T. R. V.; OLIVEIRA, S. N.; MELO, L. C.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Analytical determination of nimesulide and ofloxacin in pharmaceutical preparations using square-wave voltammetry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, p. 67-76, 2014.

---

RIBEIRO, F. W. P.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; VISWANATHAN, S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. **Bioelectrochemistry**, v. 95, p. 7-14, 2014.

RIBEIRO, F. W. P.; MENDONÇA, G. L. F.; SOARES, J. E. S.; FREIRE, V. N.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Exploiting the Reduction of Haloperidol: Electrochemical and Computational Studies Using Silver Amalgam and HMDE Electrodes. **Electrochimica Acta**, v.137, p. 564-574, 2014.

### **RESUMOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS:**

CARDOSO, A. S.; RIBEIRO, F. W. P.; PORTELA, R. R.; BRITO, E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação Eletroanalítica de Ácido Gálico Utilizando Voltametria de Onda Quadrada. In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa - PB.

RIBEIRO, F. W. P.; CARDOSO, A. S.; PORTELA, R. R.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; DE SOUZA, D.; CORREIA, A. N. Metodologia Eletroanalítica para Determinação de Prometazina (PMZ) em Medicamentos Utilizando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP.

CARDOSO, A. S.; RIBEIRO, F. W. P.; LIMA, J. E. S.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação Eletroanalítica de Sabutamol Sobre Eletrodo de Diamante Dopado de Boro Utilizando Voltametria de Onda Quadrada. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP.

RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Metodologia Eletroanalítica para Determinação de Haloperidol em Formulações Comerciais. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE.

RIBEIRO, F. W. P.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Estudos Eletroanalíticos para a Redução de Dexametazona. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza-CE.

FORTE, C. M. S.; RIBEIRO, F. W. P.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Comportamento Eletroquímico do Antibiótico Cefalexina. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza-CE.

OLIVEIRA, S. N.; RIBEIRO, F. W. P.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Estudo Eletroquímico da Ofloxacina. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza-CE.

---

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, S. N.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Voltametria de Onda Quadrada como Ferramenta para a Determinação Eletroanalítica de Ofloxacina. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP.

OLIVEIRA, S. N.; RIBEIRO, F. W. P.; LIMA, J. E. S.; SUFFREDINI, H. B.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro na Determinação Voltamétrica de Imipramina em Formulação Comercial. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP.

SOARES, T. R. V.; RIBEIRO, F. W. P.; MELO, L. C.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação Eletroanalítica de Nimesulida em Formulação Comercial. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP.

SOARES, T. R. V.; MELO, L. C.; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; LIMA, J. E. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação eletroanalítica de Nimesulida em formulações comerciais. In: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2010, Alcalá de Henares-Espanha.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, S. N.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Estudo Eletroquímico da Ofloxacina e sua Determinação em Formulações Farmacêuticas. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves-RS.

RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Estudo Eletroquímico do Mecanismo de Redução do Haloperidol Sobre Diferentes Superfícies Eletródicas. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves-RS.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, S. N.; MASCARO, L. H.; SOUZA, H. C. P.; LANZA, M. R. V.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Degradação Eletroquímica do Corante PONCEAU 2R. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves-RS.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Análise Direta de Traços de Dexametasona em Águas Naturais Superficiais Utilizadas no Abastecimento Público do Estado do Ceará: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves-RS.

RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E. S.; BECKER, H.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação eletroanalítica de haloperidol empregando eletrodos sólidos de amálgama de prata. In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão-SP.

---

MELO, L. C.; RIBEIRO, F. W. P.; DE LIMA-NETO, P.; DE SOUZA, D.; CORREIA, A. N. Determinação Eletroanalítica de Clorpirifós por Voltametria de Onda Quadrada. In: 16<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão-SP.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; SILVA, F. L. F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação eletroanalítica de endossulfam em amostras in natura de cana-de-açúcar e tomate. In: 16<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão-SP.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Estudo voltamétrico e determinação eletroanalítica do esteróide dexametasona em formulações farmacêuticas e em águas naturais. In: Primeiro Encontro Regional de Química (I ERQ), 2011, Mossoró - RN.

RIBEIRO, F. W. P.; MORAIS, S.; BARROSO, M. F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Electrochemical biosensor for carbamate pesticides detection. In: 5<sup>o</sup> Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto, 2012, Porto-Portugal.

RIBEIRO, F. W. P.; MORAIS, S.; BARROSO, M. F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. Laccase based biosensor for formetanate hydrochloride determination. In: XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2012, Fortaleza-CE

RIBEIRO, F. W. P.; CORREIA, A. N.; MORAIS, S.; VISWANATHAN, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C. Biosensor for Residue Analysis of Formetanate Hydrochloride Pesticide in Fruits. In: 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga - República Tcheca.

CORREIA, A. N.; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P. Determination of thiabendazole in complex samples using cobalt(II) phthalocyanine-multi-walled carbon nanotube modified electrode. In: Elecnano 5, 2013, Bordeaux-França.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; MENDONÇA, G. L. F.; SILVA, F. L. F.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Mecanismo de redução e determinação eletroanalítica de endossulfam em amostras de águas naturais. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão-SP

RIBEIRO, F. W. P.; ANDRADE, P. G. C.; LONGHINOTTI, E.; BECKER, H.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Oxidação de tiabendazol: aspectos mecanísticos e determinação eletroanalítica em amostras de águas naturais. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão-SP.

---

FIGUEREDO-SOBRINHO, F. A. A.; LUCAS, F. W. S.; RIBEIRO, F. W. P.; ANDRADE, P. G. C.; LONGHINOTTI, E.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Degradação eletroquímica do fungicida propamocarbe usando eletrodo de beta-PbO<sub>2</sub>-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão-SP.

RIBEIRO, F. W. P.; MENDONÇA, G. L. F.; SOARES, J. E. S.; FREIRE, V. N.; DE SOUZA, D.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Eletrodos sólidos de amalgama de prata no estudo eletroquímico e computacional do fármaco haloperidol. In: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2014, La Serena-Chile.

MENDONÇA, G. L. F.; RIBEIRO, F. W. P.; LUCAS, F. W. S.; MASCARO, L.H.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Interação ente tiabendazol e eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ftalocianina de cobalto empregando ferramentas eletroquímicas e computacionais. In: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2014, La Serena-Chile.

RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, A. G.; NASCIMENTO, R. F.; LUCAS, F. W. S.; MASCARO, L. H.; CASCIANO, P. N. S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Determinação analítica do pesticida tiabendazol: estudo comparativo entre voltametria de onda quadrada e cromatografia líquida. In: 37<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal-RN.

OLIVEIRA, D. P. C.; RIBEIRO, F. W. P.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Desenvolvimento de biossensor enzimático para a determinação de fenol em efluente. In: 37<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal-RN.

ARAGÃO, J. S.; OLIVEIRA, D. P. C.; RIBEIRO, F. W. P.; CORREIA, A. N.; DE LIMA-NETO, P. Desenvolvimento de um biossensor baseado na enzima tirosinase para determinação do hormônio dietilestilbestrol. In: 37<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal-RN.