



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

**THIAGO MIELLE BRITO FERREIRA OLIVEIRA**

**BIOSENSORES ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE**  
**CARBAMATOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS**

**FORTALEZA**

**2013**

THIAGO MIELLE BRITO FERREIRA OLIVEIRA

**BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
CARBAMATOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS**

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

Coorientadora: Profa. Dra. Simone Barreira Morais

FORTALEZA

2013

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

- 
- O52b Oliveira, Thiago Mielle Brito Ferreira.  
Biossensores enzimáticos para detecção e quantificação de carbamatos em amostrar de alimentos /  
Thiago Mielle Brito Ferreira Oliveira. – 2013.  
131 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de  
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza,  
2013.  
Área de Concentração: Química Analítica.  
Orientação: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia.  
Coorientação: Profa. Dra. Simone Barreira Moraes.
1. Carbamatos. 2. Polifenoloxidasas 3. Nanomateriais. 4. Filmes condutores. 5. Biossensores.  
I. Título.

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

*Thiago Mielle Brito Ferreira Oliveira*  
**Thiago Mielle Brito Ferreira Oliveira**

Tese aprovada em: **10/12/2013**

*Adriana Nunes Correia*  
\_\_\_\_\_  
Dra. Adriana Nunes Correia  
(Orientador - UFC)

*Helena Becker*  
\_\_\_\_\_  
Dra. Helena Becker  
(UFC)

*Luiz Henrique Dall'Antonia*  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia  
(UEL)

*Orlando Fatibello Filho*  
\_\_\_\_\_  
Dr. Orlando Fatibello Filho  
(UFSCar)

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

À minha esposa, Jaisna, e ao meu filho, Heitor Dimitri, pelos sorrisos, abraços, amor, carinho e companheirismo ao longo dessa jornada, mesmo quando não pude retribuir à altura.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas maravilhas e graças que tem me proporcionado, por ouvir minhas preces e ser meu aliado em todas as batalhas. Aos que se opuseram, fica a lição... *“as portas que Ele abre para mim ninguém pode fechar”!*

À minha família, em especial, à minha mãe, meu exemplo de vida e porto seguro. Foi com a senhora que aprendi a transformar as dificuldades em pontes para ir mais longe, a nunca desistir dos meus objetivos, a entender que sonhar é direito de todos, mas poucos são aqueles que se disponibilizam a pagar o ônus para concretizá-los.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) que, por meio do Programa de Pós-Graduação em Química, contribuiu para o meu crescimento profissional, intelectual e humano.

À Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), pelo suporte financeiro e por conceder a liberação das minhas atividades como técnico de laboratório, para me dedicar aos estudos de doutorado acadêmico no Brasil e doutorado sanduíche em Portugal.

Ao colegiado do Departamento de Química da UERN, por concordar com minha liberação e contribuir para a continuação da minha formação acadêmica.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e à Universidade do Porto (UP), pela infraestrutura disponibilizada para a consolidação do meu trabalho de tese, desenvolvido em Porto - Portugal, durante o doutorado sanduíche.

Aos órgãos de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) e FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia - Portugal) que, por meio do Projeto CAPES/FCT nº 313/11, permitiram o desenvolvimento das minhas pesquisas, na modalidade doutorado sanduíche, nas dependências do ISEP e da UP.

À minha orientadora no Brasil, Profa. Adriana Nunes Correia, pela amizade, solidariedade e compreensão, pelas novas oportunidades e parcerias estabelecidas e, acima de tudo, pela inestimável contribuição à minha formação acadêmica e humana. Foram tantas oportunidades e

experiências, tantos trabalhos e discussões relevantes, que não seria possível contemplar em um único trabalho de tese. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Pedro de Lima-Neto, pelos ensinamentos, contribuições, críticas e constante incentivo ao meu crescimento profissional. Pelas várias oportunidades e credibilidade para desenvolver tantos trabalhos ao longo do meu processo de doutoramento. Ficam aqui registradas minha admiração e gratidão!

Aos demais membros que fizeram e/ou fazem parte do Grupo de Eletroquímica e Corrosão (GELCORR), em nome de Amanda Cardoso, DeJane de Oliveira, Vanessa Nascimento, Sandelir Dias, Luisa Célia Pacheco, Cristiane Forte, Othon Campos, Roger Gomes, Luanna Neves, Leandro Mendonça, Jefferson do Nascimento, Allan Dantas, Sâmeque Oliveira e todos os outros que, na medida do possível, me ajudaram em tudo o que precisei ao longo desses anos. Agradeço em especial aos meus grandes amigos Francisco Wirley Paulino Ribeiro, Rafael Ribeiro Portela e Paulo Naftali da Silva Casciano, pelas discussões, críticas e apoio constante em todos os trabalhos que desenvolvi. A gente vai mais longe quando trabalha em conjunto!

A todos do Grupo de Reações de Análises Químicas (GRAQ), em especial, à minha orientadora em Portugal, Profa. Simone Barreira Morais, pela credibilidade, amizade e ensinamentos que ainda perduram. Meu respeito e admiração por ti só aumentam desde que retornei ao Brasil.

Também não poderia esquecer as Profas. Cristina Delerue-Matos, Maria Beatriz Oliveira e Cristina Freire, bem como à pós-doutoranda Maria de Fátima Barroso, que prestaram grande contribuição ao desenvolvimento e aprimoramento das minhas pesquisas.

Aos amigos do GRAQ em Portugal (Marta Oliveira, Filipa Gomes, Paula Paíga, Pedro Carneiro, Idalina Bragança, Luisa Correia-Sá, Hélder da Silva, Maria Freitas, Virgínia Fernandes e Suzana Machado), França (Clair Vanbecelaere), Bélgica (Thomas van der Have), República Tcheca (Klara Slezakova) e Paraguai (José Luiz Vera), por todo o apoio, amizade e contribuição direta e indireta para a concretização deste feito.

Às Profas. Helena Becker, Elisane Longhinotti e Selma Elaine Mazetto, docentes e pesquisadoras permanentes do Programa de Pós-Graduação em Química da UFC, e à Profa Suely Castro,

docente da UERN, pelas críticas e sugestões aos meus trabalhos, bem como pelas novas parcerias estabelecidas.

À Profa. Djenane de Souza, docente da Universidade Federal de Uberlândia, campos de Patos de Minas, pela amizade, incentivo, apoio e grande contribuição aos meus trabalhos de doutorado.

Aos Profs. Karen Wohnrath, Jarem Garcia e Christiana Pessoa, docentes da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela nova parceria estabelecida e conhecimentos acrescentados, por meio do Programa CAPES/PROCAD-NF nº 2424/2008 e Rede nBioNet.

Enfim, a todas as pessoas que tenham contribuído de qualquer forma para avançar com este novo passo em minha carreira profissional.

*“Não se mede o valor de um homem pelas suas roupas ou pelos bens que possui, o verdadeiro valor do homem é o seu caráter, suas ideias e a nobreza dos seus ideais”.*

Charles Chaplin



*“Antes de julgar a minha vida ou o meu caráter... calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei e levante-se assim como eu fiz. E então, só aí poderás julgar. Cada um tem a sua própria história. Não compare a sua vida com a dos outros. Você não sabe como foi o caminho que eles tiveram que trilhar na vida”.*

Clarice Lispector

## RESUMO

Este trabalho contempla três estratégias para o biossensoriamento de pesticidas da classe dos carbamatos (CBM) em alimentos naturais, utilizando biossensores à base de polifenoloxidasas como dispositivos analíticos: (i) eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (EPNC) modificado com lacase de *Trametes versicolor* (LAC) por *entrapment* da enzima diretamente no material compósito, definido como LAC-EPNC; (ii) eletrodo de pasta de grafeno (EPG) modificado com filmes de Azul da Prússia (AP), seguido da imobilização de LAC por *drop coating*, definido como LAC/AP/EPG; e (iii) EPG modificado por eletrodeposição de filme híbrido composto por quitosana (CS), nanopartículas de ouro (NpAu) e mistura das enzimas LAC e tirosinase de *Agaricus bisporus* (TIR), definido como LAC-TIR-NpAu-CS/EPG. Tomado por base o processo redox do substrato 4-aminofenol (4-AMF), a presença dos nanotubos de carbono e do grafeno proporcionou uma série de vantagens aos dispositivos, a saber: aumento nos valores de corrente de pico, catálise do processo redox, melhoria na reversibilidade e, conseqüentemente, na cinética de transferência eletrônica. Filmes de AP (imobilização direta da enzima sem a necessidade de regente para *cross-linking*), CS (biocompatibilidade adequada, maior imobilização e fixação das enzimas) e NpAu (redução da resistência a transferência de carga) também apresentaram importante papel na configuração eletródica dos biossensores. As curvas analíticas foram construídas por voltametria de onda quadrada, baseando-se na capacidade dos CBM (carbofurano, carbaril, formetanato, pirimicarbe, propoxur e ziram) de inibir a atividade das polifenoloxidasas. Em geral, os procedimentos propostos apresentaram sensibilidade (limites de detecção variando de 0,001 a 0,093 mg kg<sup>-1</sup>) que contempla os limites máximos estabelecidos pelas agências de segurança e controle alimentar brasileira e europeia para resíduos de CBM em hortaliças (tomate, alface e batata) e frutas cítricas (laranja, tangerina e limão), com baixo nível de interferentes. Os ensaios de recuperação foram realizados em extratos QuEChERS das amostras, com porcentagens de recuperação variando de 91,0 ± 0,1% a 101,10 ± 0,1%; para contaminações de 0,01 a 3,14 mg kg<sup>-1</sup>. Portanto, LAC-EPNC, LAC/AP/EPG e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG podem ser ferramentas promissoras na análise de CBM em matrizes alimentares.

**Palavras-chave:** Carbamatos. Polifenoloxidasas. Nanomateriais. Filmes condutores. Biossensores enzimáticos.

## ABSTRACT

This work contemplates three strategies for carbamate pesticides (CBM) biosensing in natural food, using polyphenoloxidases based biosensors as analytical device: (i) carbon nanotubes paste electrode (CNPE) modified with laccase from *Trametes versicolor* (LACC), namely as LACC-CNPE; (ii) graphene paste electrode (GPE) modified with Prussian Blue films (PB), followed by the LACC immobilization by drop coating, namely as LACC/PB/GPE; and (iii) GPE modified by the electrodeposition of a hybrid film composed for chitosan (CS), gold nanoparticles (AuNp) and a mixing of LACC and tyrosinase from *Agaricus bisporus* (TYR), namely as LACC-TYR-AuNp-CS/GPE. Based on 4-aminophenol (4-AMP) redox process, the presence of carbon nanotubes and graphene allowed several advantages to the devices, such as: increase of the peak currents values, catalysis of the redox process, improvement of the reversibility and electronic-transfer kinetic. PB films (direct enzymatic immobilization without cross-linking reagent), CS (suitable biocompatibility, higher immobilization and fixation of the enzymes) and AuNp (reduction of the charge-transfer resistance) also showed important role on biosensors electrodic configuration. Analytical curves were constructed by square-wave voltammetry, based on CBM (carbofuran, carbaryl, formetanate, pirimicarb, propoxur and ziram) capability to inhibit the polyphenoloxidase activity. In general, the proposed procedures had sensitivity (detection limits ranging from 0.001 to 0.093 mg kg<sup>-1</sup>) in compliance with the maximum limit established by Brazilian and European food surveillance and control agencies for the analysis of CBM residues in vegetable crops (tomato, lettuce and potato) and citrus fruits (orange, tangerine and lemon), with negligent interfering effect. Recuperation experiments were carried out with QuEChERS extracts of the samples, allowing recuperation values from 91.0 ± 0.1% to 101.1 ± 0.1%; for spiking levels from 0.01 to 3.14 mg kg<sup>-1</sup>. Thus, LACC-CNPE, LACC/PB/GPE and LACC-TYR-AuNp-CS/GPE are promisor tools for CBM analysis in food matrices.

**Keywords:** Carbamates. Poliphenoloxidases. Nanomaterials. Conductor films. Enzymatic biosensors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação geral do mecanismo de atuação dos hormônios naturais e contaminantes exógenos em relação aos receptores hormonais .....	28
Figura 2 -	Estruturas químicas de diferentes ingredientes ativos do grupo dos <i>n</i> -metilcarbamatos .....	31
Figura 3 -	Voltamogramas cíclicos de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> obtido sobre eletrodos compósitos de carbono contendo MWCNT/grafite/parafina% (m/m/m) nas proporções 0:60:40 (linha pontilhada), 30:30:40 (linha tracejada) e 60:0:40 (linha sólida), em meio de tampão BR pH 5,0 e com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....	65
Figura 4 -	Voltamogramas cíclicos para a oxidação de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> obtido sobre LAC-EPNC (3,0% de LAC <sub>(s)</sub> , m/m) a 50 mV s <sup>-1</sup> , em meio de tampão BR pH 5,0, com tempos de incubação de: 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 25 (f), 30 (g), 35 (h), 40 (i), 45 (k), 50 (j), 55 (l) e 60 (m) minutos .....	67
Figura 5 -	(A) Diagramas de Nyquist obtidos para os diferentes sensores, com faixa de frequência de 10 <sup>5</sup> a 10 <sup>-1</sup> Hz e amplitude de perturbação de 5,0 mV, utilizando 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como mediador redox em tampão BR pH 5,0, aplicando +0,20 V na ausência e -0,01 V na presença de LAC. (B) Imagem ampliada dos diagramas de Nyquist obtidos para os biossensores construídos com eletrodos compósitos de nanotubos de carbono .....	69
Figura 6 -	Relação entre as correntes de pico com a (■) concentração de LAC <sub>(s)</sub> e o (○) tempo de incubação, para o desenvolvimento do biossensor LAC-EPNC, obtida por voltametria cíclica a 50 mV s <sup>-1</sup> , utilizando 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em tampão BR pH 5,0 .....	71
Figura 7 -	Sequência reacional envolvida na oxidação de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato sobre LAC-EPNC (3%, m/m), em meio de tampão BR pH 5,0, para um tempo de incubação de 60 min .....	73

Figura 8 -	Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor LAC-EPNC para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) formetanato e (C) pirimicarbe, usando 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando $f = 50$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro .....	74
Figura 9 -	– Influência da provitamina A, vitamina B1, vitamina C e glicose no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando $f = 50$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV, para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 ( $n/n$ ) .....	79
Figura 10 -	Microscopia eletrônica de transmissão das folhas de grafeno, exibindo (A) forma e (B) espessura irregulares, em diferentes ampliações. (C) Espectro fotoeletrônico de raios-X indicando a composição da superfície das folhas de grafeno .....	80
Figura 11 -	Voltamogramas cíclicos de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> obtidos sobre eletrodo de pasta de grafite não modificado (linha vermelha) e na presença de diferentes porcentagens de grafeno (m/m, linhas pretas), a $50$ mV s <sup>-1</sup> em meio de tampão BR pH 5,0 .....	82
Figura 12 -	Voltamogramas cíclicos dos filmes de AP sobre EPG, com tempos de eletrodeposição de (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 30 e (f) 40 s, e ativados em solução equimolar ( $0,1$ mol L <sup>-1</sup> ) de KCl e de HCl, a $40$ mV s <sup>-1</sup> .....	83
Figura 13 -	Diagramas de Nyquist obtidos para redução de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> sobre AP/EPG, em meio de tampão BR pH 5,0, aplicando $+0,20$ V na faixa de frequência de $10^{-1}$ a $10^5$ Hz, com amplitude de perturbação de $5,0$ mV .....	84
Figura 14 -	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para redução de 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> sobre EPG (linha vermelha), AP/EPG (linha azul), LAC/EPG (linha verde) e LAC/AP/EPG (linha preta) em meio de tampão BR pH 5,0, empregando $f = 100$ s <sup>-1</sup> , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV .....	86

- Figura 15 - Diagramas de Nyquist obtidos para redução de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre EPG, AP/EPG, LAC/EPG e LAC/AP/EPG em meio de tampão BR pH 5,0, na faixa de frequência de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz, aplicando +0,20 V na ausência e -0,01 V na presença de LAC..... 87
- Figura 16 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos com biossensor LAC/AP/EPG para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) carbaril, (C) formetanato, (D) pirimicarbe e (E) ziram, usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV. As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro ..... 90
- Figura 17 - Influência da provitamina A, vitamina B1 e vitamina C no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV, para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 ( $n/n$ ) ..... 95
- Figura 18 - (A) Intensidade das correntes de pico obtidas para biossensores com diferentes proporções de LAC<sub>(s)</sub> e TIR<sub>(s)</sub> (m/m), usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato, em meio de tampão BR pH 5,5. (B) Comportamento eletroquímico de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre biossensores LAC-TIR/EPG (linha vermelha), LAC-TIR-CS/EPG (linha azul) e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG (linha preta), em tampão BR pH 5,5 ..... 97
- Figura 19 - Diagramas de Nyquist para (a) EPG, (b) CS/EPG, (c) NpAu-CS/EPG, (d) LAC-TIR-NpAu-CS/EPG, (e) LAC-TIR/EPG e (f) LAC-TIR-CS/EPG, obtidos na faixa de frequência de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz. Condições experimentais: 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de tampão BR pH 5,5, potencial de condicionamento de 0,2 V na ausência e -0,01 V na presença das enzimas. A inserção se refere ao comportamento geral observado pelo diagrama de Bode, para o processo redox do 4-AMF sobre as diferentes superfícies ..... 99

- Figura 20 - – Relações entre correntes de pico e pH para a reação catalítica de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 5,5, obtidas sobre LAC-NpAu-CS/EPG (quadrados), TIR-NpAu-CS/EPG (círculos) e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG (triângulos) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de incubação de 15 minutos ..... 100
- Figura 21 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos com biossensor LAC/AP/EPG para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) carbaril, (C) formetanato, (D) pirimicarbe e (E) ziram, usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro ..... 104
- Figura 22 - Influência da vitamina C, ácido cítrico e glicose no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 ( $n/n$ ) ..... 107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados nos experimentos e suas respectivas procedências .....	55
Tabela 2 - Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC-EPNC como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 60 minutos, 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, $f = 50$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV .....	76
Tabela 3 - Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de tomate e de alface, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC-EPNC como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 60 minutos, 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, $f = 50$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV .....	78
Tabela 4 - Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC/AP/EPG como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 30 minutos, 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, $f = 100$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV .....	89
Tabela 5 - Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de tomate e de batata, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC/AP/EPG como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 30 minutos, 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, $f = 100$ s <sup>-1</sup> , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV .....	93
Tabela 6 - Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como biossensor bi-enzimático. Condições experimentais: tempo de incubação de 15 minutos, 4-AMF $4,75 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,5, $f = 100$ s <sup>-1</sup> , $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV .....	103



Tabela 7 - Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de laranja, de tangerina e de limão, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como biossensor bi-enzimático. Condições experimentais: tempo de incubação de 15 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,5,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  ..... 106

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AMF	4-aminofenol
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Azul da Prússia
ATCh	Acetilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
CAS	Registro do <i>Chemical Abstract Service</i>
CBF	Carbofurano
CBM	Carbamatos
CBR	Carbaril
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
ChO	Colina oxidase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM-EM	Cromatografia líquida com espectrometria de massas sequenciais
CL-IES-EM-EM	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequenciais com interface de ionização por <i>electrospray</i>
CLM	Cromatografia líquida micelar
CS	Quitosana ( <i>Chitosan</i> )
DE	Disruptores ou desreguladores endócrinos
DME	Eletrodo gotejante de mercúrio ( <i>dropping mercury electrode</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio padrão relativo
ECS	Eletrodo de calomelano saturado

EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
EFS	Extração em fase sólida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Imunoensaio enzimático ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMs	Eletrodos modificados
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EPG	Eletrodo de pasta de grafeno
EPNC	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (paredes múltiplas)
EtCBM	Etilcarbamato
FMT	Formetanato
Ft-Co	Ftalocianina de cobalto
GCE	Eletrodo de carbono vítreo ( <i>glassy carbon electrode</i> )
GELCORR	Grupo de Eletroquímica e Corrosão - Brasil
GRAQ	Grupo de Reacções e Análises Químicas - Portugal
HMDE	Eletrodo de gota pendente de mercúrio ( <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i> )
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAC	Lacase
LAC/AP/EPG	Eletrodo de pasta de grafeno modificado com filmes de Azul da Prússia, seguido da imobilização da enzima lacase
LAC-EPNC	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (paredes múltiplas) modificado pela enzima lacase
LAC-TIR-NpAu-CS/EPG	Eletrodo de pasta de grafeno modificado por filme híbrido composto de quitosana, nanopartículas de ouro e uma mistura das enzimas lacase e tirosinase
LD	Limite de detecção

LMRs	Limites máximos permitidos
LQ	Limite de quantificação
MEFS	Microextração em fase sólida
MWCNT	Nanotubos de carbono com paredes múltiplas ( <i>multi-walled carbon nanotubes</i> )
NpAu	Nanopartículas de ouro
PANI	Polianilina
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBS	Tampão fosfato
PMB	Pirimicarbe
POP	Poluentes orgânicos persistentes
PPX	Propoxur
PSA	Amina primária e secundária ( <i>primary and secondary amine</i> )
QuEChERS	Método de extração ( <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> )
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia - Portugal
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	Camadas automontadas ( <i>self-assembled monolayers</i> )
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
Tampão BR	Tampão Britton-Robinson
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TIR	Tirosinase
TR	Tempo de retenção
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

XPS

Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (*X-ray Photoelectronic Spectroscopy*)

ZRM

Ziram

## LISTA DE SÍMBOLOS

$I_p$	Corrente de pico
$I_s$	Corrente de estado estacionário
$I_{max}$	Corrente máxima obtida para uma dada concentração
$E_p$	Potencial de pico
$\Delta E_p$	Variação dos potenciais de pico
$\Delta E_{p/2}$	Largura de meia-altura do processo redox
$v$	Velocidade de varredura
$R_{tc}$	Resistência à transferência de carga
$a$	Coefficiente linear
$b$	Coefficiente angular
$\bar{X}$	Média aritmética
$X_i$	Valor teórico esperado
$n$	Número de medidas
$n$	Quantidade de matéria
$m$	Massa
%IR	Porcentagem de inibição da atividade enzimática
DP	Desvio padrão
$r$	Coefficiente de correlação
%DPR	Desvio padrão relativo em porcentagem
REC	Porcentagem de recuperação
IC	Intervalo de confiança
$k$	Constante de transferência eletrônica
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$C$	Concentração do substrato

$C_8$	Coluna em fase reversa, cujo empacotamento é feito com sílica modificada com cadeias alifáticas de oito carbonos
$C_{18}$	Coluna em fase reversa, cujo empacotamento é feito com sílica modificada com cadeias alifáticas de dezoito carbonos
pH	Potencial hidrogeniônico
$pK_a$	Constante de ionização ácida
$f$	Frequência de aplicação dos pulsos de potencial
$a$	Amplitude de aplicação dos pulsos de potencial
$\Delta E_s$	Incremento de varredura
$Z'$	Impedância real
$-Z''$	Impedância imaginária
$\theta$	Ângulo de fase
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil)etano
TCNQ	7,7,8,8-tetraciaboquinodimetano
Z-Sep	Suporte contendo mistura (2:5, m/m) de $C_{18}$ e sílica revestida com dióxido de zircônio
Z-Sep <sup>+</sup>	Suporte de sílica revestido com dióxido de zircônio e grupos octadecilsilano

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>1.1</b>	<b>Pesticidas e meio ambiente</b> .....	25
<b>1.2</b>	<b>Carbamatos</b> .....	30
<b>1.3</b>	<b>O papel da Eletroquímica em estudos analíticos</b> .....	36
<b>1.4</b>	<b>Biossensores enzimáticos</b> .....	38
<b>2.</b>	<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	42
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	54
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	54
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	54
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e soluções</b> .....	55
<b>4.2</b>	<b>Síntese do grafeno</b> .....	57
<b>4.3</b>	<b>Síntese das nanopartículas de ouro</b> .....	57
<b>4.4</b>	<b>Instrumentação</b> .....	58
<b>4.5</b>	<b>Biossensores enzimáticos</b> .....	58
<b>4.5.1</b>	<i>Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC-EPNC</i> .....	59
<b>4.5.2</b>	<i>Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC/AP/EPG</i> .....	60
<b>4.5.3</b>	<i>Desenvolvimento do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG</i> .....	60
<b>4.6</b>	<b>Metodologias eletroanalíticas e figuras de mérito</b> .....	61
<b>4.7</b>	<b>Tratamento das amostras de alimentos naturais</b> .....	63
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>5.1</b>	<b>Determinação eletroanalítica de carbamatos em tomate e alface</b> .....	64



<b>5.1.1</b>	<b><i>Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC-EPNC</i></b> .....	64
5.1.1.1	<i>Otimização da proporção de nanotubos de carbono no material compósito</i> .....	64
5.1.1.2	<i>Imobilização da enzima lacase</i> .....	66
<b>5.1.2</b>	<b><i>Caracterização eletroquímica do biossensor</i></b> .....	68
<b>5.1.3</b>	<b><i>Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos</i></b> .....	70
<b>5.1.4</b>	<b><i>Curvas analíticas e figuras de mérito</i></b> .....	72
<b>5.1.5</b>	<b><i>Experimentos de recuperação e estudo de interferentes</i></b> .....	77
<b>5.2</b>	<b><i>Determinação eletroanalítica de carbamatos em tomate e batata</i></b> .....	79
<b>5.2.1</b>	<b><i>Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC/AP/EPG</i></b> .....	79
5.2.1.1	<i>Caracterização do grafeno</i> .....	79
5.2.1.2	<i>Proporção de grafeno na pasta de carbono</i> .....	81
5.2.1.3	<i>Eletrodeposição e ativação dos filmes de Azul da Prússia</i> .....	82
5.2.1.4	<i>Imobilização da enzima lacase</i> .....	84
<b>5.2.2</b>	<b><i>Caracterização eletroquímica do biossensor enzimático</i></b> .....	85
<b>5.2.3</b>	<b><i>Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos</i></b> .....	87
<b>5.2.4</b>	<b><i>Curvas analíticas e figuras de mérito</i></b> .....	88
<b>5.2.5</b>	<b><i>Experimentos de recuperação e estudo de interferentes</i></b> .....	93
<b>5.3</b>	<b><i>Determinação eletroanalítica de carbamatos em frutas cítricas</i></b> .....	95
<b>5.3.1</b>	<b><i>Desenvolvimento do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG</i></b> .....	95
5.3.1.1	<i>Proporção das nanopartículas de ouro e quitosana no material compósito</i> .....	95
5.3.1.2	<i>Proporção das enzimas lacase e tirosinase no material compósito</i> .....	96
<b>5.3.2</b>	<b><i>Caracterização eletroquímica do biossensor bi-enzimático</i></b> .....	98
<b>5.3.3</b>	<b><i>Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos</i></b> .....	99
<b>5.3.4</b>	<b><i>Curva analítica e figuras de mérito</i></b> .....	101

5.3.5	<i>Experimentos de recuperação e estudo de interferentes</i> .....	105
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	109
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	110
	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	128

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Pesticidas e meio ambiente

O uso desordenado e/ou disposição inadequada de contaminantes emergentes no meio ambiente tem desencadeado sérios desequilíbrios aos ecossistemas e representam uma constante ameaça para a biodiversidade.<sup>1</sup> Estes poluentes estão distribuídos em diferentes grupos de compostos, a exemplo dos pesticidas, agentes de ação terapêutica e farmacológica, cosméticos, produtos de higiene pessoal, subprodutos industriais, hormônios naturais e sintéticos, drogas ilícitas, etc.<sup>2</sup> Eles recebem tal classificação pela falta de legislação ambiental que os contemplem, estabelecendo uma relação entre seus níveis e aspectos toxicológicos, ou ainda, por estarem em concentrações tão baixas que limitam o monitoramento com os recursos analíticos disponíveis.<sup>3</sup>

Particularmente no caso dos pesticidas, o crescente acervo bibliográfico que trata dos problemas associados tanto à presença quanto aos efeitos crônicos destes contaminantes para os organismos vivos, tem impulsionado, em muitos países, ações governamentais e não-governamentais de controle e de manejo das fontes poluidoras. No Brasil, esta questão se reveste de importância única devido à carência de políticas públicas relativas ao tema<sup>2</sup> e falta de esclarecimento da população acerca dos riscos associados à exposição, reflexo de educação ambiental bastante fragilizada que se perpetua ao longo das gerações.<sup>1,4</sup>

Em 2006 havia quase 17 milhões de pessoas ocupadas com atividades agropecuárias no país (incluindo produtores e seus familiares, empregados temporários e permanentes), que correspondia a quase 20% de toda a população brasileira na ocasião.<sup>5</sup> Neste mesmo ano, as intoxicações com pesticidas representaram 48,9% das mortes por agentes exógenos no Brasil, representando a maior taxa de mortalidade dentre todas as causas de óbitos por contaminação.<sup>6</sup> Este percentual foi relacionado à ingestão acidental, intencional e uso inseguro de pesticidas durante as atividades ocupacionais. Dois anos depois, o país tornou-se o maior consumidor de pesticidas do mundo, com mais de 400 ingredientes ativos formulados em aproximadamente 1200 produtos. De acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2009 foram registrados mais de onze mil casos de intoxicações por pesticidas no Brasil.<sup>7</sup> Atualmente, existem aproximadamente 500 ingredientes ativos, distribuídos entre organoclorados, carbamatos, ureias, triazóis, piretróides, etc., que possuem uso permitido

pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para fins agropecuários, embora quase 100 outros compostos já tenham sido proibidos.<sup>8</sup>

Em 2010, o Nordeste estava entre as regiões brasileiras mais críticas com relação ao uso de agrotóxicos e ao número de vítimas (823) por intoxicações devido aos ingredientes ativos das formulações, ficando atrás somente das regiões Sudeste (2.145) e Sul (898).<sup>7</sup> No mesmo ano, o Nordeste também alcançou a primeira posição no número de vítimas fatais por intoxicações com pesticidas, apresentando 82 óbitos (47,9%) de um total de 171 ocorrências registradas em todo o País.<sup>7</sup> De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, o Ceará já era, desde 2008, o estado nordestino com maior consumo de defensivos agrícola, ocupando a quarta posição no Brasil.<sup>9</sup> Dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, acerca dos casos de intoxicações ocorridas no Ceará, destacam a Chapada do Apodi (formação rochosa que funciona como um divisor de águas entre os rios Apodi e Jaguaribe) como a área com maior número de ocorrências.<sup>10</sup> É na Chapada do Apodi onde também se observa o maior número de vítimas de câncer no Ceará, sendo que o consumo de alimentos contaminados, o uso abusivo e o método de aplicação dos pesticidas (pulverização aérea) estão entre as causas mais prováveis desta desordem.<sup>10</sup> Estima-se que pela pulverização aérea, cerca de 32% dos pesticidas fiquem retidos nas plantas, 49% sejam desviados para o solo e 19% dispersados pelo ar para áreas adjacentes.<sup>5</sup> O maior número de vítimas da doença vêm sendo registrado nos municípios de Limoeiro do Norte, Tabuleiro do Norte, Jaguaribe, São João do Jaguaribe, Alto Santo, Quixeré, Pereiro, Potiretama, Jaguaribara e Ererê.<sup>11</sup> Todas essas cidades estão situadas em áreas produtoras de frutas e vegetais para subsistência, importação e exportação, embora pouca ou nenhuma fiscalização seja feita na região.<sup>5</sup>

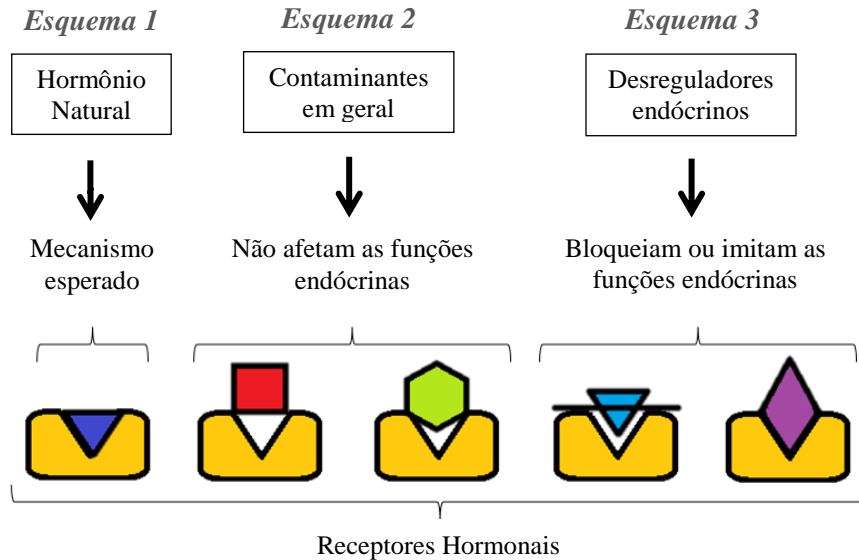
Milhome *et al.*<sup>12</sup> mostraram que os inseticidas (46%) e acaricidas (30%) são as classes de defensivos mais utilizados no entorno do Baixo Jaguaribe, seguidos dos herbicidas, fungicidas e nematicidas. Dos 37 pesticidas contemplados no estudo, muitos atuam como inibidores da acetilcolina, a exemplo dos carbamatos e organofosforados, classificados como sendo de classe I ou extremamente tóxicos (metomil, metamidofós e paration metílico), classe II ou altamente tóxicos (carbosulfan, clorpirifós, fenitroton e triazofós) e classe III ou moderadamente tóxicos (acefato, cartape e mancozeb). Marinho<sup>13</sup> investigou a presença de agrotóxicos em 24 amostras de águas utilizadas para o abastecimento público, coletadas em torneiras residenciais, canais de abastecimento e em poços profundos da Chapada do Apodi. Os resultados mostraram que todas

as amostras eram contaminadas com, pelo menos, 5 pesticidas utilizados pelo agronegócio local. Em alguns pontos de coleta foram identificados até 12 pesticidas na mesma amostra. Entre os compostos encontrados, estavam pesticidas classe I (abamectina, endosulfan, difenoconazol e tepraloxidim), classe II (cletodim, carbofurano, carbaril, fenitrotiona e procimidona) e classe IV ou pouco tóxicos (tebuconazol, glifosfato e ciromazina). O estudo não levou em consideração a relação das concentrações com os limites máximos permitidos (LMRs) pela legislação vigente.

Um dos principais impactos negativos dos pesticidas é a capacidade de afetar as funções endócrinas dos seres vivos, imitando, mimetizando ou bloqueando a ação dos hormônios naturais.<sup>14</sup> Por isso, são classificados como desreguladores ou disruptores endócrinos (DE) e a exposição direta ou indireta a esses contaminantes, mesmo em níveis de traços (da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ ), tem sido relacionada a várias anormalidades em seres humanos, a exemplo da puberdade precoce, surgimento de cânceres nas glândulas endócrinas e sistemas relacionados, anormalidades no trato genital de machos e fêmeas, infertilidade e risco de extinção.<sup>15,16</sup>

A dinâmica dos DE no organismo dos seres humanos pode ser compreendida de forma mais clara por um sistema chave/fechadura, similar ao observado para as enzimas. Uma vez presentes no organismo, esses compostos vão de encontro aos receptores hormonais pela corrente sanguínea, juntamente com os hormônios naturais excretados pelas glândulas endócrinas.<sup>17</sup> A Figura 1 retrata o esquema geral do mecanismo de atuação desses compostos. Os hormônios naturais são segregados pelas glândulas endócrinas e atuam de forma a se ligarem especificamente aos receptores hormonais (Esquema 1), para que, deste modo, atendam e regulem as necessidades do organismo. O receptor, por sua vez, recebe a mensagem e ordena aos genes que produzam novas proteínas (efeitos a longo prazo - processos de crescimento, maturação, reprodução sexual, etc.) ou que altere a atividades das proteínas existentes na célula (efeitos a curto prazo - aumento do ritmo cardíaco, nível de adrenalina, balanço de açúcar no sangue, etc.). Alguns contaminantes exógenos não interagem como esses receptores (Esquema 2) e são excretados, praticamente, de forma inalterada por via urinária e digestiva. No caso dos DE (Esquema 3), por possuírem estrutura similar a dos hormônios naturais, podem interagir diretamente com esses receptores, desequilibrando o funcionamento normal do organismo.<sup>17</sup> Essas substâncias também são capazes de mimetizar a ação dos hormônios naturais (efeito agonista) e/ou bloquear seus receptores (efeito antagonista), acarretando sérios distúrbios ao sistema endócrino dos seres vivos.<sup>18</sup>

Figura 1 - Representação geral do mecanismo de atuação dos hormônios naturais e contaminantes exógenos em relação aos receptores hormonais



Fonte: autoria própria

Independente do modo de aplicação dos pesticidas, o solo é o destino final mais provável de grande parte dos resíduos.<sup>19</sup> Em seguida, de acordo com a dinâmica de adsorção e dessorção desses compostos no ambiente, controlada por uma série de processos físico-químicos (retenção, lixiviação, volatilização, fotodegradação, decomposição química e microbiológica, carreamento superficial e absorção pelas plantas), uma nova rota se inicia.<sup>20</sup> Além da retenção, os fatores bióticos e abióticos e as características físico-químicas das moléculas (solubilidade em água, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol-água, constante de ionização ácida ou básica, constante da lei de Henry e tempo de meia-vida) também podem interferir na atividade dos pesticidas sobre as plantas, bem como no destino final destes compostos.<sup>19</sup>

Em adição, estudos apontaram para o caráter não-biodegradável dos pesticidas, que persistem tanto nos ecossistemas quanto nos organismos vivos em contato com o ambiente, constituindo um sério risco à saúde, principalmente, daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar, ou seja, os seres humanos.<sup>14</sup> Whallen *et al.*<sup>21</sup> alertaram que o contato, mesmo que indireto, dos integrantes de qualquer nível da cadeia alimentar dos seres vivos com essas substâncias, desempenha papel bioacumulador (acúmulo do princípio ativo ao longo do tempo), biomagnificador (acúmulo progressivo observado em cada nível da cadeia alimentar) e

biotransformador (transformação da substância em seus metabólitos). Skinner *et al.*<sup>22</sup> reportaram que doses extremamente baixas ( $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ ) destas substâncias podem causar danos irreversíveis em animais silvestres e, pelo princípio da precaução, o contato com seres humanos deve ser evitado ao máximo.

Especialistas na área de Endocrinologia consideram que, em seres humanos, a dieta alimentar seja a principal rota de contaminação.<sup>1</sup> Há um número considerável de trabalhos que retratam a ocorrência de vários desses compostos em alimentos naturais, ou ainda, em solos, sedimentos marinhos e águas naturais contaminadas por resíduos oriundos de áreas agrícolas.<sup>1-23</sup> Embora os mamíferos estejam entre as principais vítimas de contaminação, pesticidas também podem afetar os caracteres sexuais de peixes, crustáceos, moluscos, aves e répteis.<sup>14-24</sup> Assim, o desenvolvimento de métodos para monitorar esses compostos em diferentes matrizes ambientais tornou-se motivo de preocupação imediata.<sup>136-14,16,18</sup>

O primeiro pesticida com ação disruptora comprovada foi o organoclorado 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil)etano, conhecido cientificamente como DDT,<sup>25</sup> mas que se popularizou com o nome de “pesticida milagroso”. Em 1948, o químico suíço Paul Hermann Müller foi laureado com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pela descoberta das propriedades inseticidas desse composto contra vários tipos de artrópodes. Anos depois, as consequências desastrosas desse pesticida e outros compostos organoclorados foram advertidas pela cientista Rachel Carson, em sua obra *Silent Spring* (Primavera Silenciosa), uma das mais importantes referências relativas a pesticidas com ação endócrino-disruptora, onde relatou os diversos efeitos adversos ocasionados ao meio ambiente em troca da garantia da alta produção agrícola, que se encontrava ameaçada pelas inúmeras pragas que prejudicavam o agronegócio em nível mundial.<sup>26</sup> Com isso, muitos países baniram ou limitaram a produção e o uso de vários organoclorados (aldrin, clorano, DDT, dieldrin, endrin, heptacolor, hexaclorobenzeno, mirex, toxafeno, clordecone,  $\alpha$ -hexaclorociclohexano,  $\beta$ -hexaclorociclohexano, lindano, pentaclorobenzeno, entre outros) na década de 1970. Essas medidas se tornaram mais evidentes após restrições estabelecidas pela Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes (POP).<sup>27</sup> Mesmo assim, vários organoclorados ainda são utilizados por muitas nações, principalmente, países emergentes, para o controle de vetores transmissores de doenças.<sup>19</sup>

Como alternativa, grande investimento foi destinado à síntese e aplicação de potenciais substitutos dos organoclorados, que mantivesse seu poder como defensivo, mas com menor

impacto ao meio ambiente. Nesse sentido, surgiram os carbamatos e organofosforados, pesticidas derivados de nitrogênio e de fósforo, respectivamente, capazes de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase presente em diferentes pestes (parasitas e patógenos) que ameaçam os cultivares.<sup>28</sup> Todavia, considerando que esta enzima também está presente em insetos, pássaros, peixes e mamíferos, ficou comprovado que esses compostos podem apresentar grande risco para organismos não-alvo.<sup>27,28</sup> Em geral, carbamatos e organofosforados são menos persistentes e bioacumulativos que os organoclorados, mas podem ser ainda mais tóxicos para seres vivos que estabelecem contato direto com o ingrediente ativo.<sup>29</sup>

Por conta da dimensão desta problemática de saúde pública, as agências de segurança e controle alimentar se encontram em constante estado de alerta, reavaliando e estabelecendo novas diretrizes para o uso restrito e legal desses pesticidas.<sup>8,30</sup> Na atual conjuntura, a medida mais plausível seria monitorar os níveis desses compostos nas matrizes as quais estejam inseridos. Só assim será possível compreender a dinâmica ambiental, estabelecer relações entre seus níveis e efeitos toxicológicos, ou ainda, identificar e controlar as fontes poluidoras.

## 1.2 Carbamatos

Os pesticidas da classe dos carbamatos (CBM), também conhecidos como uretanos, são sais ou ésteres derivados do ácido carbâmico, com substituições dos hidrogênios hidroxílicos e amínicos, por diferentes átomos, grupos funcionais ou radicais. Esses agroquímicos foram introduzidos no mercado em 1950, após a Segunda Guerra Mundial, e representam, ao lado dos organofosforados, o grupo de pesticidas mais utilizados no Brasil.<sup>31</sup> CBM impedem a degradação da acetilcolina (substância responsável pela comunicação entre as células nervosas), suprimindo a transmissão contínua dos impulsos nervosos, que são indispensáveis para as funções vitais do organismo.<sup>27,29</sup>

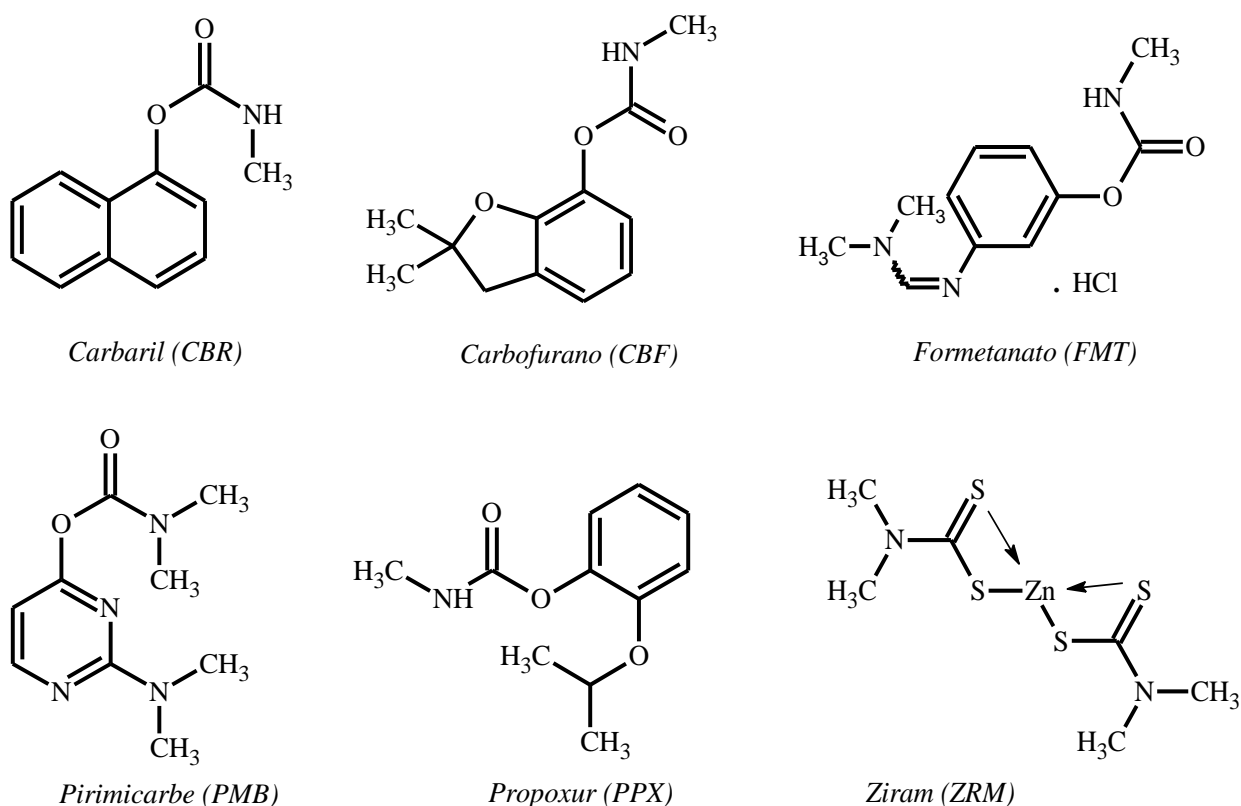
Quando utilizados como defensivo agrícola, CBM possuem ação inseticida, nematicida, herbicida e fungicida.<sup>14</sup> Também são utilizados na indústria de medicamentos, principalmente, no tratamento do mal de Alzheimer,<sup>32</sup> ou ainda, na produção de polímeros como poliuretanos.<sup>14</sup> Em geral, são instáveis e voláteis, podendo ser metabolizados por micro-organismos, plantas e animais. Sua degradação na água e no solo está relacionada a diversos fatores como umidade,



temperatura, pH e luminosidade, e sua decomposição resulta na produção de amônia, dióxido de carbono, aminas, álcoois e fenóis.<sup>25</sup>

Simples alterações nos grupamentos substituintes dos CBM podem atribuir propriedades sistêmicas e não-sistêmicas para uma dada cultura. No Brasil, há uma grande variedade de formulações à base destes pesticidas, que são comercializadas com diferentes apresentações.<sup>33</sup> Como exemplos de ingredientes ativos, pode-se citar os *n*-metilcarbamatos carbaril, carbofurano, formetanato, pirimicarbe, propoxur e ziram, cujas estruturas químicas estão contempladas na Figura 2. CBM também estão incluídos na lista de poluentes prioritários pela *United States Environmental Protection Agency*, um dos mais importantes órgãos de controle ambiental existentes.<sup>14</sup> Neste ponto, também é importante ressaltar que alguns pesquisadores relataram ter encontrado resíduos de pesticidas em alimentos, mesmo após sua proibição, reforçando a necessidade de política de fiscalização mais rigorosa.<sup>5,12,34</sup>

Figura 2 – Estruturas químicas de diferentes ingredientes ativos do grupo dos *n*-metilcarbamatos



Em 2010, no último monitoramento realizado pela ANVISA, por meio do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), para avaliar possíveis resíduos de pesticidas presentes em hortaliças, frutas, verduras e legumes comercializados no Brasil, foram fornecidas informações preocupantes. Das 2.488 amostras analisadas, apenas 37% delas não apresentaram resíduos dos pesticidas avaliados, em 35% detectou-se níveis de resíduos abaixo do limite máximo estabelecido (LMR) e 28% foram consideradas insatisfatórias por apresentarem resíduos de produtos não autorizados ou autorizados, mas com teores acima do LMR. Das diferentes classes de pesticidas em que foram identificados aditivos com situação irregular encontram-se, principalmente, os *n*-metilcarbamatos e ditiocarbamatos, ao lado dos organofosforados, piretróides, benzimidazóis, dicarboximidas, clorociclodienos e pirimidinil carbinóis. O estudo ainda aponta que o uso indiscriminado e ilegal de um ou mais pesticidas em culturas para as quais eles não estão autorizados, apresenta duas principais consequências negativas: exposição ocupacional desnecessária ou o aumento da exposição do trabalhador rural e o aumento do risco na dieta dos consumidores que ingerem o alimento contaminado, uma situação que ainda pode se agravar à medida que os defensivos são encontrados em outros produtos consumíveis.<sup>35</sup>

Na área de Química dos Alimentos, grande ênfase tem sido dada ao etilcarbamato (EtCBM), um contaminante capaz de desencadear cânceres em camundongos, ratos e hamsters e considerado potencialmente carcinogênico para humanos.<sup>36,37</sup> Esse composto é naturalmente gerado durante processos de fermentação e, por isso, seus resíduos vêm sendo encontrados em bebidas alcoólicas como cervejas e vinhos, ou ainda, em vinagres, molhos, queijos, massas e iogurtes.<sup>28,38</sup>

Baffa Júnior *et al.*<sup>37</sup> avaliaram a presença de EtCBM em diferentes estágios (extrato da cana-de-açúcar, fermentação do melão, obtenção das frações do material destilado e resíduo gerado) da produção da cachaça brasileira, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para isso, o espectrômetro de massas foi operado em modo de impacto eletrônico (70 eV), com temperatura do forno e injetor mantidas a 220 °C e gás hélio (5.0) como carreador com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar de sílica fundida com DB-Wax. A análise foi monitorada por reações múltiplas:  $m/z$  74 > 44 e  $m/z$  62 > 44 para EtCBM e  $m/z$  64 > 44 para o etilcarbamato-d5 usado como padrão interno. O limite de detecção (LD) obtido foi de 15 µg L<sup>-1</sup>. A concentração do analito encontrada

nos diferentes extratos variaram de 1,57 a 122 mg L<sup>-1</sup>. Os autores observaram que a qualidade da bebida, com relação ao teor de EtCBM, pode ser melhorada separando as frações do destilado, sendo que as porções obtidas com menor tempo de destilação possuíam as concentrações mais representativas do contaminante.

Alcarde *et al.*<sup>39</sup> investigaram a presença de EtCBM em bebidas alcoólicas mono e bidestiladas. Esses autores também utilizaram CG-EM com energia de 70 eV para promover a ionização do analito por impacto eletrônico. As demais condições experimentais foram: coluna capilar com fase polar; temperatura do injetor e detector de 230 °C e 220 °C, respectivamente; gás hélio com vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>; monitoramento do composto pelo fragmento do íon molecular 62 *m/z*. O procedimento alcançou LD de 10 µg L<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que extratos bidestilados reduzem o percentual deste composto (3%) na composição de bebidas alcoólicas, comparado aos monodestilados (30%). Entre os precursores responsáveis pela formação deste micropoluente em bebidas estão cianeto de cobre, cianatos, tiocinatos, ureia, citrulina, carbamilsulfato, lactonitrila, isobutiraldeído e cianoidrina. Em todo caso, estudos mais detalhados são necessários para elucidar a(s) rota(s) envolvida(s) na formação de EtCBM em bebidas e alimentos fermentados.<sup>37</sup>

Por conta da instabilidade térmica dos carbamatos, Ajtony *et al.*<sup>40</sup> avaliaram a presença de EtCBM em vinhos húngaros por meio da derivatização do analito com 9-xantidrol em meio ácido. O composto formado é o carbamato de etil xantil que apresenta alta estabilidade (≈ 48 horas) e propriedades fluorescentes. O processo de separação e de quantificação do analito em diferentes bebidas alcoólicas foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: coluna em fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel em gradiente entre acetato de sódio (pH 7,2) e acetonitrila, com vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; detector de fluorescência, monitorando o analito em 238 nm e 300 nm, com tempo de retenção (TR) do analito em torno de 15 minutos. Com LD de 3,0 µg L<sup>-1</sup>, os autores identificaram níveis do analito entre 4,9 a 39,9 µg L<sup>-1</sup> em 33 diferentes amostras de vinhos húngaros. Todavia, processos de derivatização não são triviais e comprometem a praticidade do procedimento analítico.

O risco associado ao efeito endócrino-disruptor e bioacumulativo de alguns CBM em frutas e produtos derivados, vegetais, água e solo também tem sido enfatizado, com destaque para o carbaril. Chin-Chen *et al.*<sup>41</sup> avaliaram a presença de carbaril e do seu principal metabólito (1-naftol) em amostras de alface, água e solo, utilizando cromatografia líquida micelar (CLM) com

detecção por fluorescência. Para contornar problemas associados ao uso de compostos clorados na análise de CBM, visando atribuir maior seletividade ao método, a fase móvel micelar era composta do surfactante dodecilsulfato de sódio diluído em propanol (6%, v/v) e tamponada em solução de dihidrogenofosfato de sódio pH 3,0. Antes da análise, as amostras de água ou os extratos de alface e de solo foram simplesmente filtrados no amostrador automático do equipamento, reduzindo as etapas de bancada e o tempo de análise do carbaril. A separação de carbaril (TR  $\approx$  8 min) e 1-naftol (TR  $\approx$  12 min) foi realizada em coluna C<sub>18</sub>, com máximo de excitação em 225 nm e 333 nm, respectivamente. Após a otimização dos parâmetros que influenciam a sensibilidade e a seletividade do método, foi obtido LD de 5,0 ng mL<sup>-1</sup> para carbaril e LD de 18,0 ng mL<sup>-1</sup> para 1-naftol. Os valores de porcentagem de recuperação (REC) variaram de 98,9 a 101,1%, para contaminações de 100 ng mL<sup>-1</sup> ou 100 ng g<sup>-1</sup>.

Chowdhury *et al.*<sup>42</sup> também desenvolveram um método seletivo para identificar resíduos de dezenove pesticidas por CG-EM, dentre os quais encontram-se os carbamatos carbaril, carbofurano, carbossulfano e cartape, em amostras de berinjela, tomate, couve-flor, repolho, batata, pepino, cenoura e cebola. A separação foi realizada em coluna de sílica, monitorando três diferentes fragmentos de carbofurano (TR = 5,69 min), carbaril (TR = 8,05 min), cartape (TR = 14,61 min) e carbossulfano (TR = 18,73 min). A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 250 °C e gás hélio foi utilizado como carreador com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Os valores de LD variaram de 1,3×10<sup>-3</sup> a 4,2×10<sup>-3</sup> mg kg<sup>-1</sup>, com REC entre 79,0 e 106%, para concentrações de 0,05 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup>. Os autores concluíram que os elevados níveis dos pesticidas encontrados em alguns vegetais é consequência do uso indiscriminado desses defensivos, pondo a saúde dos agricultores e consumidores em constante risco.

Prasad *et al.*<sup>43</sup> investigaram a presença de sete carbamatos em amostras de grão de bico, trigo, lentilha, soja, folhas de feno-grego e maçã. O protocolo analítico utilizava CLAE acoplada a detector ultravioleta (235 nm), separação cromatográfica em coluna C<sub>8</sub>, com fase móvel composta de mistura acetonitrila:água (30:70%, v/v) com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Nessas condições, foi possível determinar aldicarbe (TR = 5,51 min), benomil (TR = 3,13 min), carbofurano (TR = 9,77 min), etiofencarbe (TR = 13,84 min), metomil (TR = 2,42 min), tiofanato etílico (TR = 22,62 min) e tiofanato metílico (TR = 8,17 min). Os autores mostraram que a cromatografia líquida é mais eficiente que a gasosa para análise destes compostos por conta da baixa volatilidade, alta polaridade e instabilidade térmica dos mesmos. Os valores de LD

variaram de  $8,00 \times 10^{-8}$  a  $1,16 \times 10^{-6}$  mg L<sup>-1</sup>, com REC de 81,1 a 98,8%, para concentração de 8,0 mg g<sup>-1</sup>, ressaltando a alta sensibilidade do método proposto.

Song *et al.*<sup>44</sup> desenvolveram um método para determinar CBM em extratos de maçãs, utilizando cartuchos de microextração em fase sólida (MEFS) modificados com nanotubos de carbono, a fim de aumentar a capacidade de extração do material adsorvente. A detecção dos analitos foi realizada por CLAE com detector de arranjo de diodos, separação feita em coluna C<sub>18</sub>, utilizando fase móvel em modo isocrático e composta de metanol e ácido fosfórico 0,1% (55:45, v/v). O monitoramento de carbofurano, isoprocarbe e metiocarbe foi realizado em 200 nm, de carbaril em 221 nm e dietofencarbe em 207 nm. Todos os analitos foram eluídos em até 40 minutos. O método também demonstra alta sensibilidade, onde os valores de LD variaram entre 0,09 e 6,00 ng g<sup>-1</sup>, com REC de 91,7 a 112,4%, para três níveis de contaminação investigados (50, 100 e 150 ng g<sup>-1</sup>).

Rajski *et al.*<sup>45</sup> investigaram a presença de 113 pesticidas em amostras de abacate e amêndoas, cujos extratos foram obtidos pelo método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) seguido de uma série de estratégias para *clean-up* das amostras por extração em fase sólida (EFS, cartuchos à base de Z-Sep e Z-Sep<sup>+</sup> – adsorventes à base de ZrO<sub>2</sub>, PSA – amina primária e secundária, C<sub>18</sub> e sílica), mini-Luke e extração em acetato de etila. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida com espectrômetros de massa sequenciais (CL-EM-EM). QuEChERS seguido de SPE/Z-Sep foi o método de extração mais satisfatório para ambas as matrizes. Da grande variedade de pesticidas analisados, encontraram-se os CBM aldicarbe, carbaril, carbendazim, dietofencarbe, fenoxicarbe, formetanato, indoxacarbe, iprovalicarbe, isoprocarbe, metiocarbe, pirimicarbe e propoxur, com TRs entre 2,97 e 25,94 min. Os limites de quantificação (LQ) variaram entre 10 e 50 µg kg<sup>-1</sup>, com REC de 70 a 120%, para concentrações de 10 e 50 µg kg<sup>-1</sup>.

Park *et al.*<sup>46</sup> reportaram que, atualmente, o método QuEChERS representa um dos mais eficientes métodos de extração de contaminantes em alimentos. Os autores obtiveram êxito na extração do micropoluente fenobucarbe presente em 15 diferentes marcas de músculos de carne bovina. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequenciais com interface de ionização por *electrospray* (CL-IES-EM-EM) no modo positivo, com monitoramento feito por dois fragmentos: quantificação em 99,9 (14) *m/z* e confirmação em 151,9 (8) *m/z*. A separação do analito foi realizada em coluna C<sub>18</sub>, mantendo a

temperatura do forno em 35 °C, utilizando fase móvel em gradiente linear entre ácido fórmico (0,1%)/acetonitrila e ácido fórmico (0,1%)/água, com vazão de 0,25 mL min<sup>-1</sup>. Nitrogênio foi empregado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. O método permitiu quantificar fenobucarbe com TR igual a 8,3 min e LD = 1,5 µg kg<sup>-1</sup>. Nenhum resíduo do fenobucarbe foi encontrado acima do LQ (5,0 µg kg<sup>-1</sup>). Para contaminações artificiais de 10 e 40 µg kg<sup>-1</sup>, foi obtida REC variando entre 83,7 e 93,4%, reforçando a seletividade e exatidão do método.

Malik e Faubel<sup>47</sup> também mostraram que a eletroforese capilar com detector ultravioleta (254 nm) pode ser usada como alternativa para detectar ditiocarbamatos como ziram (TR ≈ 5,0 min; LD = 0,57 µg mL<sup>-1</sup>; REC equivalentes a 97 e 98%, para contaminações de 20 e 60 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente) e zineb (TR ≈ 8,0 min; LD = 0,68 µg mL<sup>-1</sup>; REC equivalentes a 96 e 98%, para contaminações de 20 e 60 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente) em amostras de trigo com alta precisão, rapidez, sensibilidade e seletividade, empregando tampão tetraborato pH 9,0 como eletrólito carreador e aplicando voltagem de aproximadamente 25 kV. As espectroscopias na região do infravermelho com transformada de Fourier (LD = 0,055 mg g<sup>-1</sup> de solo),<sup>48</sup> molecular (LD = 20 µg L<sup>-1</sup> de água para ziram e 21 µg L<sup>-1</sup> de água para zineb)<sup>49</sup> e de absorção atômica (LD = 144 µg L<sup>-1</sup> de água para ziram e 145 µg L<sup>-1</sup> de água para zineb)<sup>49</sup> também foram empregadas na análise de ditiocarbamatos, mas com sensibilidade inferior à alcançada por cromatografias líquida e gasosa e por eletroforese capilar.

Apesar do investimento em pesquisas com CBM, o conhecimento acerca da dinâmica, toxicologia e alternativas para o monitoramento desses compostos e de seus metabólitos ainda é escasso, o que dificulta a adoção de medidas de manejo e de controle das fontes poluidoras.<sup>1-4</sup> Do ponto de vista analítico, uma das principais razões para essa limitação é a dificuldade para quantificar esses compostos em matrizes ambientais tão complexas (alimentos, águas superficiais, fluidos biológicos, solos, sedimentos, etc.).<sup>1-16</sup> Portanto, a busca por métodos acurados para monitorar pesticidas em amostras ambientais constitui um grande desafio para muitos pesquisadores e um importante tópico de estudos na Química Analítica.<sup>3,14,18,50</sup>

### 1.3 O papel da Eletroquímica em estudos analíticos

A importância de se estudar CBM por via eletroquímica se dá pelo fato de que, para se fazer cumprir a legislação vigente e atender à crescente demanda do mercado agropecuário,<sup>51</sup> os

laboratórios de controle e vigilância alimentar empregam, em geral, métodos cromatográficos multirresíduos, que contemplam ampla faixa de pesticidas de distintas famílias, embora nem sempre tais métodos sejam suficientemente sensíveis para todos os compostos analisados.<sup>3,27,50</sup> Em adição, os métodos cromatográficos convencionais, mesmo os mais seletivos, costumam empregar um grande número de “etapas de bancada”, que tornam o tempo de análise elevado, utilizam grandes quantidades de solventes tóxicos e instrumentação financeiramente dispendiosa, elevando o custo final das análises e inviabilizando-as para aplicações de rotina.<sup>3,14</sup> Essas informações reforçam a importância de se desenvolver novos métodos, a partir de técnicas mais rápidas e com custo acessível, sem perder de vista a sustentabilidade ambiental, um perfil analítico com nível de exigência que pode ser enquadrado nas técnicas eletroanalíticas.

O crescente interesse em estudos analíticos que utilizam técnicas eletroquímicas como instrumento de análise é reflexo de suas vantagens frente aos métodos convencionais (cromatografia e espectroscopia).<sup>52-54</sup> Os procedimentos eletroanalíticos são mais robustos e menos susceptíveis a interferentes naturais e antrópicos presentes nas amostras, possibilitando, em alguns casos, experimentos *in loco*.<sup>55</sup> Em geral, estes métodos são mais adequados para análises de rotina pela simplicidade instrumental, custo moderado e portabilidade.<sup>56</sup> Também permitem ensaios com amostras coloridas e/ou com partículas suspensas, evitando possíveis erros sistemáticos inerentes a diluição das amostras.<sup>57-59</sup> A associação entre os resultados obtidos e os critérios de diagnósticos de cada técnica fornece informações que vão além da análise trivial dos poluentes, a exemplo da aquisição de parâmetros cinéticos, mecanísticos e ocorrência de reações paralelas.<sup>60</sup> De acordo com Gupta *et al.*,<sup>56</sup> o estudo do comportamento eletroquímico de moléculas bioativas são importantes pela similaridade entre as reações eletroquímicas e biológicas, simulando na superfície do eletrodo, as reações que acontecem *in vivo*.

Com o avanço de pesquisas envolvendo materiais condutores, uma grande variedade de sensores vem sendo desenvolvidos, com características e vantagens distintas, que atribuem maior sensibilidade aos procedimentos eletroanalíticos. Estratégias de análise inovadoras foram desenvolvidas com diversos transdutores derivados de carbono,<sup>61-64</sup> mercúrio,<sup>65-68</sup> ouro,<sup>69-72</sup> cobre,<sup>73-76</sup> platina,<sup>77-80</sup> entre outros, capazes de detectar e de quantificar poluentes em amostras cada vez mais complexas. Maior especificidade e/ou seletividade também podem ser agregadas pela imobilização de diversos elementos de biorreconhecimento (ácido desoxirribonucleico -

DNA, ácido ribonucleico - RNA, proteínas, enzimas, anticorpos, etc.) sobre a superfície dos sensores, constituindo os chamados biossensores.<sup>53,69-71,81</sup>

A evolução das pesquisas em Nanociência também tem contribuído para a construção de novos dispositivos à base de materiais nanoestruturados.<sup>61-64,70,82</sup> Particularmente, transdutores constituídos de nanomateriais carbonáceos apresentam excepcionais propriedades de transporte elétrico, com destaque para alta condutividade e mobilidade eletrônica. De acordo com Marinho *et al.*,<sup>62</sup> nanotubos de carbono (estruturas cilíndricas - uma ou múltiplas paredes - compostas por folhas de grafeno, com unidades de carbono  $sp^2$  hexagonais altamente estáveis) e grafeno (camada bidimensional de átomos de carbono  $sp^2$  densamente compactados) são, sem dúvida, duas das mais importantes descobertas da nova geração de materiais condutores. A excelente resistência mecânica e elevada condutividade elétrica, características marcantes desses nanomateriais e dos seus compósitos, possibilitaram uma gama de estratégias para o desenvolvimento de sensores que revolucionou a indústria de dispositivos eletrônicos.<sup>53,54,61-64,69</sup>

Nanopartículas de metais, semimetais, óxidos e compósitos de nanomateriais também possuem vasta aplicação na eletroquímica de sensores e biossensores.<sup>53,83</sup> Dentre as propriedades únicas das nanopartículas que justificam a sua utilização na configuração eletródica de diferentes dispositivos, destacam-se: versatilidade para modificação, biocompatibilidade para a imobilização de biomoléculas, catálise de reações eletroquímica e, principalmente, elevadas condutividade elétrica e área superficial.<sup>83,84</sup> Além disso, a incorporação de nanopartículas em membranas ou matrizes poliméricas permite aumentar a condutividade elétrica do compósito em várias ordens de grandeza, sem comprometer características importantes da matriz receptora.<sup>62</sup> Isso é possível, porque, uma vez presentes na configuração eletródica, esses materiais transmitem suas propriedades elétricas da escala nanométrica para o nível macroscópico. Esse conjunto de atributos tornam as nanopartículas metálicas versáteis para a construção de novos sensores,<sup>69</sup> biossensores,<sup>71</sup> imunossensores<sup>85</sup> e genossensores<sup>70</sup> eletroquímicos.

#### **1.4 Biossensores enzimáticos**

Com a ascensão da Química Verde, protocolos analíticos que otimizem ou eliminem possíveis resíduos gerados com a análise, ou ainda, baseados em dispositivos portáteis e capazes de monitorar poluentes em tempo real, têm se destacado frente aos procedimentos



tradicionais.<sup>81,84</sup> A tecnologia dos biossensores é uma “ferramenta chave” para atender esses critérios. Nas últimas três décadas, esses dispositivos ganharam grande destaque em virtude da facilidade de preparação, custo acessível, alta precisão e baixo nível de interferentes para o sensoriamento de micropoluentes.<sup>84</sup> Alta sensibilidade, seletividade, especificidade, tempo de resposta e de vida útil, reprodutibilidade e exatidão das medidas são os principais parâmetros buscados nestes dispositivos.<sup>83,84</sup>

As medidas são classificadas de acordo como o método de transdução do sinal (eletroquímicas, ópticas, térmicas, piezelétricas, etc.) e o elemento de biorreconhecimento.<sup>86</sup> Os biossensores eletroquímicos podem ser amperométricos (potencial é aplicado entre os eletrodos de trabalho e de referência, sendo a corrente resultante medida continuamente), potenciométricos (medida da densidade de carga na superfície do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência), condutimétricos (variação nas medidas de condutância, resultante de produtos da reação catalítica) e impedimétricos (medidas das propriedades elétricas resultante dos eventos de biorreconhecimento na superfície de trabalho).<sup>86</sup>

Para os CBM, métodos enzimático-analíticos baseados em técnicas eletroquímicas são fortemente encorajados.<sup>87</sup> Esses dispositivos possuem características especiais para a detecção desses poluentes em matrizes complexas por conta de sua alta seletividade e/ou especificidade para com o analito, permitindo sua detecção mesmo na presença de outros contaminantes antrópicos, excipientes ou interferentes naturais.<sup>81,87</sup>

Seletividade e/ou especificidade de biossensores enzimáticos dependem da fonte e da técnica de extração do elemento de biorreconhecimento, da matriz receptora e da interação entre eles. Há uma grande variedade de enzimas (acetilcolinesterase, lacase, tirosinase, peroxidase, uricase, glucose oxidase, lactato oxidase, entre outras) que podem ser selecionadas de acordo com as características da molécula-alvo.<sup>86,88</sup> A mutação genética ou modificação química das enzimas também são alternativas inovadoras para aumentar interação, seletividade e especificidade entre o elemento de biorreconhecimento e o substrato.<sup>86</sup>

Devido a capacidade dos CBM de inibir a atividade da acetilcolinesterase (AChE), esta enzima é a mais utilizada no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção destes pesticidas e de uma gama de outros micropoluentes.<sup>86,89,90</sup> CBM também são tóxicos para outras enzimas, a exemplo das polifenoloxidasas lacase (LAC) e tirosinase (TIR), embora a literatura especializada ainda seja bastante limitada.<sup>88,90-92</sup>

Lacases (LAC, E.C. 1.10.3.2, p-benzenodiol: oxigênio oxidoreductase) são glicoproteínas diméricas ou tetraméricas pertencentes ao grupo das oxidases azuis.<sup>81,88</sup> Essas enzimas podem ser extraídas de plantas superiores, fungos e bactérias e são consideradas excelentes biocatalisadores para a oxidação de derivados de polifenóis, anilinas e tióis.<sup>81,88,92</sup> A fonte de extração da enzima influencia fortemente a eficiência catalítica, o mecanismo de indução a oxidação, grau de polimorfismo, propriedades cinéticas e físico-químicas. Em geral, LAC possui quatro átomos de cobre que catalisam a redução de oxigênio molecular a água, sem a produção de peróxido de hidrogênio, paralelo à abstração de um elétron de um dado substrato/eletrófilo. Os átomos de cobre estão distribuídos em diferentes sítios de ligação na estrutura enzimática e são classificados em três tipos, de acordo com as características espectroscópicas e funcionais: Tipo 1 mononuclear ou azul, Tipo 2 mononuclear ou normal e Tipo 3 binuclear com propriedades antiferromagnéticas.<sup>88</sup> Na verdade, os sítios Tipo 2 e 3 atuam como um aglomerado trinuclear composto por um sítio Tipo 2 e dois sítios Tipo 3. Com base no potencial de eletrodo padrão do sítio T1, as cobre-oxidases são classificadas em enzimas de potencial alto, médio ou baixo. LAC consegue oxidar somente substratos com potencial de ionização menores ou levemente maiores que o potencial redox do átomo de cobre do sítio T1.<sup>93</sup> Assume-se que o sítio T1 de LAC recebe os elétrons do substrato, gerando um cátio-radical ou cátion intermediário, e os transfere para os três átomos de cobre do aglomerado T2/T3, onde o oxigênio molecular é reduzido água.<sup>88,90,93</sup> Assim, os sítios T1 determinam a eficiência da catálise da oxidação dos substratos, onde LAC com alto potencial redox no sítio T1 são as mais promissoras para aplicações biotecnológicas.<sup>93</sup>

Tirosinases (TIR, E.C. 1.14.18.1, monofenol monoxigenase) são enzimas tetraméricas, com dois sítios ativos por molécula, sendo cada um desses sítios formados por dois átomos de cobre coordenados com histidinas.<sup>88,91</sup> Elas são amplamente distribuídas por toda a escala filogenética (de bactérias a mamíferos), podendo apresentar diferentes características cinéticas e termodinâmicas de acordo com a fonte de extração, mesmo que seja de um mesmo organismo, como normalmente acontece nas folhas e raízes de plantas superiores.<sup>91</sup> TIR possui atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e oxidase (difenolase) para *o*-difenóis. Concomitantemente ao processo de oxidação do derivado fenólico, a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular, sendo que o forte poder oxidante do oxigênio torna a reação global irreversível.<sup>94</sup> A catálise da oxidação de compostos fenólicos está relacionada ao estado de oxidação dos íons cobre, podendo ser do tipo *met* [ $\text{TIR}_{\text{met}}(\text{Cu}_2^{4+})$ ], *deoxi*

[TIR<sub>deoxi</sub>(Cu<sub>2</sub><sup>2+</sup>)] e *oxi* [TIR<sub>oxi</sub>(Cu<sub>2</sub><sup>4+</sup>...O<sub>2</sub><sup>2-</sup>)].<sup>88,94</sup> Em preparações recentes de TIR, a forma TIR<sub>met</sub>(Cu<sub>2</sub><sup>4+</sup>), um estado monofenolase inativo, é predominante, enquanto a forma TIR<sub>oxi</sub>(Cu<sub>2</sub><sup>4+</sup>...O<sub>2</sub><sup>2-</sup>), estado monofenolase ativo, existe apenas em pequenas proporções, justificando o valor reduzido da velocidade inicial de reação de oxidação.<sup>94</sup>

Existem várias estratégias para a imobilização destas enzimas sobre o sensor, com destaque para *cross-linking* com reagentes multifuncionais (por exemplo, glutaraldeído e compostos similares), adsorção direta sobre filmes condutores, ligação covalente em superfícies previamente modificadas, *entrapment* da enzima em matriz sol-gel ou em micela reversa, eletrodeposição em matriz polimérica e *drop coating*.<sup>87-88</sup> Acredita-se que o processo de imobilização atrelado à conservação da atividade enzimática é a etapa mais crítica no desenvolvimento de biossensores enzimáticos, podendo comprometer a viabilidade e a vida útil do dispositivo.<sup>81,86,89</sup> Em geral, métodos de imobilização química (por exemplo, formação de ligações covalentes) tendem a reduzir a atividade das enzimas por afetarem sua estrutura natural. Em contraste, permitem uma imobilização mais eficiente e atribuem maior estabilidade ao dispositivo. Métodos físicos (por exemplo, *entrapment* e *drop coating*), normalmente, não afetam a natureza das enzimas, mas conferem menor aderência do bioelemento à superfície de trabalho.<sup>88</sup>

Eletrodos compósitos à base de nanomateriais carbonáceos (nanotubos de carbono e grafeno) estão entre os transdutores mais usados para converter processos de biorreconhecimento em um sinal eletroanalítico mensurável.<sup>63,81</sup> Esses materiais possuem alta versatilidade para modificações químicas e biológicas que, somando-se às suas excelentes propriedades elétricas, catalisam os processos redox dos analitos e reduzem problemas associados à passivação e à contaminação da superfície de trabalho.<sup>63,81,88</sup> No entanto, para aumentar a estabilidade, vida útil dos biossensores enzimáticos, estratégias de imobilização direta e indireta e fixação do bioelemento ativo devem ser mais investigadas, a fim de desenvolver dispositivos com melhor custo-benefício.<sup>63,95</sup> Esse aspecto é um dos maiores desafios para a comercialização destes dispositivos.<sup>86</sup>

## 2. ESTADO DA ARTE

Em geral, CBM sofrem processos de oxidação em potencial elevados (1,25 V a 1,45 V).<sup>81,96</sup> Apesar da determinação direta oferecer melhor custo-benefício, dependendo da superfície e do pH de trabalho, o processo redox destes pesticidas pode vir acompanhado de desprendimento de oxigênio, que afeta negativamente a relação sinal/ruído e compromete a sensibilidade do método. Intervalos de potencial elevados também tornam a medida mais susceptível a interferentes e prejudicam a seletividade do método. Por conta disso, a derivatização de CBM por hidrólise alcalina, para convertê-los em seus respectivos derivados fenólicos, também tem sido utilizada como alternativa para a eletroanálise desses micropoluentes.<sup>96</sup> Apesar da derivatização apresentar vantagens frente ao método direto (reduzido desprendimento de oxigênio por se determinar os produtos da hidrólise em potenciais menos positivos), a oxidação de compostos fenólicos acarreta a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo, afetando a repetibilidade das medidas e a precisão do método proposto.<sup>88,96</sup>

Nesse contexto, Rao *et al.*<sup>96</sup> estudaram a eficiência do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) na oxidação direta e detecção dos CBM carbaril, carbofurano, bendiocarbe e 2-benzimidazolcarbamato de metila, antes (1,45 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>) e após (0,90 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>) o processo de hidrólise alcalina. Dados obtidos por voltametria cíclica (VC), em meio de solução mista de NaClO<sub>4</sub> (0,10 mol L<sup>-1</sup>), NaOH (0,02 mol L<sup>-1</sup>) e ácido acético glacial (99,9%) a pH 3,2, indicaram que a derivatização desses compostos permite aumento na sensibilidade em relação ao método direto, com valores de LD variando entre 0,6 e 1,0 ng mL<sup>-1</sup>. A sensibilidade alcançada com o EDDB, sem o processo de derivatização, foi similar à obtida por técnicas convencionais como CLAE e imunoensaio enzimático (ELISA), mas após a hidrólise torna-se consideravelmente superior. Os autores ainda mostraram que produtos da hidrólise dos CBM passivam a superfície do EDDB, comprometendo a sensibilidade do dispositivo. Todavia, esse problema pôde ser superado pelo tratamento anódico da superfície (aplicação de 3,0 V por 30 minutos), garantindo a estabilidade do dispositivo e reprodutibilidade das medidas.

Wei *et al.*<sup>97</sup> também utilizaram o processo de oxidação do carbofurano sobre eletrodos de carbono impressos (SPCE, do inglês *screen-printed carbon electrode*) para quantificá-lo em amostras artificialmente contaminadas de água, solo e vegetais. A determinação foi realizada de forma indireta, com base na hidrólise deste pesticida (0,20 V *vs.* ECS), obtida por aquecimento a

70° C, em meio de tampão borato pH 10,0. Com a otimização dos parâmetros experimentais e utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD), foi obtido LD de  $5,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e valores de REC variando entre 87,0 e 98,2%, para contaminações de  $10 \times 10^{-6}$  e  $20 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. No entanto, alguns autores concluíram que a instabilidade térmica é um fator que deve ser bem avaliado ou evitado em trabalhos com CBM.<sup>43,45</sup>

O processo de redução de CBM também tem sido utilizado como alvo em estudos eletroanalíticos. No entanto, o caráter adsorptivo das moléculas e, em alguns casos, os elevados potenciais negativos restringem as pesquisas a um número reduzido de superfícies de trabalho, com destaque para eletrodos de mercúrio.<sup>98-100</sup> Qiu e Ni<sup>98</sup> determinaram ziram em tomate, repolho e batata, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês *hanging mercury drop electrode*) como sensor de trabalho. Os autores estudaram diferentes técnicas eletroanalíticas a fim de atribuir maior sensibilidade ao método e observaram que a intensidade do processo redox do ziram ( $\approx 1,25$  V vs. Ag/AgCl/Cl<sub>sat</sub>) obtido por voltametria de onda quadrada (VOQ), em meio de tampão Britton-Robinson (BR) pH 2,78, chega a ser quatro e duas vezes maior que o observado por VC e VPD, respectivamente. O valor de LD ( $0,0072$  µg mL<sup>-1</sup>) obtido com o método permitiu REC variando entre 93,0 e 98,0%, para contaminações de  $0,04$  µg mL<sup>-1</sup>. Considerando que ziram possui íons Zn<sup>2+</sup> na sua estrutura, o estudo de interferentes contemplou os cátions Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup>, em uma concentração dez vezes maior que a do analito. Todavia, como o método de extração foi baseado em um processo de partição líquido/líquido em meio de acetona, a migração dessas espécies para a célula eletroquímica foi minimizada e o efeito matriz negligenciado.

Rajasekhar reddy *et al.*<sup>99</sup> desenvolveram um método para determinar metiocarbe em amostras de solo e água, empregando HMDE e voltametria adsorptiva de pulso diferencial. As condições experimentais e voltamétricas otimizadas foram: tampão BR pH 4,0, amplitude dos pulsos de potencial (*a*) de 25 mV, aplicando -0,35 V por 60 s. Nessas condições, o processo de redução do analito foi registrado em 0,43 V vs. Ag/AgCl/Cl<sub>sat</sub>, obtendo-se valores de LD de  $1,80 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e REC de 97,5-100,0% em amostras de água e de 93,0-99,6 % em amostras de solo, para contaminações de 0,5 a 6,0 µg mL<sup>-1</sup>. Os autores também afirmaram que o procedimento em questão pode ser uma alternativa à análise cromatográfica, utilizada como padrão para o monitoramento de metiocarbe, em termos de custo e de tempo de análise.

Pushpalatha *et al.*<sup>100</sup> utilizaram o eletrodo gotejante de mercúrio (DME, do inglês *dropping mercury electrode*) para detectar um dos principais metabólitos da oxidação do aldicarbe, conhecido como aldicarbe-sulfona. A quantificação foi realizada por VPD, em meio de tampão BR pH 2,0;  $a$  de 50 mV e intervalos de 2 s entre cada nova gota de mercúrio. Nessas condições e utilizando o processo de redução do analito em 1,10 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>, foram calculados LD de  $1,80 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e REC de 98,97-99,21 % em formulações agroquímicas comerciais, de 98,20-99,40% em solos e de 97,25-99,00% em águas naturais, para concentrações de aldicarbe-sulfona da ordem de 0,5 a 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. Os autores ainda destacaram que as medidas foram realizadas com baixa interferência de excipientes e sem a necessidade de grande número de etapas para o preparo das amostras.

Hitchman e Ramanathan<sup>101</sup> quantificaram bendiocarbe em solos utilizando polarografia de pulso diferencial. O processo de redução do analito sobre DME foi observado em -0,94 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>. Para a aplicação do procedimento (tampão acetato pH 5,0;  $a$  de 60 mV e velocidade ( $v$ ) de 5 mV s<sup>-1</sup>), as amostras de solo foram previamente tratadas por um processo de extração sólido/líquido (refluxo do solvente a frio) em meio de diclorometano por trinta minutos. Os autores não apresentaram o valor de LD, mas afirmaram ter dificuldades em detectar o composto em concentração menor que 10 mg L<sup>-1</sup>, sendo esta uma das principais limitações do método. Para contaminações de 1,0% (m/m), o percentual de recuperação do método de extração variou de 42,7 a 80,8%. A separação por cromatografia líquida também foi avaliada, mas sem êxito por conta da instabilidade do analito. Os autores propuseram que a derivatização do bendiocarbe por nitração poderia ser uma alternativa para aumentar a sensibilidade do método, mas reconheceram a necessidade de estudos posteriores para a validação da metodologia.

Em função do efeito toxicológico do mercúrio e da quantidade de resíduos gerados, novos sensores passaram a ser investigados a fim de se desenvolver procedimentos eletroanalíticos mais limpos, sem perder de vista a sensibilidade singular dos transdutores à base desse metal.<sup>96</sup> Nesse contexto, Swarupa *et al.*<sup>102</sup> utilizaram eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) modificado com filme de polianilina (PANI, polímero condutor que apresenta boa adesão sobre diferentes superfícies eletródicas, alta estabilidade e condutividade elétrica) para determinar traços do ditiocarbamato mancozeb em leite bovino e em sangue humano. A quantificação foi realizada por DPV, com base no processo de redução do analito (-0,43 V *vs.* ECS) em meio de tampão acetato pH 4,5. A sensibilidade obtida, com base no LD =  $2,60 \times 10^{-8}$

mol L<sup>-1</sup>, permitiu a aplicação do procedimento para quantificar mancozeb em amostras de leite e de sangue. REC variou entre 95,2 e 99,0% em leite e entre 92,2 e 98,8% em sangue, para contaminações de 4,0×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> a 8,0×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Apesar da toxicidade atribuída à PANI, a simplicidade de preparo e o custo acessível fazem dos eletrodos modificados com este polímero ferramentas promissoras para a análise de ditiocarbamatos em amostras ambientais.

Moraes *et al.*<sup>103</sup> também avaliaram as potencialidades dos eletrodos modificados (EM) na determinação de carbaril em águas naturais. Nesse caso, o sensor de trabalho era constituído por GCE modificado por nanotubos de carbono com paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) e ftalocianina de cobalto (Ft-Co). A determinação foi realizada por VOQ em meio de tampão acetato pH 4,0, utilizando o processo de oxidação do analito registrado em 0,80 V vs. ECS. Com a otimização dos parâmetros da VOQ, ou seja, frequência de aplicação de pulsos de potencial ( $f$ ) de 20 s<sup>-1</sup>,  $a$  de 100 mV e incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) de 2 mV, foi calculado LD igual a 5,46×10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>, permitindo a quantificação de carbaril em águas naturais, sem qualquer etapa de extração, *clean-up* ou derivatização do analito. Para contaminações de 1,66×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, os valores de REC variaram de 91,9 a 97,6%. Os ensaios também não foram afetados pela presença de matéria orgânica, possibilitando a análise de carbaril em águas naturais de forma direta e em tempo real.

Diante do exposto, biossensores possuem maior caráter seletivo e/ou específico e são mais adequados para a análise destes compostos, particularmente, biossensores enzimáticos.<sup>27</sup> Há uma série de trabalhos de revisão constatando que a AChE é enzima mais utilizada no biossensoriamente CBM, além de diversos outros contaminantes.<sup>27,53,64,72,84,86,89-92,95</sup>

Eletrodos compósitos de carbono estão entre os suportes eletródicos mais empregados para a imobilização AChE, por conta da versatilidade para modificação, biocompatibilidade e condutividade elétrica adequada como transdutor.<sup>64,88,90,95</sup> Caetano e Machado<sup>104</sup> desenvolveram biossensor amperométrico para determinação de carbaril em amostras de tomate *in natura*, sem qualquer tratamento prévio. O biossensor era constituído da enzima AChE dispersa em material compósito contendo pó de grafite e Nujol<sup>®</sup> 70:30% (m/m), Ft-Co e glutaraldeído para *cross-linking*. Os experimentos foram empregaram VOQ ( $f$  de 50 s<sup>-1</sup>,  $a$  de 50 mV e  $\Delta E_s$  de 2 mV) em meio de tampão fosfato (PBS) pH 7,4, aplicando 0,1 V vs. Ag/AgCl/Cl<sub>sat</sub><sup>-</sup> para promover a oxidação do substrato acetiltiocolina (ATCh), em um tempo de incubação de oito minutos. Como valor de LD = 4,0×10<sup>-4</sup> g L<sup>-1</sup>, os autores conseguiram quantificar carbaril inserindo o biossensor

diretamente na polpa do tomate, resultando em REC de 92,4% ( $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e 99,0% ( $6,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Esses valores de recuperação foram superiores aos encontrados por CLAE (REC variando entre 78,3 e 84,8%), embora o LD ( $3,2 \times 10^{-6}$  g L<sup>-1</sup>) do método cromatográfico seja duas ordens de grandeza menor.

Zamfir *et al.*<sup>105</sup> também utilizaram biossensor à base de AChE para quantificar neostigmina e eserina, dois importantes CBM com ação terapêutica. Nesse caso, a enzima foi imobilizada por *drop coating* na superfície de eletrodos de pasta de carbono. Os sensores foram construídos pelo método sol-gel, empregando um líquido iônico composto por tetratiofulvaleno e tetracianoquinodimetano. Os experimentos cronoamperométricos foram realizados aplicando 0,4 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> por um período de 10 s para oxidar ATCh em PBS pH 8,0. Segundo os autores, a sensibilidade do método obtida para neostigmina (LD =  $3,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>) e eserina (LD =  $2,60 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>) é a maior apresentada na literatura até o presente momento. Tendo em vista o risco associado à presença de inibidores da AChE no ambiente, o procedimento foi utilizado para quantificar traços ( $1,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) de neostigmina (REC variando entre 78,0 e 103,2%) e eserina (REC variando entre 85,8 e 114,4%) em águas naturais.

Martorell *et al.*<sup>106</sup> construíram biossensores enzimáticos utilizando eletrodos biocompósitos contendo 18% de pó de grafite, 71% de resina epóxi não condutora, 9% do mediador redox 7,7,8,8-tetraciaboquinodimetano (TCNQ) e 2% da enzima AChE ou butirilcolinesterase (BChE) imobilizada em partículas de sílica funcionalizadas com grupamentos amina. A eficiência desses dispositivos na determinação de CBM e organofosforados foi avaliada por VC (velocidade de varredura não informada) em solução equimolar de cloreto de potássio e fosfato de sódio pH 7,0, aplicando 0,7 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> para oxidar ATCh ou butirilticolina (BTCh) como substratos. O biossensor à base de AChE mostrou sensibilidade adequada para carbofurano (LD = 2,2 µg L<sup>-1</sup>), carbaril (LD = 2,0 µg L<sup>-1</sup>) e paraoxon (LD = 27,5 µg L<sup>-1</sup>), enquanto o biossensor à base de BChE foi sensível para carbofurano (LD = 22,1 µg L<sup>-1</sup>), paraoxon (LD = 2,8 µg L<sup>-1</sup>) e clorfenvifós (LD = 3,6 µg L<sup>-1</sup>). Embora esses dispositivos apresentem respostas estáveis e reprodutíveis, estas variáveis podem ser influenciadas pela depleção do biocompósito, pela renovação da superfície de trabalho a cada polimento.

Ciucu *et al.*<sup>107</sup> trabalharam com sistema bi-enzimático para determinar aldicarbe, carbofurano e os organofosforados paraoxon e monocrotofós. O transdutor era similar ao mencionado anteriormente, consistindo de eletrodo de pasta de carbono modificado com



ftalocianina de ferro (2,0%, m/m). A imobilização das enzimas AChE e colina oxidase (ChO) foi realizada em uma membrana de diálise, por meio da interação entre os grupos  $\text{Cl}^-$  da membrana funcionalizada com os grupo  $\text{NH}_2$  terminais das enzimas, em meio de PBS pH 6,5 por quatro horas. A membrana foi adaptada sobre o eletrodo modificado com um o-ring e o dispositivo resultante foi utilizado na quantificação dos pesticidas. O substrato acetilcolina (ACh) se hidrolisa em colina que, por sua vez, se oxida paralelamente à conversão de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,35 V vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat}}$ ). O procedimento amperométrico permitiu a obtenção de valores de LD da ordem de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ . Além das potencialidades do dispositivo para a análise destes pesticidas em amostras ambientais, outra importante vantagem do método foi a eficiência de imobilização enzimática, uma vez que, mantendo as membranas armazenadas a 4 °C, a atividade de AChE e ChO sofreu redução de apenas 2,0% em um período de seis meses.

Outro sensor derivado de carbono utilizado na configuração eletródica de biossensores é o GCE. Estudos revelaram que a modificação dessa superfície com materiais nanoestruturados proporciona importantes melhorias em suas propriedades eletrônicas.<sup>61-64,83-86,90,95</sup> Liu *et al.*<sup>87</sup> modificaram GCE com material compósito (grafeno reduzido, nanopartículas de ouro e ácido 3-carboxi-fenilborônico) para desenvolver um biossensor enzimático à base de AChE capaz de quantificar CBM e organofosforados. O dispositivo foi construído em quatro camadas, imobilizadas por *drop coating*: (i) grafeno reduzido disperso em matriz de quitosana, (ii) suspensão coloidal de nanopartículas de ouro, (iii) solução do ácido 3-carboxi-fenilborônico e (iv) solução da enzima AChE. A metodologia cronoamperométrica foi desenvolvida pela aplicação de 0,7 V vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat}}$  por 15 minutos, utilizando o substrato ATCh, em meio de PBS pH 7,0. Os valores de LD obtidos para carbofurano (0,05 ppb), isoprocarbe (0,5 ppb), clorpirifós (0,1 ppb) e malation (0,5 ppb) indicaram que este dispositivo pode ser utilizado para quantificá-los em matrizes ambientais complexas. Os autores também constataram alta estabilidade do dispositivo (redução de 10% da resposta inicial para um período de trinta dias), que foi atribuída à provável esterificação entre os grupos do ácido borônico e as glicoproteínas da enzima.

Xue *et al.*<sup>108</sup> propuseram estratégia inovadora para imobilizar AChE sobre GCE por adsorção não-covalente. GCE foi modificado com MWCNT, seguido de camada à base de fibroína de seda (polímero natural, extraído do casulo do bicho da seda, com alta resistência mecânica, estabilidade térmica e biocompatibilidade) e posterior imobilização enzimática. O

biossensoriamento foi realizado por amperometria, em meio de PBS pH 7,0, aplicando potencial de 0,65 V *vs.* ECS para oxidar ATCh, em um tempo de incubação de dez minutos. O aumento de concentração de carbamatos e de organofosforados apresentaram uma dependência logarítmica frente à inibição da AChE. Os valores de LD obtidos para a quantificação de carbaril ( $6,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e paration ( $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) permitiram a determinação de traços desses compostos. Os valores de REC em amostras de alface e de repolho variaram entre 97,6 e 101,3% para contaminações de  $3,80 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Após quatro semanas de armazenagem, o biossensor ainda exibia 80% do valor inicial da resposta de corrente, sugerindo que a matriz de fibroína é um microambiente biocompatível para preservar a atividade biológica da AChE.

Cesarino *et al.*<sup>109</sup> desenvolveram método cronoamperométrico para determinar traços de carbaril e metomil em frutas e vegetais. A configuração eletródica do biossensor constava de GCE modificado com camada híbrida composta por estruturas *core-shell* de MWCNT (*core*) recobertos por camada compacta de PANI (*shell*). Após eletropolimerização do filme (varreduras entre -0,2 e 0,8 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> a 50 mV s<sup>-1</sup>), AChE foi imobilizada sobre eletrodo modificado por *drop coating*. O procedimento cronoamperométrico utilizou ACh como substrato, aplicando 0,3 V *vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> para promover oxidação em meio de PBS pH 7,0, com tempo de incubação de 10 minutos. A sensibilidade obtida com o dispositivo na determinação de carbaril (LD =  $1,4 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e metomil (LD =  $9,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) atendeu aos limites máximos exigidos pela ANVISA para resíduos deste composto em produtos hortifrúti. REC obtidas para amostras de maçã, artificialmente contaminadas com carbaril (9,9 - 29,7 μmol L<sup>-1</sup>), variaram entre 97,3 e 103,4%. O dispositivo também foi utilizado para quantificar traços (4,9 - 14,7 μmol L<sup>-1</sup>) de metomil presentes em amostras de repolho e de brócolis. Os valores encontrados foram comparáveis aos obtidos por CLAE. O dispositivo foi construído sem a necessidade de qualquer mediador redox ou reagente para *cross-linking*, o que representa importante avanço no desenvolvimento de biossensores.

Sun *et al.*<sup>110</sup> modificaram a superfície do GCE com camada híbrida de MWCNT e grafeno dispersos em cloreto de poli(dialildimetilamônio) – polieletrólito catiônico solúvel em água que auxilia na dispersão das nanoestruturas de carbono em água e na formação de filmes compósitos finos sobre superfícies eletródicas – com posterior imobilização de AChE por *drop coating* sobre o eletrodo modificado. Este biossensor foi utilizado para quantificar carbaril por VPD, utilizando ATCh como substrato, em meio de PBS pH 7,0, com tempo de incubação de doze minutos.

Nessas condições, foi possível quantificar carbaril (LD = 0,13 ng mL) em repolho (REC = 93,1-97,1%), crisântemo (REC = 92,3-105%), alho francês (REC = 106-107%) e *pak-choi*/repolho chinês (REC = 95,3-106%) em níveis de concentração variando entre 10,0 e 100 ng mL<sup>-1</sup>, com elevada precisão dos resultados. A intensidade do sinal reduziu para 87% da resposta inicial em um período de 30 dias, indicando adequada estabilidade para o biossensor enzimático.

O crescente interesse por sistemas miniaturizados e com possibilidade para aplicação *in loco*, tem atraído a atenção de alguns pesquisadores para o desenvolvimento de bio-dispositivos a partir de eletrodos impressos.<sup>111,112</sup> Hildebrandt *et al.*<sup>111</sup> apresentaram um protótipo de biossensor enzimático portátil para detectar CBM e organofosforados em alimentos e águas naturais. Os dispositivos foram construídos pela imobilização de AChE sobre eletrodos de grafite impresso com auxílio de álcool polivinílico com propriedades fotopoliméricas. As medidas foram realizadas por amperometria com base na oxidação da ATCh, aplicando 0,1 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> e utilizando tempo de incubação de vinte minutos, em solução equimolar de fosfato de sódio e cloreto de potássio pH 8,0. O procedimento permitiu a detecção de carbofurano, carbendazim, metomil, clorpirifós, clorfenvifós, pirimifós metílico e malation com valores de LD variando entre 0,5 e 2,0 µg L<sup>-1</sup>. As medidas eletroquímicas foram comparáveis às obtidas por CLAE para quantificar resíduos dos pesticidas, da ordem de µg L<sup>-1</sup>, em águas naturais, chás, sucos de laranja, leite e champanhe.

Valdés-Ramírez *et al.*<sup>112</sup> trabalharam com três diferentes biossensores enzimáticos para quantificar carbofurano, carbaril, metil-paraoxon e diclorvós. Um dos dispositivos foi construído com AChE extraída de enguias elétricas e os demais com AChE geneticamente modificadas (B1 e B394) e extraídas de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. As enzimas foram imobilizadas por *entrapment* em fotopolímero contendo unidades de azida. Os experimentos foram realizados em PBS pH 7,0, na presença de 5,0% de acetonitrila a fim de manter a integridade da enzima, utilizando ATCh como substrato e tempo de incubação de dez minutos. Os valores de LD variaram de acordo com o elemento de biorreconhecimento utilizado, ou seja, AChE (3,8×10<sup>-8</sup> - 1,6×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>), AChE-B1 (4,5×10<sup>-9</sup> - 1,6×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>) e AChE-B394 (9,6×10<sup>-11</sup> - 1,7×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>). Em outras palavras, os dispositivos contendo as enzimas geneticamente modificadas são mais sensíveis para a análise dos CBM e organofosforados em questão. O biossensor à base de AChE-B1 foi utilizado na quantificação de carbaril (4,2×10<sup>-7</sup> mol

L<sup>-1</sup>) e carbofurano ( $5,1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e o de AChE-B394 para quantificar metil-paraoxon ( $1,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e diclorvós ( $2,3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>) em maçãs contaminadas pela atividade agrícola.

Bucur *et al.*<sup>113</sup> também trabalharam com biodispositivos à base de AChE de *Drosophila melanogaster* e diferentes mutantes (E69W, I161V e Y370A) para determinar resíduos de CBM em água potável. Eletrodos impressos com pasta de grafite contendo TCNQ como mediador redox foram utilizados como base eletródica para a imobilização da enzima e dos mutantes. Os ensaios eletroquímicos foram realizados por amperometria, aplicando 0,1 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> para promover a oxidação da ATCh, em meio de PBS pH 7,0, para um tempo de incubação de 20 minutos. Todos os biossensores apresentaram desempenho analítico adequado para a determinação dos CBM, mas a maior sensibilidade para carbaril (LD =  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) foi observada em Y370A, para carbofurano em I161V (LD =  $8,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>) e para pirimicarbe (LD =  $2,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) em E69W. A aplicação do procedimento em águas naturais resultou em REC variando entre 87 e 112%, para contaminações de  $5,0 \times 10^{-8}$  de carbaril,  $5,0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de carbofurano e  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de pirimicarbe. Os autores ainda reforçaram que o êxito na aplicação destes dispositivos ainda pode ser melhorado pela introdução de múltiplas modificações na estrutura da mesma proteína.

A tecnologia das camadas automontadas (SAM, do inglês *Self-Assembled Monolayers*) também têm apresentado importante papel na configuração de biossensores, no que diz respeito à eficiência na imobilização do bioelemento e estabilidade do dispositivo.<sup>114</sup> Pedrosa *et al.*<sup>115</sup> desenvolveram biossensor amperométrico para carbaril e paration, a partir de AChE imobilizada sobre eletrodo de ouro modificado com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico. Os ensaios eletroquímicos foram realizados por VC a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , em meio de PBS pH 7,2, aplicando 0,28 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> para promover a oxidação da ATCh. Os valores de LD obtidos para a aplicação do método em águas naturais variaram entre 9,0 e 10,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com REC entre 94-96% em águas de naturais e entre 92-101% em frutas como tomate, maçã e laranja, para contaminações de  $6,0 \times 10^{-6}$  e  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Os autores também destacaram que o mesmo protocolo utilizado na imobilização enzimática pode ser estendido a outras moléculas biológicas como anticorpos, antígenos, DNA, etc., para o biossensoriamento de micropoluentes.

Cancino *et al.*<sup>116</sup> imobilizaram AChE sobre eletrodo de ouro modificado com SAM mista composta de ácido 11-mercaptopundecanóico e 2-mercaptopetanol. A mistura desses alcanotióis apresenta uma série de vantagens que superam as apresentadas por dispositivos construídos com

apenas uma dessas substâncias: facilidade para formação de filmes finos, boa aderência, alta permeabilidade, biocompatibilidade, resistência mecânica, susceptibilidade para modificações químicas e transferência de carga facilitada. O biossensor em questão permitiu a oxidação de ATCh em 0,31 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>, sem a necessidade de qualquer mediador redox. Os ensaios cronoamperométricos em meio de PBS pH 6,5 foram realizados para um tempo de incubação de 10 minutos. Nessas condições, calculou-se LD = 3,5×10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup> para a determinação eletroanalítica de carbaril em eletrólito de suporte, sugerindo a potencial aplicação deste procedimento em amostras complexas. Quanto à estabilidade do dispositivo, em um estudo comparativo entre 50 diferentes medidas realizadas ao longo de 15 dias se constatou 75% de seu desempenho inicial, indicando que a SAM mista também apresenta biocompatibilidade para a imobilização e conservação da atividade enzimática.

Kim *et al.*<sup>117</sup> estudaram o efeito da imobilização da AChE na construção de um biossensor piezolétrico. Para a imobilização da enzima, foram avaliadas duas estratégias: (i) *cross-linking* com um reagente heterobifuncional, hexanoato de sulfo-succinimidil-6-[3-(2-piridilditio) propionamida] e (ii) quimisorção por acoplamento entre grupos amínicos das enzimas e carboxílicos de SAMs do ácido de 3-mercaptopropiônico. A sensibilidade dos dispositivos foi avaliada por ensaios de ganho de massa em microbalança eletroquímica de cristal de quartzo em meio de PBS pH 8,0, utilizando ACh como substrato e tempo de incubação de cinco minutos (o potencial aplicado não foi informado). A imobilização da AChE com o composto heterobifuncional foi mais eficiente e o biossensor resultante apresentou maior sensibilidade para a análise de carbofurano (LD = 1,30×10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) e do organofosforado EPN (LD = 1,55×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>). Também foi constatada elevada precisão das medidas, com baixa dispersão dos resultados, sugerindo que este procedimento pode ser estendido para a análise destes pesticidas em amostras reais.

Biossensores à base de polifenoloxidasas também têm potencial na análise de CBM, embora o número de publicações ainda seja restrito.<sup>71,81,88,90,91,108</sup> Com exceção de trabalhos recentes publicados no GELCORR,<sup>81,118</sup> também se encontra as contribuições de Campanella *et al.*<sup>119</sup> que avaliaram alternativas para analisar CBM (aldicarbe e carbaril) e organofosforados (paraoxon, malation e etilparation) em fase orgânica. Para isso, os autores construíram um biossensor enzimático, imobilizando TIR sobre um transdutor amperométrico de oxigênio (eletrodo tipo Clark), com o auxílio de géis de kappa-carragena (polissacarídeos sulfatados

contendo 25-30% de éster sulfato e 28-35% de 3,6-anidrogactose). Um biossensor bi-enzimático (BChE e ChO) também foi construído de forma similar, a fim de comparar a sensibilidade do biossensor mono-enzimático na determinação dos pesticidas. As medidas foram realizadas em água saturada com clorofórmio (biossensor mono-enzimático) ou em mistura clorofórmio/hexano (1:1, v/v, biossensor bi-enzimático), utilizando fenol como substrato. Independente da classe de pesticidas estudada (carbamatos e organofosforados), a sensibilidade ( $LD = 5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) e o tempo de análise (tempo de resposta + tempo de incubação variando entre 15 e 22 minutos) observados para o biossensor à base de TIR foi mais adequado para fins analíticos. Assim, este dispositivo foi empregado para quantificar carbaril (REC de 88-99%) e paraoxon (REC de 75-90%) separadamente ou como mistura binária carbaril/paraoxon (REC de 65-94%) em águas naturais, com elevada precisão nas medidas.

O trabalho desenvolvido por De Albuquerque e Ferreira<sup>120</sup> apresenta o desenvolvimento de biossensor enzimático utilizando eletrodos de grafite impressos, modificados com Ft-Co e posterior imobilização enzimática. A TIR foi empregada como elemento de biorreconhecimento e foi imobilizada por *cross-linking* com glutaraldeído e albumina de soro bovino. O estudo foi realizado por VC a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , em meio de PBS pH 6,5, aplicando  $-0,20 \text{ V vs. Ag/AgCl/Cl}^{-1}_{\text{sat}}$  para promover a oxidação do catecol como substrato, por um tempo de incubação de 2 minutos. Nessas condições, foram observadas relações lineares para carbaril (10-50 ppb), carbofurano (5-90 ppb), diazinon (19-50 ppb) e metilparation (6-100 ppb), permitindo a quantificação desses compostos em águas naturais com REC de 92,5-98,5%. O tempo de vida útil atribuído para o dispositivo foi de dez dias, uma vez que após quinze dias o desempenho do biossensor foi reduzido a 20% de sua resposta inicial.

Fernandes *et al.*<sup>121</sup> produziram um biossensor sensível para detectar metomil em vegetais, utilizando transdutores de carbono cerâmico modificados com LAC pelo método sol-gel. A quantificação foi realizada por VOQ ( $f$  de  $30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a$  de  $100 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s$  de  $10 \text{ mV}$ ), em meio de tampão acetato pH 4,0 e utilizando esculetina como substrato. Com LD igual a  $1,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , o procedimento permitiu quantificar metomil em cenoura, repolho, alface, pimentão, batata e tomate com REC variando entre 98,0 e 104,2%, para contaminações de  $5,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores de REC foram similares aos obtidos por CLAE, sugerindo alta sensibilidade e precisão das medidas. O dispositivo também apresentou elevada estabilidade, avaliada por 450 medidas feitas ao longo de 60 dias (porcentagem de redução do sinal não informada).

Zapp *et al.*<sup>122</sup> apresentaram biossensor enzimático para metomil, sendo que a enzima LAC, extraída do fungo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, foi imobilizada em matriz condutora composta de nanopartículas de platina e do líquido iônico tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazol suportados em montmorilonita. Com a otimização dos parâmetros da VOQ ( $f$  de  $60 \text{ s}^{-1}$ ,  $a$  de  $100 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s$  de  $8 \text{ mV}$ ), em meio de tampão acetato pH 5,5 e utilizando dopamina como substrato fenólico, foi possível quantificar metomil com  $LD = 2,35 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . O procedimento proposto foi utilizado na análise do analito em tomate ( $2,70 \times 10^{-6}$  a  $7,50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e cenoura ( $1,39 \times 10^{-6}$  a  $4,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), resultando em REC de 85,7-105,9 e 99,6-100,2%, respectivamente. Os resultados para os ensaios de recuperação obtidos com o biossensor enzimático foram comparáveis aos obtidos por CLAE, com medidas precisas e reprodutíveis. Outra grande vantagem do método foi a possibilidade de se analisar metomil, mesmo na presença de potenciais interferentes presentes (ácido ascórbico, ácido benzóico, ditiocarbamato, glucose e cloreto de sódio) com efeito negligenciável da matriz sobre o sinal analítico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como foco principal o desenvolvimento e aplicação de metodologias eletroanalíticas para detectar e quantificar resíduos de *n*-metilcarbamatos em hortaliças e frutas cítricas, utilizando biossensores mono- e bi-enzimáticos à base de polifenoloxidasas como superfícies de trabalho.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar a eficiência de materiais de carbono nanoestruturados, MWCNT e grafeno, na configuração eletródica dos biossensores;
- Avaliar a influência de agentes modificadores (Azul da Prússia, nanopartículas de ouro e quitosana) na resposta eletroquímica e na sensibilidade dos dispositivos;
- Analisar o efeito de diferentes estratégias de imobilização enzimática na estabilidade dos dispositivos e conservação da atividade catalítica das enzimas;
- Investigar o comportamento redox do substrato 4-aminofenol, antes e após a catálise enzimática, sobre os diferentes biossensores;
- Caracterizar os diferentes materiais utilizados na configuração eletródica dos biossensores;
- Otimizar parâmetros operacionais e voltamétricos das metodologias propostas;
- Desenvolver métodos eletroanalíticos para quantificar traços de CBM;
- Aplicar o método QuEChERS para extrair CBM de alimentos naturais;
- Determinar CBM (CBF, FMT e PMB) em amostras de tomate e de alface;
- Determinar CBM (CBF, CBR, FMT, PMB e ZRM) em amostras de tomate e de batata;
- Determinar CBM (CBR, FMT, PPX e ZRM) em amostras de laranja, tangerina e limão.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica (P.A.). Os dados referentes à composição, registro do *Chemical Abstract Service* (CAS) e à procedência dos respectivos reagentes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes utilizados nos experimentos e suas respectivas procedências

Composto	Fórmula química	CAS	Procedência
Carbofurano	$C_{12}H_{15}NO_3$	1563-66-2	
Carbaril	$C_{10}H_7OCONHCH_3$	63-25-2	
Formetanato	$C_{11}H_{15}N_3O_2.HCl$	23422-53-9	Fluka
Pirimicarbe	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	23103-98-2	(Alemanha)
Propoxur	$C_{11}H_{15}NO_3$	114-26-1	
Ziram	$(CH_3)_2NSCSZnSCSN(CH_3)_2$	137-30-4	
Lacase de <i>Trametes versicolor</i>	-	80498-15-3	
Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	-	9002-10-2	
4-aminofenol	$C_6H_7NO$	123-30-8	
N-metil-2-pirrolidona	$C_5H_9NO$	872-50-4	
Ácido tetracloroaurico	$HAuCl_4$	27988-77-8	Sigma-Aldrich
Nitrato de sódio	$NaNO_3$	7631-99-4	(Alemanha)
Cloreto de férrico	$FeCl_3$	7705-08-0	
Hexacianoferrato de potássio	$K_3[Fe(CN)_6]$	13746-66-2	
Cloreto de potássio	$KCl$	7447-40-7	
Permanganato de potássio	$KMnO_4$	7722-64-7	

$\beta$ -caroteno (provitamina A)	$C_{40}H_{56}$	7235-40-7	
Tiamina (vitamina B1)	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	67-03-8	
Ácido ascórbico (vitamina C)	$C_6H_8O_6$	50-81-7	
D(+)-glucose	$C_6H_{12}O_6$	50-99-7	Merck (Alemanha)
Ácido sulfúrico	$H_2SO_4$	7664-93-9	
Hexano	$C_6H_{14}$	110-54-3	
Acetona	$C_3H_6O$	67-64-1	
Etanol	$C_2H_6O$	64-17-5	
Metanol	$CH_4O$	67-56-1	
Óleo de parafina	-	8012-95-1	
Pó de grafite	C	7782-42-5	Ultracarbon (Espanha)
Nanotubos de carbono (MWCNT)	C	308068-56-6	DropSens (Espanha)
Ácido cítrico	$HOC(COOH)(CH_2COOH)_2$	77-92-9	Vetec
Ácido acético	$CH_3CO_2H$	64-19-7	(Brasil)
Ácido bórico	$H_3BO_3$	10043-35-3	ou
Ácido fosfórico	$H_3PO_4$	7664-38-2	Merck
Hidróxido de sódio	NaOH	1310-73-2	(Alemanha)
Citrato de sódio	$HOC(COONa)(CH_2COOH)_2$	18996-35-5	

Fonte: autoria própria.

Solução de tampão BR, utilizada como eletrólito de suporte, foi preparada pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico, todos com concentração de  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ .<sup>123</sup> O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para os biossensores construídos pela imobilização das enzimas por *drop coating*, as soluções das enzimas LAC e TIR foram preparadas em tampão BR, com pH ajustado para o valor onde se observou atividade máxima. A eficiência da atividade enzimática foi avaliada pela oxidação do substrato 4-aminofenol (4-AMF)  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , preparado em meio aquoso.

As soluções estoque dos pesticidas CBF, CBR, FMT, PPB, PPX e ZRM foram preparadas em etanol  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . As soluções padrão foram preparadas por diluição, a partir da solução estoque, até a concentração desejada. Quando armazenadas, as soluções foram mantidas sob refrigeração ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ), respeitando o prazo de validade.

Considerando que vegetais e frutas cítricas são importantes fontes de provitamina A ( $\beta$ -caroteno), vitamina B1 (tiamina), vitamina C (ácido ascórbico), ácido cítrico e glicose, foram preparadas soluções aquosas desses compostos, com concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , para os estudos de interferentes. Essas soluções foram preparadas imediatamente antes das análises.

## 4.2 Síntese do grafeno

O grafeno foi sintetizado no Laboratório Associado para a Química Verde – Tecnologias e Processos Limpos do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto, em Porto-Portugal. O grafeno reduzido foi sintetizado por esfoliação do pó da grafite em meio de N-metil-2-pirrolidona, assistida por sonicação por 6 horas.<sup>124</sup> A dispersão foi centrifugada a 500 rpm por 45 minutos e o sobrenadante, contendo as folhas de grafeno, foi filtrado em membrana de náilon (poros de  $0,2 \mu\text{m}$ , Whatman®). O sólido resultante foi seco sob vácuo a  $\pm 16^\circ\text{C}$ . O grafeno oxidado foi obtido pelo método de Hummers e Offeman, a partir do grafeno reduzido, submetendo-o à reação oxidativa com ácido sulfúrico concentrado, nitrato de sódio e permanganato de potássio.<sup>125</sup>

## 4.3 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (NpAu) foram sintetizadas pelo método de Turkevich, que consiste na redução de ouro (III), na forma de  $\text{HAuCl}_4$  0,01%, pela reação com citrato de sódio e ácido ascórbico, sob agitação a  $90^\circ\text{C}$ .<sup>126</sup> A solução resultante de NpAu ( $1,17 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ) exibiu coloração violeta, característica do diâmetro hidrodinâmico (37 nm) das nanopartículas.

#### 4.4 Instrumentação

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em sistema composto por três eletrodos, conectados a potenciostato modelo PGSTAT 30 (Autolab, Eco Chemie) e controlados por computador, usando o programa GPES versão 4.9. Os biossensores enzimáticos foram utilizados como superfície de trabalho, um tarugo de carbono vítreo como eletrodo auxiliar e  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat}}$  em meio de KCl como eletrodo de referência. Para o processo de esfoliação do grafeno em N-metil-2-pirrolidona assistido por sonicação, utilizou-se sonicador com ponta de titânio (Bandelin Sonoplus). A caracterização do grafeno foi realizada por TEM (do inglês *Transmission Electron Microscopy*), com uso de microscópio modelo H-9000NA (Hitachi), operando a 200-300 kV. A composição química da superfície foi obtida por XPS (do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), utilizando espectrofotômetro modelo ESCALAB 200A (VG Scientific), com radiação de 1486,6 eV. O tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das nanopartículas de ouro foram caracterizados por espalhamento dinâmico da luz e por velocimetria de radiação a laser pelo efeito Doppler, respectivamente, com Zetasizer Nano ZS a 25 °C. Para os ajustes de pH empregou-se pHmetro modelo B474 e AJX-511 (Micronal). Tubos QuEChERS, adquiridos da *United Chemical Technologies, Inc.*, foram utilizados para extração de resíduos de pesticidas nos alimentos naturais. As amostras foram pesadas em balança analítica NewClassic MS (Mettler Toledo). Os extratos, preparados em acetonitrila, foram agitados em vortex VM-96E (Shimadzu) e decantados em centrífuga de alta rotação Himac CT15E/CT15RE (Shimadzu). O analito dissolvido no solvente orgânico foi levado à secura em rotaevaporador R-250 EX (Büchi). O sistema de vácuo utilizado nos processos de filtração forçada e de rotaevaporação consistiu em Vacuum Manifold (Supelco). A água usada para preparação das soluções foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Inc.), com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm.

#### 4.5 Biossensores enzimáticos

CBM sofrem processo de oxidação em potenciais positivos elevados e são susceptíveis a interferências.<sup>127,128</sup> Nesse caso, o uso dos biossensores enzimáticos é mais adequado, em virtude de maior seletividade e de menor nível de interferentes ( $\approx 0,0$  V vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat}}$ ).<sup>127,128</sup> O trabalho com biossensores foi desenvolvido em parceria com o Grupo de Reações e Análises

Químicas (GRAQ) do Instituto Superior de Engenharia do Porto, associado ao Laboratório de Química Verde – REQUIMTE da Universidade do Porto, em Porto-Portugal. Estudos paralelos feitos com eletrodos compósitos de carbono mostraram que estes materiais conferem maior aderência dos agentes modificadores e estabilidade dos biodispositivos, em comparação a outras superfícies eletródicas mais utilizadas, tais como eletrodos de carbono impressos, carbono vítreo e ouro, justificando sua escolha como transdutor para a construção dos biossensores. Nesse trabalho foram contemplados três biossensores enzimáticos: (i) eletrodo de pasta de MWCNT modificado por  $LAC_{(s)}$  *entrapped* (aprisionada) no material compósito, definido como LAC-EPNC; (ii) eletrodo de pasta de grafeno (EPG) modificado eletroquimicamente com filmes de Azul da Prússia (AP), seguido da imobilização de LAC por *drop coating* (gotejamento), sendo definido como LAC/AP/EPG e, por último, (iii) biossensor bi-enzimático, desenvolvido pela eletrodeposição de filmes híbridos sobre EPG. Os filmes foram constituídos de matriz polimérica de quitosana (CS) e NpAu, posteriormente enriquecida com as enzimas LAC e TIR, definido como LAC-TIR-NpAu-CS/EPG.

#### **4.5.1 Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC-EPNC**

Inicialmente, foi preparada a pasta de carbono contendo MWCNT, pó de grafite e óleo de parafina em diferentes proporções (0:60:40, 30:30:40 e 60:0:40%, m/m/m), a fim de confrontar a eficiência dos nanotubos na composição do dispositivo. O compósito resultante foi modificado com a enzima LAC ( $0,5 \text{ U mg}^{-1}$ ) extraída do fungo *Trametes versicolor*, utilizada como elemento de biorreconhecimento do dispositivo. Para isso, duas estratégias de imobilização foram estudadas: *drop coating* da solução enzimática ( $10 \text{ U mL}^{-1}$ ), com concentração previamente otimizada por estudos preliminares, utilizando 4-AMF como substrato em tampão BR pH 5,0; e *entrapment* de diferentes proporções de  $LAC_{(s)}$  (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10%, m/m) no próprio material compósito, baseando-se na intensidade do processo redox, tempo de incubação e estabilidade do sinal analítico, obtido após a catálise enzimática. Posteriormente, o compósito resultante, com ou sem a modificação da enzima, foi embutido em tubo de Teflon<sup>®</sup> (1,0 mm de diâmetro interno) e o contato elétrico foi realizado com pistão de aço inoxidável. A renovação da superfície do dispositivo foi realizada por pressão cuidadosa do pistão sobre folhas de papel com baixa rugosidade, seguido da limpeza com água destilada antes de cada medida.

#### 4.5.2 Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC/AP/EPG

Inicialmente, foi preparada pasta de grafite convencional, contendo pó de grafite de grau espectroscópico e parafina (70:30%, m/m).<sup>129</sup> Em seguida, diferentes proporções de grafeno (10, 15, 20, 25 e 30%, m/m) foram adicionadas. A mistura resultante foi embutida em tubo de Teflon<sup>®</sup> (1,0 mm de diâmetro interno) e o contato elétrico foi realizado com pistão de aço inoxidável. Os filmes de AP foram formados pela imersão do EPG na solução A ( $\text{FeCl}_3$   $2,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $2,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{HCl}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), onde 0,4 V foi aplicado em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20, 30 e 40 s). Após o processo de eletrodeposição, a superfície do eletrodo foi lavada com água ultrapura para remover o excesso de eletrodépósito e, em seguida, ativada na solução B ( $\text{KCl}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{HCl}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) com vinte ciclos entre 0,05 e 0,35 V a 40  $\text{mV s}^{-1}$ .<sup>130</sup> A imobilização de LAC (0,5 U  $\text{mg}^{-1}$ ) extraída do fungo *Trametes versicolor* foi realizada por *drop coating* da solução enzimática (5,00; 7,50; 10,0; 12,5 e 15,0 U  $\text{mL}^{-1}$ ) sobre o filme de AP. A intensidade do processo redox, tempo de incubação e estabilidade do processo de oxidação do 4-AMF em tampão BR pH 5,0, obtido após a catálise enzimática, foram utilizados como critérios para a otimização da concentração de LAC no dispositivo.

#### 4.5.3 Desenvolvimento do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG

Solução de CS (250-300 kDa, Altakitin) 1,0 % m/v foi preparada pela dissolução de 0,1 g em 10 mL de ácido acético 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ .<sup>130</sup> Em seguida, diferentes proporções de NpAu (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70%, v/v) foram misturadas à matriz de CS, até a formação de material compósito uniforme.<sup>130</sup> Finalmente, essa mistura foi enriquecida com LAC<sub>(s)</sub> de *Trametes versicolor* (0,5 U  $\text{mg}^{-1}$ ) e TIR<sub>(s)</sub> de *Agaricus bisporus* (1,0 U  $\text{mg}^{-1}$ ) em várias proporções (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:0, 0:1, 1:2, 1:3, 1:4%, m/m), resultando em material híbrido e eficiente para catalisar a oxidação de derivados fenólicos.<sup>131</sup> A proporção enzimática no compósito foi definida com base no processo de oxidação do substrato 4-AMF em meio de tampão BR pH 5,5, levando em consideração a intensidade do processo redox, tempo de incubação e estabilidade do sinal analítico, obtido após a catálise enzimática. Considerando que CS é um veículo adequado para carrear NpAu e a mistura das polifenoloxidasas, filme híbrido fino do material compósito foi

eletrodepositado sobre EPG, previamente embutido em tubo de Teflon<sup>®</sup> (1,0 mm de diâmetro interno) e em contato com pistão de aço inoxidável, aplicando potencial de -1,5 V por 200 s.<sup>130</sup>

#### 4.6 Metodologias eletroanalíticas e figuras de mérito

Após a etapa de imobilização da enzima, os próximos passos foram a escolha do eletrólito de suporte e a otimização do pH. As respostas foram avaliadas pela intensidade das correntes de pico ( $I_p$ ), deslocamento do potencial de pico ( $E_p$ ), largura de meia-altura ( $\Delta E_{p/2}$ ) e estabilidade do sinal após a catálise enzimática. Além do pH adequado para a melhor atividade enzimática, também considerou-se a concentração das enzimas e o tempo de incubação do dispositivo como parâmetros operacionais a serem otimizados, a fim de se obter maior sensibilidade analítica.

Voltametria cíclica (VC) foi empregada nos estudos do comportamento redox, caráter adsorptivo, influência da velocidade de varredura e informações mecanísticas referentes à oxidação do substrato 4-AMF sobre os dispositivos em questão. Para a quantificação dos CBM em hortaliças e frutas cítricas, foi utilizada voltametria de onda quadrada (VOQ), após a otimização de  $f$ ,  $a$  e  $\Delta E_s$ . Estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) também foram realizados, empregando frequências de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz com amplitudes de perturbação de 5 mV, para avaliar o êxito na imobilização das camadas, bem como as alterações no processo de resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ).

As curvas analíticas foram construídas com base na capacidade dos CBM de inibir a atividade catalítica das enzimas, tomando por base a oxidação de 4-AMF, utilizado como substrato e mediador redox:

$$\%IR = \left[ 1 - \left( \frac{I}{I_0} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

em que %IR corresponde à porcentagem de inibição da atividade enzimática,  $I_0$  é a corrente de pico antes da adição do pesticida e  $I$  corresponde à corrente de pico após a adição do pesticida.

A média aritmética ( $\bar{X}$ ) e o desvio padrão (DP) dos interceptos e das inclinações das curvas analíticas foram utilizados para a obtenção das figuras de mérito.<sup>132</sup> Em síntese, os valores de LD e de LQ foram calculados pela relação entre DP dos interceptos (a) e  $\bar{X}$  das inclinações (b), conforme indicado nas seguintes equações:

$$LD = 3 \times \frac{DP_a}{\bar{X}_b} \quad (2)$$

$$LD = 10 \times \frac{DP_a}{\bar{X}_b} \quad (3)$$

Os ensaios de repetibilidade *intra-day* (n = 10) e *inter-day* (n = 5) foram avaliados pelo desvio padrão relativo (%DPR) dos valores de  $I_p$  obtidos com as diferentes medidas.

$$\%DPR = \frac{DP_{I_p}}{\bar{X}_{I_p}} \times 100 \quad (4)$$

em que, para as correntes de pico,  $DP_{I_p}$  representa o desvio padrão e  $\bar{X}_{I_p}$  é a média aritmética. No caso da reprodutibilidade, a avaliação também foi realizada pelo %DPR por meio da resposta obtida (n = 3) com quatro diferentes dispositivos, construídos nas mesmas condições.

A confiabilidade de  $a$  e  $b$  foi estimada pelo intervalo de confiança (IC), calculado a partir da Equação 5, onde “n” representa o número de medidas e “t” um parâmetro teórico tabelado, obtido de acordo com o número de medidas, para n-1 graus de liberdade e 95% de confiança.

$$IC = \bar{X} \pm t_{n-1} \times \frac{DP}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

A exatidão do método foi avaliada com base na porcentagem de recuperação (REC), obtida pela relação entre as concentrações adicionada e recuperada de CBM, conforme indicado na Equação 6. Os ensaios foram realizados pelo método da adição de padrão, com resultados analisados em triplicata e os valores apresentados como a média aritmética das medidas.

$$REC = \frac{[CBM]_{adicionada}}{[CBM]_{recuperada}} \times 100 \quad (6)$$

Outra relação estatística utilizada nos estudos com interferentes foi o bias (%), representado pela Equação 7. A relação matemática é expressa pela  $\bar{X}$  dos valores de  $I_p$  obtidos e o valor teórico esperado ( $X_i$ ).

$$\text{bias} = \left( \frac{\bar{X} - X_i}{X_i} \right) \times 100 \quad (7)$$



#### 4.7 Tratamento das amostras de alimentos naturais

Em parceria com o GRAQ, o biossensoriamento dos pesticidas foi investigado em extratos de hortaliças (tomate, alface e batata) e de frutas cítricas (laranja, tangerina e limão), utilizando a parte comestível de cada alimento, tratados pelo método QuEChERS.<sup>133,134</sup> Para isso, alíquota de  $10,00 \pm 0,05$  g de amostra triturada foi quantitativamente transferida para tubo QuEChERS contendo 6,0 g  $MgSO_4$  / 1,5 g NaCl / 1,5 g  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ . Em seguida, 10 mL de acetonitrila foram adicionados ao tubo e agitados em centrífuga por três minutos a 4000 rpm. Na sequência, foi realizada a contaminação artificial das amostras com diferentes concentrações de CBM, seguida de nova etapa de centrifugação. O sobrenadante contendo o analito foi extraído e levado à secura em rotaevaporador, sob atmosfera de nitrogênio 5.0 (Linde Sogás). O resíduo foi redissolvido em 10 mL de tampão BR, com pH ajustado para o valor onde se observou o máximo de atividade enzimática, e a solução resultante foi utilizada nos ensaios de recuperação pelo método da adição de padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação eletroanalítica de carbamatos em tomate e alface

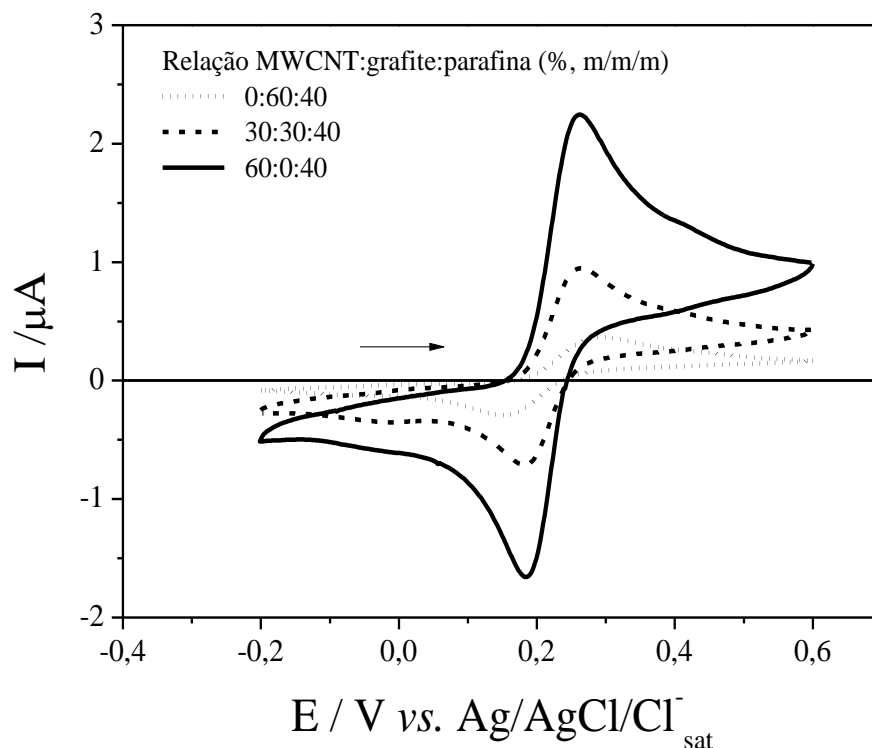
#### 5.1.1 Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC-EPNC

##### 5.1.1.1 Otimização da proporção de nanotubos de carbono no material compósito

Inicialmente, a proporção dos materiais de carbono e do aglutinante parafina, contidos no material compósito, foi investigada por VC a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , em tampão BR pH 5,0, utilizando-se 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , para uma faixa de potencial de -0,2 a 0,6 V. Constatou-se que as pastas contendo apenas pó de grafite e parafina já apresentavam textura adequada para o embutimento com pequenas quantidades do aglutinante (15%, m/m), mas na presença de MWCNT (20, 40, 60, 80 %, m/m), quantidades de parafina menores que 40% (m/m) resultavam em um material não-homogêneo, difícil de ser manipulado e embutido na cavidade do tubo de Teflon<sup>®</sup>. Por outro lado, o aumento na proporção de parafina acarretou a redução não linear nos valores de  $I_p$  e aumento em  $\Delta E_{p/2}$ , devido ao caráter isolante deste óleo mineral. Portanto, para os estudos subsequentes, a proporção de parafina nos diferentes compósitos foi fixada em 40% (m/m).

Em seguida, diferentes proporções de MWCNT / pó de grafite / parafina (0:60:40, 30:30:40 e 60:0:40%, m/m/m) foram investigadas para confrontar as prováveis vantagens de MWCNT no material compósito em comparação aos eletrodos de pasta de carbono convencionais (EPC). Em todos os casos, o processo redox do substrato foi representado por um par redox bem definindo, conforme apresentado na Figura 3, mas com o aumento da proporção de nanotubos, foi constatada uma série de vantagens em relação aos EPC (grafite:parafina 60:40%, m/m), dentre elas: aumento nos valores de  $I_p$  em torno de seis vezes, catálise do processo redox, melhoria na reversibilidade com o aumento da razão  $I_{pa}/I_{pc}$  e menor  $\Delta E_{p/2}$ , mostrando o importante papel de MWCNT na melhoria da cinética de transferência eletrônica dos sensores.

Figure 3 – Voltamogramas cíclicos de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> obtido sobre eletrodos compósitos de carbono contendo MWCNT/grafite/parafina% (m/m/m) nas proporções 0:60:40 (linha pontilhada), 30:30:40 (linha tracejada) e 60:0:40 (linha sólida), em meio de tampão BR pH 5,0 e com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>



Fonte: autoria própria.

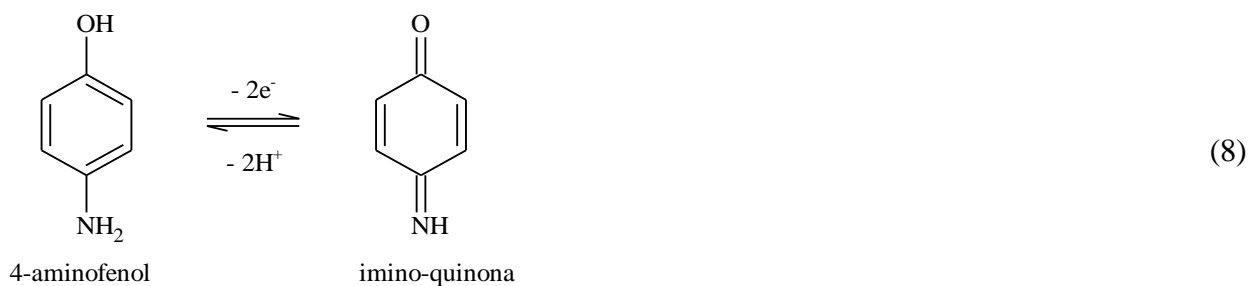
As vantagens observadas para os eletrodos de pasta de nanotubos de carbono (EPNC) podem ser associadas às dimensões nanométricas, elevada área superficial, arranjo compacto de carbonos  $\text{sp}^2$  com ranhuras/defeitos topológicos nas estruturas dos MWCNT.<sup>135</sup> Banks e Compton sugeriram que a contribuição positiva dos nanotubos na atividade eletrocatalítica de dispositivos eletrônicos é devido à presença de sítios reativos existentes nas extremidades e nos defeitos topológicos das nanoestruturas (*nanotubes edge-plane like sites*).<sup>136</sup> Britto *et al.*<sup>137</sup> demonstraram por cálculos *ab-initio* que as melhorias na transferência eletrônica dos sensores contendo nanotubos se devem a curvaturas nas estruturas cilíndricas, que originam mudanças nas bandas de energia próximas ao nível de Fermi, onde a presença de defeitos pentagonais produz regiões com alta densidade de carga. Há quem diga que a presença de impurezas metálicas nas nanoestruturas também contribui para as propriedades elétricas excepcionais observadas nesses

materiais,<sup>138</sup> mas considerando que os MWCNT utilizados neste trabalho foram de alta pureza ( $\geq 98\%$  C) e isento de impurezas metálicas, é mais plausível que os defeitos topológicos das estruturas tenham sido os principais responsáveis pelo desempenho obtido com eletrodos compósitos de nanotubos. Considerando que o conjunto de vantagens apresentadas foi mais significativo para EPNC composto de MWCNT e parafina na razão 60:40% (m/m), esse transdutor foi utilizado na construção do biossensor enzimático.

### 5.1.1.2 Imobilização da enzima lacase

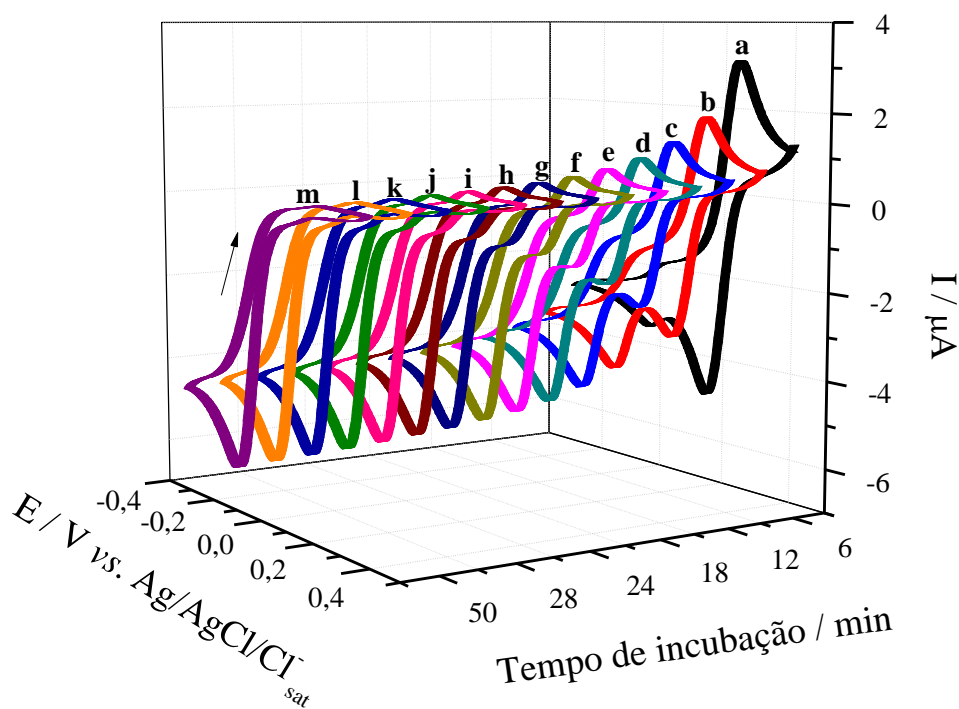
Nesse trabalho, para a imobilização de LAC, duas estratégias foram investigadas: *drop coating* da solução enzimática ( $10 \text{ U mL}^{-1}$ ) sobre EPNC e *entrapment* de  $\text{LAC}_{(s)}$   $0,5 \text{ U mg}^{-1}$  (3,0%, m/m) diretamente no material compósito. Os experimentos foram realizados em tampão BR pH 5,0, onde a enzima LAC apresentou elevada atividade para a catálise do processo de oxidação de substratos fenólicos, como é o caso do 4-AMF. A Figura 4 apresenta o perfil voltamétrico da oxidação de 4-AMF sobre LAC-EPNC com o tempo, obtido por VC a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , para uma faixa de potencial de -0,4 a 0,6 V.

O processo de oxidação do substrato ocorreu em duas etapas, onde a primeira foi representada por um par redox quase-reversível (voltamograma a), relacionado à sua conversão em um derivado de imino-quinona,<sup>139</sup> cujos potenciais de oxidação e redução foram registrados em 0,24 V e 0,17 V, respectivamente:



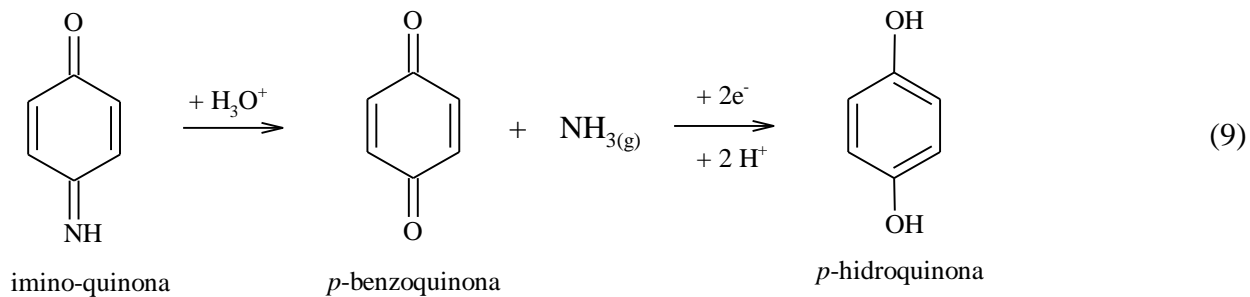
Em condições ácidas, o grupamento amínico se tornou bastante lábil, acarretando na formação de benzoquinonas por uma etapa química, acompanhada do desprendimento de amônia. Em seguida, uma nova etapa eletroquímica e irreversível aconteceu, referente à conversão da *p*-benzoquinona em *p*-hidroquinona, por um processo envolvendo  $2\text{H}^+$  e  $2\text{e}^-$ .

Figure 4 – Voltamogramas cíclicos para a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  obtido sobre LAC-EPNC (3,0% de LAC<sub>(s)</sub>, m/m) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , em meio de tampão BR pH 5,0, com tempos de incubação de: 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 25 (f), 30 (g), 35 (h), 40 (i), 45 (k), 50 (j), 55 (l) e 60 (m) minutos



Fonte: autoria própria.

Por isso, o par redox observado no início do processo de oxidação do substrato foi suprimido ao longo do tempo, enquanto um novo processo de redução foi registrado em  $-0,07 \text{ V}$  (voltamogramas b-m), até que a reação atingiu o equilíbrio (voltamograma m).



Em síntese, o processo redox do 4-AMF pode ser representado por mecanismo do tipo eletroquímico/químico/eletroquímico, resultando em *p*-benzoquinona como produto final da

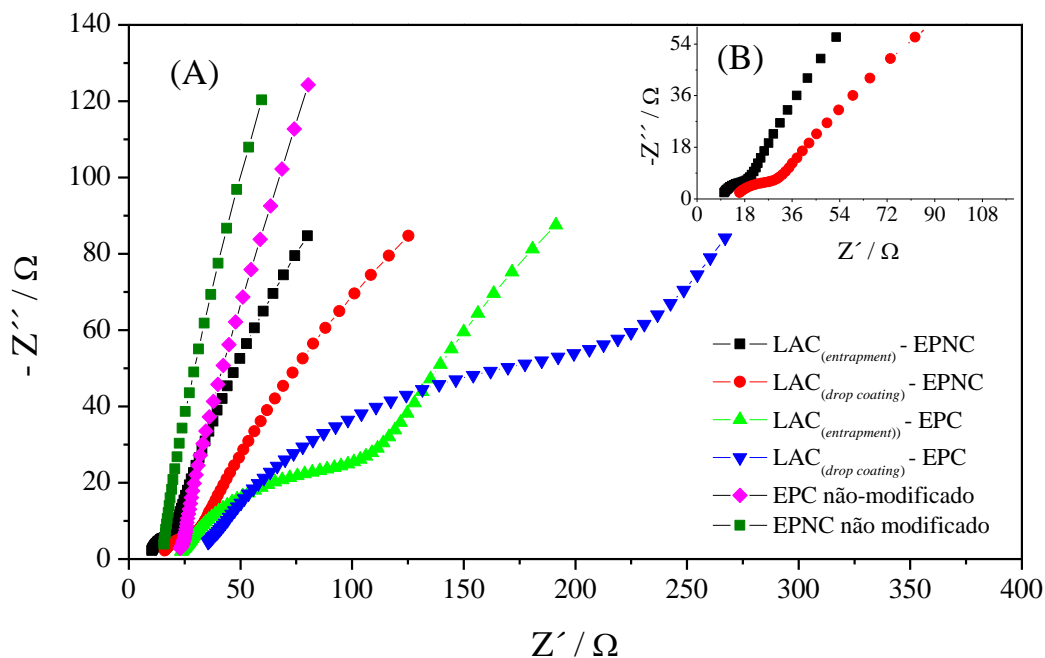
reação de oxidação.<sup>139</sup> Apesar da sequência reacional apresentada ser para o 4-AMF, outros compostos fenólicos são oxidados por LAC por um mecanismo similar.<sup>92</sup>

Apesar dos resultados apresentados na Figura 4 estarem relacionados ao comportamento do substrato sobre o biossensor LAC-EPNC (3,0% de LAC<sub>(s)</sub>, m/m), os resultados obtidos com os dispositivos construídos pela imobilização da enzima (10 U mL<sup>-1</sup>) por *drop coating* foram similares, mas com tempo de incubação superior. Além disso, após a estabilidade do sinal, também foi observado que os valores de I<sub>p</sub> obtidos com o dispositivo construído por *entrapment* de LAC<sub>(s)</sub> no compósito de MWCNT foi cerca de três vezes maior, sugerindo melhor configuração eletródica para aplicações analíticas. Como a redução da *p*-benzoquinona sobre o biossensor ocorreu em potencial próximo a 0,0 V (*vs.* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub>), foi possível determinar CBM pela inibição da atividade enzimática, com baixo nível de interferentes eletroativos. Essa é uma das principais vantagens dos biossensores frente aos eletrodos convencionais utilizados na determinação destes pesticidas.

### 5.1.2 Caracterização eletroquímica do biossensor

EIE foi utilizada para avaliar as propriedades interfaciais de diferentes biossensores enzimáticos à base EPC e de EPNC, modificados com LAC, por meio dos diagramas de Nyquist, obtidos pela relação entre a impedância real ( $Z'$ ) e a impedância imaginária ( $-Z''$ ). Nessa técnica, o diâmetro do semicírculo observado em altas frequências equivale à resistência a transferência de carga ( $R_{tc}$ ), que controla a cinética de transferência eletródica do processo redox na superfície do eletrodo.<sup>140</sup> Os experimentos de EIE foram realizados em tampão BR pH 5,0 utilizando 4-AMF como mediador redox, para faixa de frequência de 10<sup>5</sup> a 10<sup>-1</sup> Hz e amplitude de perturbação de 5,0 mV, aplicando-se 0,20 V e -0,01 V antes e após a catálise enzimática, respectivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5A. É importante ressaltar que os diferentes dispositivos contemplados nesse trabalho foram construídos sem qualquer contribuição de impurezas metálicas para o aumento das correntes faradaicas ou membrana condutora para auxiliar na imobilização enzimática. Em outras palavras, o conjunto de resultados obtidos se deveu, exclusivamente, às características integradas de LAC e dos compósitos de carbono.

Figura 5 – (A) Diagramas de Nyquist obtidos para os diferentes sensores, com faixa de frequência de  $10^5$  a  $10^{-1}$  Hz e amplitude de perturbação de 5,0 mV, utilizando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como mediador redox em tampão BR pH 5,0, aplicando 0,20 V na ausência e -0,01 V na presença de LAC. (B) Imagem ampliada dos diagramas de Nyquist obtidos para os biossensores construídos com eletrodos compósitos de nanotubos de carbono



Fonte: autoria própria.

Antes da modificação com LAC, tanto o eletrodo compósito de grafite convencional quanto o de MWCNT apresentaram relação  $Z'/Z''$  linear, característica de processos cujo transporte de massa é controlado por difusão.<sup>140</sup> Após a imobilização de LAC, independente da técnica utilizada, foi observado o surgimento de um arco capacitivo devido ao aumento da resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ). Esse resultado também foi um indício do sucesso da imobilização enzimática pelas duas técnicas. Todavia, biossensores construídos a partir de EPC (LAC<sub>(entrapment)</sub>-EPC e LAC<sub>(drop coating)</sub>-EPC) apresentaram maiores arcos capacitivos e, conseqüentemente,  $R_{tc}$  superior à observada com os biossensores à base de EPNC (LAC<sub>(entrapment)</sub>-EPNC e LAC<sub>(drop coating)</sub>-EPNC), provavelmente, devido às propriedades elétricas dos MWCNT presentes no compósito de EPNC.<sup>138</sup> Essas informações corroboraram os resultados obtidos por VC (maior intensidade do processo redox) e indicaram que EPNC possuía melhor desempenho

como transdutor na configuração eletródica dos biossensores, independente da técnica de imobilização enzimática utilizada.

Quanto ao método de imobilização, observou-se que eletrodos modificados por *drop coating* de LAC apresentam maior  $R_{tc}$ , tanto para EPC quanto EPNC, em comparação aos dispositivos construídos por *entrapment* da enzima. Baseando-se na Figura 5B, pode ser constatado maior arco capacitivo para  $LAC_{(drop\ coating)}-EPNC$  ( $R_{tc} = 24,9\ \Omega$ ) em relação a  $LAC_{(entrapment)}-EPNC$  ( $R_{tc} = 19,0\ \Omega$ ), sugerindo que a imobilização da enzima por *entrapment* atribuiu melhor desempenho analítico para o biossensor. A camada de LAC imobilizada diretamente sobre EPNC por *drop coating* dificultou a mobilidade eletrônica, atuando como uma barreira ao processo de transferência de carga. Os biossensores  $LAC_{(drop\ coating)}-EPC$  e  $LAC_{(drop\ coating)}-EPNC$  também apresentaram problemas de repetibilidade nas medidas de impedância, provavelmente, por conta da baixa aderência da enzima na superfície do eletrodo. Deste modo, para a construção do biossensor de trabalho LAC-EPNC, a imobilização da enzima foi realizada por *entrapment* de  $LAC_{(s)}$  diretamente no material compósito de MWCNT.

### 5.1.3 Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos

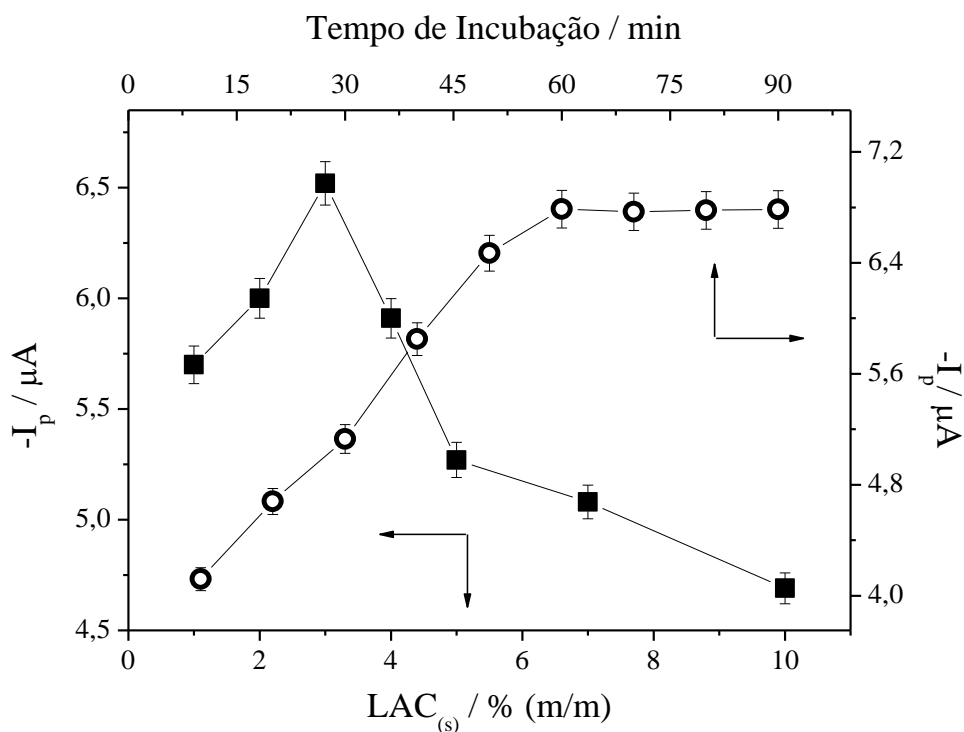
A otimização dos parâmetros operacionais (pH do meio, concentração enzimática e tempo de incubação) foi conduzida por VC a  $50\ mV\ s^{-1}$ , baseando-se no processo de redução da *p*-benzoquinona ( $-0,07\ V$ ) sobre LAC-EPNC, em meio de tampão BR.

O máximo de atividade catalítica de LAC estende-se do meio ácido ao levemente básico.<sup>92</sup> Por isso, o pH foi uma das variáveis mais importantes a serem avaliadas no desenvolvimento de biossensores enzimáticos. Neste trabalho, o pH do tampão BR foi avaliado dentro da sua capacidade tamponante (2,0 – 8,0), havendo aumento nos valores de  $I_p$  até pH 5,0 e deslocamento de  $E_p$  para valores mais negativos proporcional ao aumento do pH. Também foi constatado que, para um tempo de incubação de 60 minutos, a catálise da oxidação do 4-AMF só foi completa na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 6,0, correspondendo à faixa ótima de pH para LAC-EPNC. O máximo de atividade enzimática também foi observado para a mesma faixa utilizando espectroscopia UV-Visível. Essa informação corroborou as afirmações de outros pesquisadores, referentes ao máximo de atividade enzimática de lacases extraídas de diferentes fontes, obtidos por técnicas eletroquímicas e espectroscópicas.<sup>92,121,122</sup>



A concentração de  $LAC_{(s)}$  (1 – 10%, m/m) no compósito de MWCNT e o tempo de incubação (1 – 90 min) do dispositivo também foram avaliados por VC a  $50 \text{ mVs}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados com 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 5,0 e os resultados estão apresentados na Figura 6. Quanto a melhor concentração/porcentagem de  $LAC_{(s)}$ , para um tempo de incubação de 60 minutos, houve aumento nos valores de  $I_p$  até proporções de  $LAC_{(s)} = 3\%$  (m/m), diminuindo significativamente em porcentagens maiores, provavelmente, devido ao aumento na resistividade do material compósito. Em relação ao tempo de incubação, utilizando o biossensor LAC-EPNC composto de  $LAC_{(s)} = 3\%$  (m/m), ficou constatado que após 60 minutos o sinal eletroquímico permanece praticamente estável (valores de  $I_p$  constantes), sugerindo o tempo ótimo para a catálise do substrato pelo biossensor. Vale salientar que não foi necessário tempo de estabilização do sinal eletroquímico entre as medidas.

Figura 6 – Relação entre as correntes de pico com a (■) concentração de  $LAC_{(s)}$  e o (○) tempo de incubação, para o desenvolvimento do biossensor LAC-EPNC, obtida por voltametria cíclica a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , utilizando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em tampão BR pH 5,0



Fonte: autoria própria.

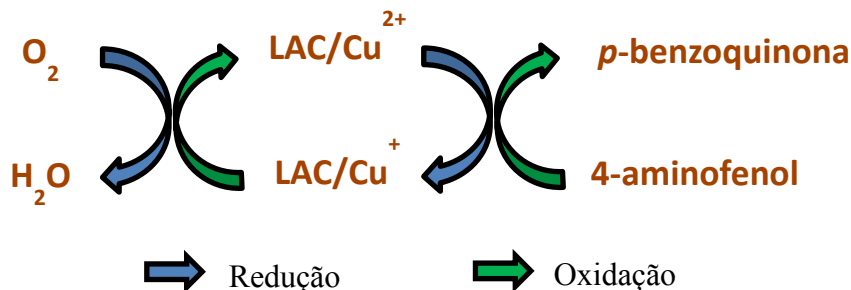
Parâmetros que afetam o sinal eletroquímico na VOQ também foram avaliados a fim de atribuir maior sensibilidade ao método. Para uma faixa de  $f$  entre 10 e 150  $s^{-1}$ , observou-se aumento linear de  $I_p$  até 50  $s^{-1}$ , permanecendo praticamente constante em valores superiores. Com relação ao efeito de  $a$  (5 – 50 mV), o aumento desta variável proporcionou aumento de  $I_p$  até 30 mV, paralelo ao deslocamento de  $E_p$  para valores mais negativos. Valores de  $a \geq 40$  mV também ocasionaram aumento de  $\Delta E_{p/2}$ , indicando perda de seletividade do método. A variação no valor de  $\Delta E_s$  (1 – 7 mV) também afetou os valores de  $I_p$  de forma positiva e linear, mas acima de 2 mV houve aumento do ruído nas medidas do sinal eletroquímico.

Deste modo, baseando-se na discussão prévia, os parâmetros operacionais e voltamétricos selecionados para a quantificação dos CBM pelo biossensor LAC-EPNC foram: tampão BR pH 5,0;  $LAC_{(s)}$  3% (m/m) *entrapped* em EPNC; tempo de incubação de LAC-EPNC equivalente a 60 min,  $f = 50 s^{-1}$ ,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV.

#### 5.1.4 Curvas analíticas e figuras de mérito

Após a otimização das condições voltamétricas e operacionais, LAC-EPNC foi utilizado para quantificação de traços de CBM. O princípio do método pode ser compreendido por um conjunto de reações paralelas entre a enzima e o substrato, representadas na Figura 7. Em geral, as moléculas de LAC expostas na superfície do eletrodo, são oxidadas por oxigênio, havendo variação no estado de oxidação dos íons cobre [ $LAC(Cu^+) \rightleftharpoons LAC(Cu^{2+}) + 1e^-$ ], concomitante à formação de água. Em seguida, a forma oxidada da enzima [ $LAC(Cu^{2+})$ ] é novamente reduzida, enquanto que o substrato 4-AMF é oxidado a *p*-benzoquinona.<sup>88,92</sup> Como as quinonas são eletroativas na superfície de LAC-EPNC, seu processo de redução (-0,07 V) foi utilizado como pico analítico. A quantificação do CBM foi realizada de forma indireta, com base na capacidade destes pesticidas de inibir a catálise da reação de oxidação do substrato empregando LAC-EPNC, sendo que a corrente de redução medida é proporcional à concentração dos CBM adicionada à célula eletroquímica. Apesar das polifenoloxidasas possuírem diferentes mecanismos de ação,<sup>88,91,92</sup> a atividade catalítica dessas enzimas em biossensores amperométricos para a oxidação e detecção de compostos fenólicos segue uma linha de raciocínio similar à descrita anteriormente.

Figura 7 – Sequência reacional envolvida na oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato sobre LAC-EPNC (3%, m/m), em meio de tampão BR pH 5,0, para um tempo de incubação de 60 min



Fonte: autoria própria.

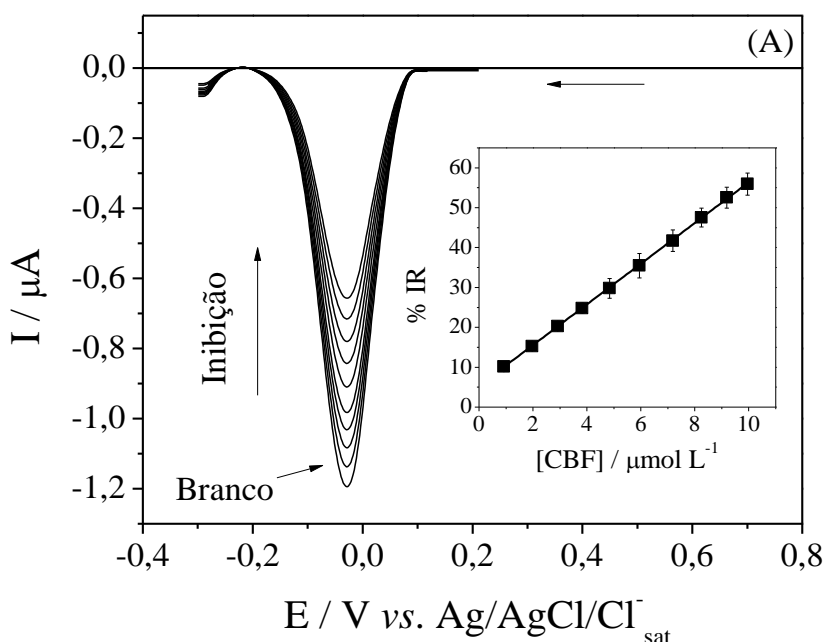
Utilizando o biossensor LAC-EPNC nas condições previamente otimizadas, foi possível quantificar traços dos *n*-metilcarbamatos carbofurano (CBF), formetanato (FMT) e pirimicarbe (PMB), com sensibilidade adequada. As curvas analíticas, apresentadas na Figura 8, foram construídas a partir da relação entre %IR e concentração dos CBM, com faixas de concentração variando de  $9,90 \times 10^{-7}$  a  $9,99 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para CBF, de  $5,00 \times 10^{-7}$  a  $5,28 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para FMT e de  $9,90 \times 10^{-7}$  a  $1,15 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para PMB, com elevada correlação entre os pontos e baixa dispersão entre os valores medidos ( $r = 0,9992 - 0,9998$ ). Pelas inserções da Figura 8, também pode ser observado que apenas PMB apresentou curva analítica com intercepto negativo, mas estudos de significância realizados pelo teste *t-student* mostraram um valor calculado ( $t = 4,13$ ) abaixo do crítico ( $t_{\text{crítico}} = 4,30$ ; 95% de confiança e  $n-1$  graus de liberdade), sugerindo que os erros randômicos foram negligenciáveis e que o valor experimental e o teórico esperado são estatisticamente iguais.<sup>132</sup>

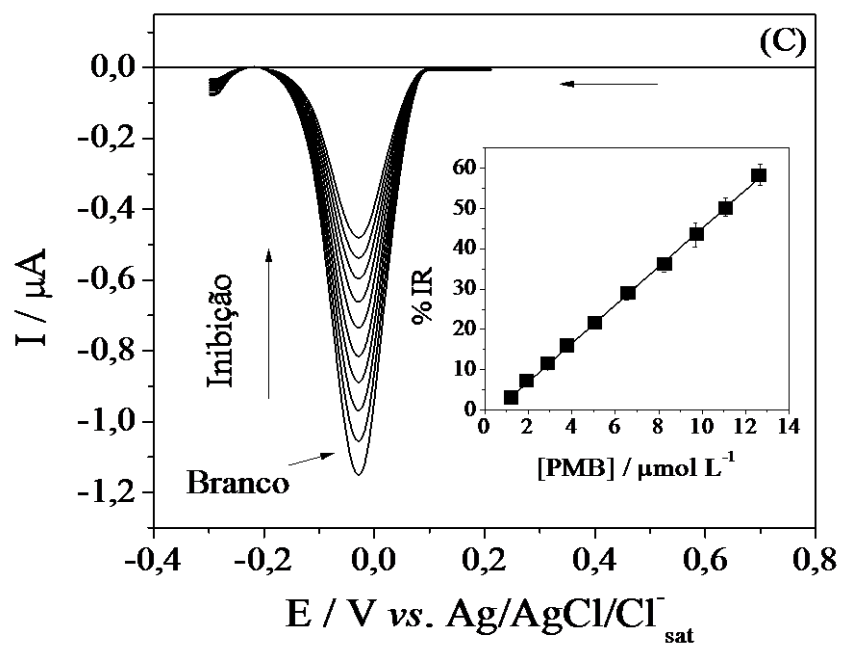
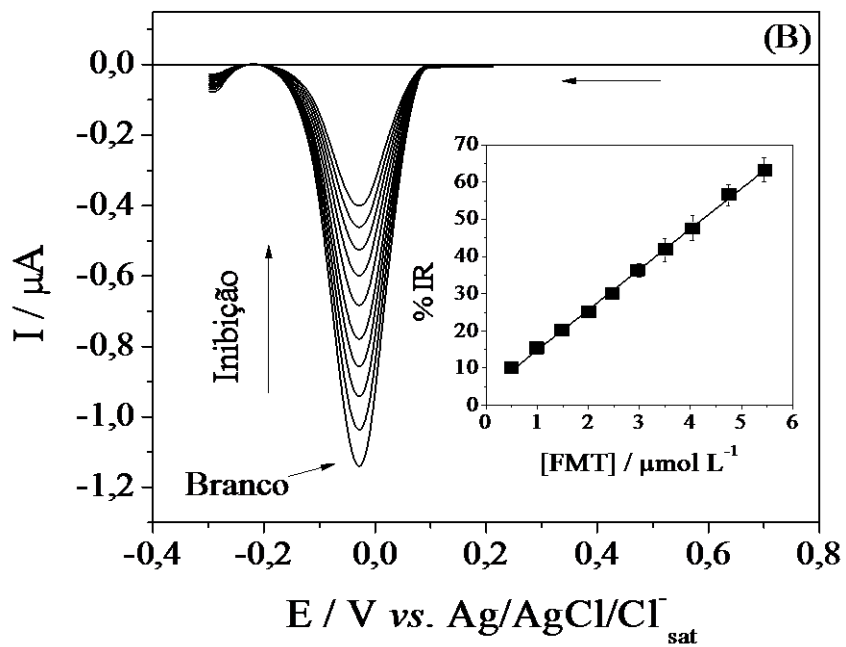
A Tabela 2 sintetiza o conjunto das figuras de mérito obtidas para a análise dos CBM. Os valores de LD ( $9,02 \times 10^{-8}$  a  $4,23 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) e LQ ( $1,34 \times 10^{-7}$  a  $8,38 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) foram satisfatórios e atenderam aos LMPs exigidos pelas agências de controle e segurança alimentar brasileira (ANVISA) e europeia (AESA),<sup>141,142</sup> permitindo a aplicação do procedimento para a quantificação desses compostos em matrizes complexas. Até o momento, não há relatos de outros biossensores à base de LAC utilizados para quantificar CBF, FMT e PMB em matrizes ambientais. Biossensores construídos com AChE,<sup>87,106,107,111-113</sup> AChE geneticamente modificada,<sup>112,113</sup> BChE<sup>106</sup> e TIR<sup>120</sup> foram utilizados para quantificar CBF em diferentes matrizes

ambientais, mas com sensibilidade inferior ou comparável a obtida com LAC-EPNC. O procedimento também mostrou boa reprodutibilidade nas medidas de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  na presença dos CBM ( $1,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), onde %DPR foi abaixo de 4,0% para medidas *intra-day* ( $n = 10$ ) e de 5,5% para medidas *inter-day* ( $n = 5$ ). A avaliação da reprodutibilidade, realizada com diferentes medidas ( $n = 3$ ) de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  obtidas por quatro diferentes dispositivos, também foi satisfatória,<sup>132</sup> sendo que os valores de %DPR variaram entre 3,7 e 6,8. A pequena variação nos valores das medidas também pode ser constatada pelas barras de erro apresentadas nas inserções da Figura 8.

A estabilidade da resposta do biossensor LAC-EPNC foi averiguada, a partir de vinte diferentes medidas de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  realizadas ao longo de um mês. Durante esse intervalo de tempo, o compósito utilizado na preparação do biossensor foi estocado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e embutido no tubo de Teflon<sup>®</sup> antes de cada medida. O dispositivo reteve 92,4% de sua resposta inicial, indicando que a atividade da enzima no biossensor é mantida por um período aceitável.<sup>90</sup>

Figura 8 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor LAC-EPNC para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) formetanato e (C) pirimicarbe, usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro





Fonte: autoria própria.

Tabela 2 – Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC-EPNC como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 60 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0,  $f = 50$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV

Parâmetro	Carbamatos estudados		
	CBF	FMT	PMB
<b>Faixa de Concentração</b> (mol L <sup>-1</sup> )	$9,90 \times 10^{-7}$ a	$5,00 \times 10^{-7}$ a	$9,90 \times 10^{-7}$ a
<b>Intercepto</b> (% de inibição)	$9,99 \times 10^{-6}$ 5,35	$5,28 \times 10^{-6}$ 3,96	$1,15 \times 10^{-6}$ -2,57
<b>IC do Intercepto</b>	$2,83 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-3}$	$5,75 \times 10^{-3}$
<b>Inclinação</b> (% de inibição mol <sup>-1</sup> L)	$5,10 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$4,76 \times 10^6$
<b>IC da Inclinação</b>	$2,37 \times 10^3$	$2,42 \times 10^4$	$3,24 \times 10^3$
<b><i>r</i></b>	0,9998	0,9992	0,9994
<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$4,23 \times 10^{-7}$	$9,02 \times 10^{-8}$	$1,80 \times 10^{-7}$
<b>LD (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,093	0,020	0,038
<b>LQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$8,38 \times 10^{-7}$	$1,34 \times 10^{-7}$	$6,00 \times 10^{-7}$
<b>LQ (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,185	0,029	0,125
<b>Repetibilidade</b> ( <i>intra-day</i> , %DPR)	3,8	3,3	1,8
<b>Repetibilidade</b> ( <i>inter-day</i> , %DPR)	5,3	4,7	5,0
<b>Reprodutibilidade (%DPR)</b>	6,8	3,7	5,0

Fonte: autoria própria.

### 5.1.5 Experimentos de recuperação e estudo de interferentes

Procedimentos de análise direta são mais rápidos e, em geral, reduzem possíveis erros provenientes de etapas prévias de preparo das amostras. Todavia, matrizes alimentares são muito complexas, possuem grande variedade de interferentes naturais e antrópicos e requerem um tratamento mais apurado da matriz antes da análise.<sup>14</sup> Na rotina analítica, métodos ambientalmente corretos, que permitam menor consumo de energia e reduzam a quantidade de solventes nos ensaios, que ofereçam menor custo, rapidez e elevado rendimento na recuperação dos analitos são fortemente recomendados.<sup>20</sup> O método QuEChERS satisfaz estas exigências e, atualmente, representa um dos principais procedimentos de extração utilizados na análise de alimentos naturais.<sup>143</sup>

Neste trabalho, a exatidão do procedimento proposto foi avaliada por experimentos de recuperação realizados em extratos de tomate e de alface obtidos pelo método QuEChERS. As hortaliças foram artificialmente contaminadas com concentrações dos CBM variando de 0,11 a 2,36 mg kg<sup>-1</sup> e a quantificação de CBF, FMT e PMB foi realizada pelo método da adição de padrão. A Tabela 3 sintetiza o conjunto de resultados obtidos. REC variou de 94,6 ± 0,1% a 101,0 ± 0,3% nas amostras de tomate e de 91,0 ± 0,1% a 98,7 ± 0,3% nas amostras de alface, indicando que o método eletroanalítico proposto também possui elevada exatidão para quantificar CBF, FMT e PMB em tomate e alface. É importante frisar que pelo método QuEChERS também é possível concentrar o(s) analito(s) de interesse ao extraí-los de uma massa maior da hortaliça e/ou redissolvendo o analito em um volume menor da solução tampão. Seguindo este procedimento, o biossensor LAC-EPNC poderá ser utilizado para quantificar os CBM estudados em concentrações ainda mais baixas.

Considerando que tomate e alface são importantes fontes de β-caroteno (provitamina A), tiamina (vitamina B1), ácido ascórbico (vitamina C) e glicose, estes compostos foram testados como possíveis interferentes do método. Ensaio de VOQ foram realizados com o substrato 4-AMF 4,75×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em condições ótimas, para diferentes razões entre os interferentes e o substrato, a saber, 1:10; 1:1 e 10:1 (*n/n*). Resultados expressos em bias (%) estão apresentados na Figura 9. A vitamina B1 e a glicose não apresentaram efeito significativo nas análises, onde valores de bias inferiores a 7,00% ± 0,03% foram obtidos para a vitamina B1 e a 5,00% ± 0,02% para a glicose, para a maior razão testada (10:1, interferente:substrato, *n/n*). Com relação à

provitamina A e à vitamina C, os valores de bias variaram de  $0,59 \pm 0,01\%$  (1:10, interferente:substrato,  $n/n$ ) a  $11,33 \pm 0,01\%$  (10:1, interferente:substrato,  $n/n$ ) e de  $1,56 \pm 0,02\%$  (1:10, interferente:substrato,  $n/n$ ) a  $14,11 \pm 0,01\%$  (10:1, interferente:substrato,  $n/n$ ), respectivamente. No entanto, a proporção máxima testada corresponde a uma condição extrema, onde a concentração do interferente dificilmente seria encontrada em 10 g de massa das amostras analisadas. Essa proporção foi considerada como uma forma de observar até que ponto o método em questão poderia ser aplicado. Assim, o procedimento proposto permitiu a análise de CBF, FMT e PMB em amostras de tomate e de alface, com elevada sensibilidade, seletividade e nível de interferente relativamente baixo, apesar da complexidade da matriz.

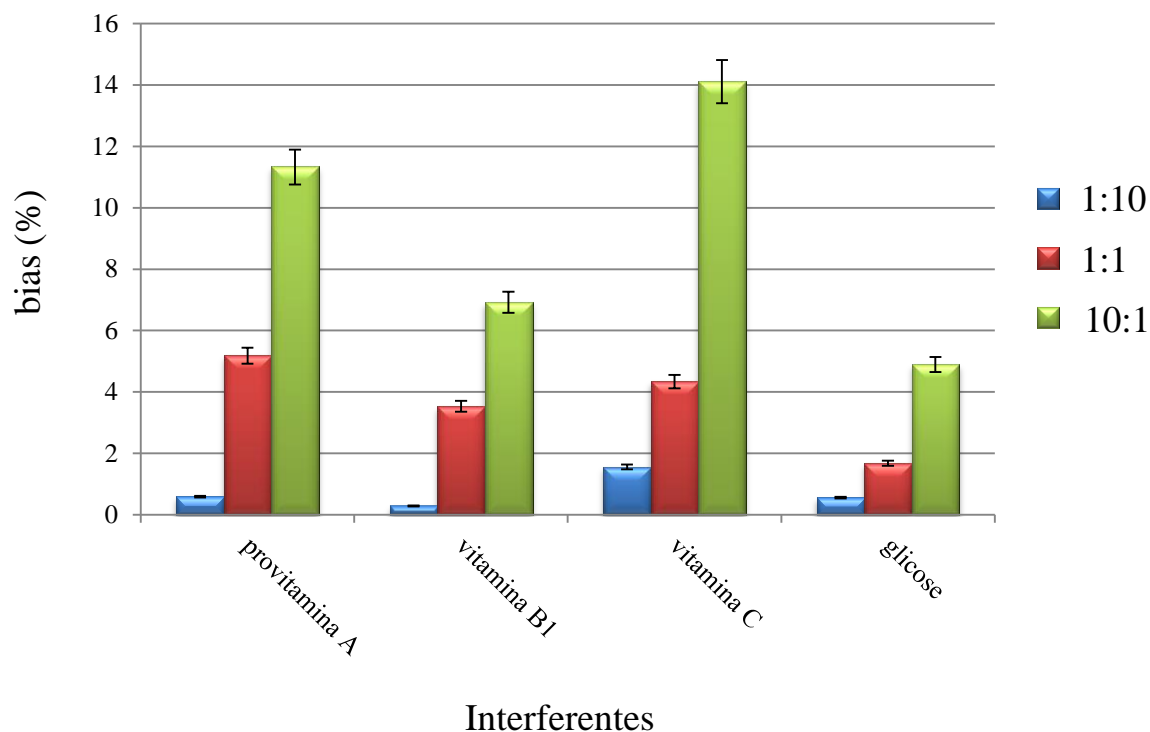
Tabela 3 – Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de tomate e de alface, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC-EPNC como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 60 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0,  $f = 50$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV

Parâmetro	Carbamatos estudados		
	CBF	FMT	PMB
<b>Fortificação 1</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,21	0,11	0,47
<b>Recuperação em</b> <b>tomate (%)</b>	$95,7 \pm 0,1$	$93,7 \pm 0,2$	$94,6 \pm 0,1$
<b>Recuperação em</b> <b>alface (%)</b>	$93,3 \pm 0,4$	$93,1 \pm 0,5$	$91,0 \pm 0,1$
<b>Fortificação 2</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,64	0,85	2,36
<b>Recuperação em</b> <b>tomate (%)</b>	$98,8 \pm 0,3$	$98,4 \pm 0,3$	$101,0 \pm 0,3$
<b>Recuperação em</b> <b>alface (%)</b>	$98,1 \pm 0,3$	$97,8 \pm 0,3$	$98,7 \pm 0,3$

Fonte: autoria própria.



Figura 9 – Influência da provitamina A, vitamina B1, vitamina C e glicose no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 ( $n/n$ )



Fonte: autoria própria.

## 5.2 Determinação eletroanalítica de carbamatos em tomate e batata

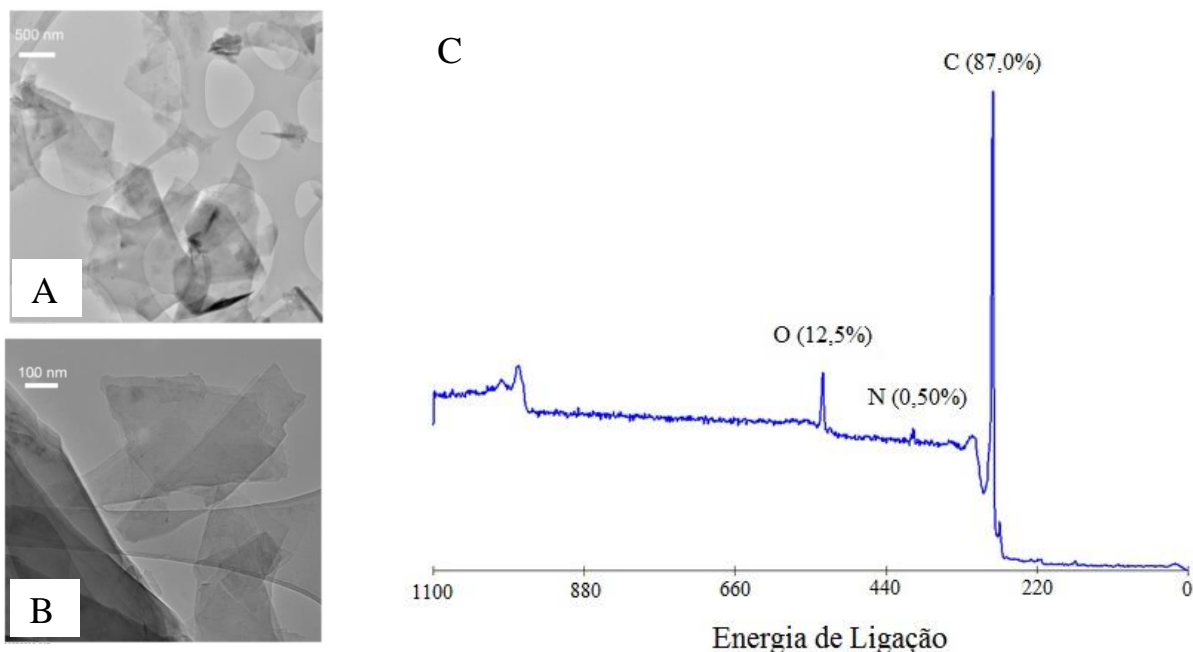
### 5.2.1 Desenvolvimento do biossensor enzimático LAC/AP/EPG

#### 5.2.1.1 Caracterização do grafeno

Assim como MWCNT, o grafeno é outra nanoestrutura de carbono com excepcionais propriedades elétricas para ser utilizado na configuração eletródica de biossensores.<sup>62,63,87,95</sup> Partindo deste princípio, o segundo dispositivo contemplado neste trabalho utilizou eletrodo de pasta de grafeno (EPG) como suporte eletródico. As imagens obtidas por TEM, que podem ser

vistas na Figura 10, confirmaram a esfoliação da grafite em N-metil-2-pirrolidona, onde folhas de grafeno com poucas camadas são observadas.

Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão das folhas de grafeno, exibindo (A) forma e (B) espessura irregulares, em diferentes ampliações. (C) Espectro fotoeletrônico de raios-X indicando a composição da superfície das folhas de grafeno



Fonte: autoria própria.

Pela Figura 10A, também pode ser constatado que a morfologia desse material não era uniforme. O processo de esfoliação produziu grafeno com poucas camadas, com forma e tamanho irregulares, que variaram entre  $\sim 500$  nm e  $\sim 1,5$   $\mu$ m. A Figura 10B apresenta imagem obtida em maior ampliação, onde podem ser constatadas variações na espessura desse nanomaterial.

Análises realizadas por XPS indicaram que a superfície do grafeno era composta de 87,0% de carbono, 12,5% de oxigênio e 0,50% de nitrogênio. A Figura 10C ilustra um espectro representativo dos resultados obtidos. A baixa porcentagem de oxigênio confirmou a presença de grafeno reduzido. A presença de nitrogênio pode ser atribuída a uma pequena contaminação por N-metil-2-pirrolidona.

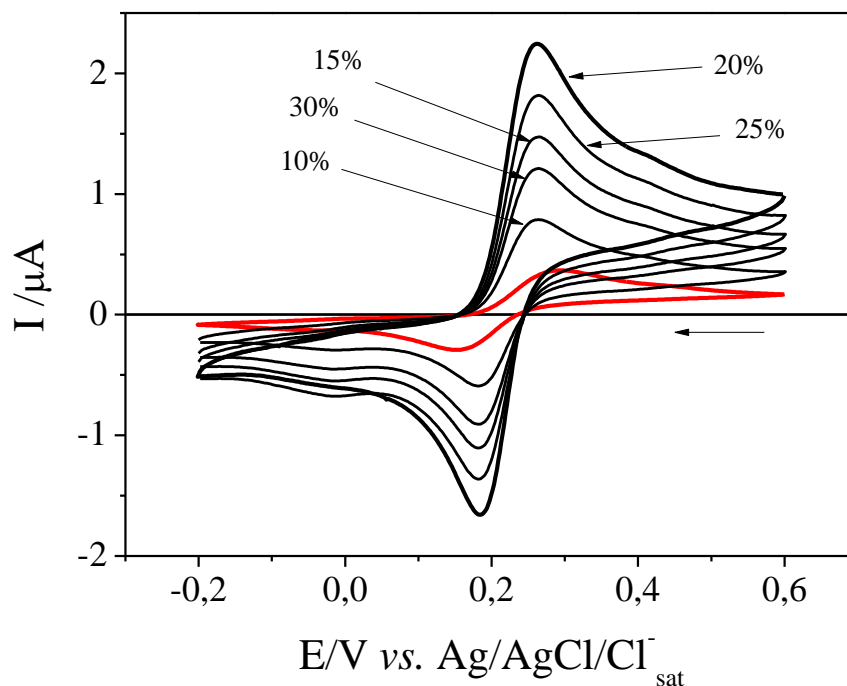
Outro parâmetro importante considerado foi a influência do estado de oxidação do grafeno em relação à resposta eletroquímica do substrato 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0. O grafeno oxidado (46,8% de oxigênio por XPS) foi sintetizado a partir do grafeno reduzido, conforme descrito no item 4.2. No entanto, constatou-se que o sinal analítico observado com o grafeno reduzido é praticamente duas vezes maior que para o grafeno oxidado, provavelmente devido à forte interação  $\pi$ - $\pi$  predominante na forma reduzida. Essa interação favoreceu a deslocalização eletrônica, indicando que o estado reduzido do grafeno foi mais adequado para estudos eletroquímicos que utilizaram o 4-AMF como substrato.

#### 5.2.1.2 Proporção de grafeno na pasta de carbono

A proporção adequada de grafeno (0, 10, 15, 20, 25 e 30%, m/m) na composição da pasta de grafite espectroscópico (pó de grafite espectroscópico e óleo de parafina na proporção 70:30% m/m) foi investigado por VC a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , utilizando-se 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, de -0,2 a 0,6 V. Nessas condições, o comportamento eletroquímico do 4-AMF foi representado por um par redox bem definido, registrado em 0,28 V (processo anódico) e 0,15 V (processo catódico), correspondendo à sua conversão a um intermediário imino-quinona, por mecanismo quase-reversível envolvendo  $2\text{H}^+$  e  $2\text{e}^-$ , conforme descrito no item 4.1.1.2.<sup>81</sup>

Como pode ser observado na Figura 11, a presença de grafeno na composição da pasta promoveu aumento significativo da reversibilidade do processo, menor separação entre os potenciais de pico, aumento das correntes de pico e efeito catalítico do processo redox. Segundo Pumera *et al.*, este efeito pode ser atribuído aos sítios reativos existentes nos defeitos/ranhuras localizados nas extremidades das folhas de grafeno, que conferem elevada constante de transferência eletrônica ( $k \approx 0,01 \text{ cm s}^{-1}$ ) aos sensores. A ausência de defeitos/ranhuras nas folhas de grafeno, como acontece no plano basal das nanoestruturas, tornam a constante de transferência eletrônica praticamente nula ( $k < 1,0 \times 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ ).<sup>144</sup> Considerando que os valores mais intensos de corrente foram observados para EPG contendo 20% do material (m/m), esta proporção foi selecionada para o desenvolvimento dos biossensores enzimáticos.

Figura 11 – Voltamogramas cíclicos de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  obtidos sobre eletrodo de pasta de grafite não modificado (linha vermelha) e na presença de diferentes porcentagens de grafeno (m/m, linhas pretas), a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,0



Fonte: autoria própria.

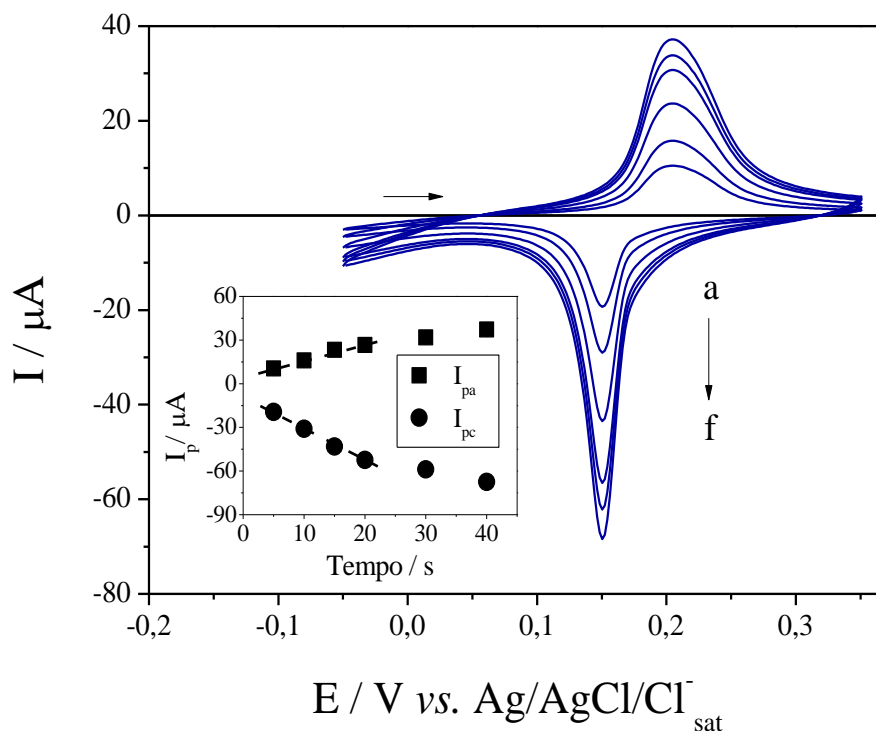
### 5.2.1.3 Eletrodeposição e ativação dos filmes de Azul da Prússia

Apesar do EPG não modificado possuir características interessantes como sensor eletroquímico, a imobilização direta de elementos de biorreconhecimento, como as enzimas, é um tanto limitada, em virtude da baixa aderência do material biológico, facilidade de lixiviação e baixa estabilidade do dispositivo.<sup>128</sup> Sabendo que filmes de AP, quando utilizados em meio ácido, são considerados excelentes suportes para a imobilização enzimática, sua inserção na configuração eletródica do sensor foi investigada. A eficiência da eletrodeposição dos filmes de AP sobre EPG foi representada por um par redox, registrado em 0,20 V (pico anódico) e 0,15 V (pico catódico), que corresponde à redução de AP em Branco da Prússia, conforme descrito no seguinte esquema:



Diferentes tempos de eletrodeposição de AP sobre EPG foram investigados, conforme ilustrado na Figura 12. A presença de picos definidos e reproduzíveis ( $\Delta E_p \approx 60$  mV) são próprios da estabilidade e cinética eletródica rápida do eletrodepósito.<sup>128,145</sup> O perfil característico dos filmes de AP já era observado com apenas 5 s de eletrodeposição, sugerindo rápida modificação da superfície de trabalho. As correntes de pico anódica e catódica aumentaram linearmente até 20 s de eletrodeposição (inserção da Figura 12). A adoção de tempos maiores afetou negativamente a resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ) do dispositivo, reduzindo a sensibilidade do procedimento.

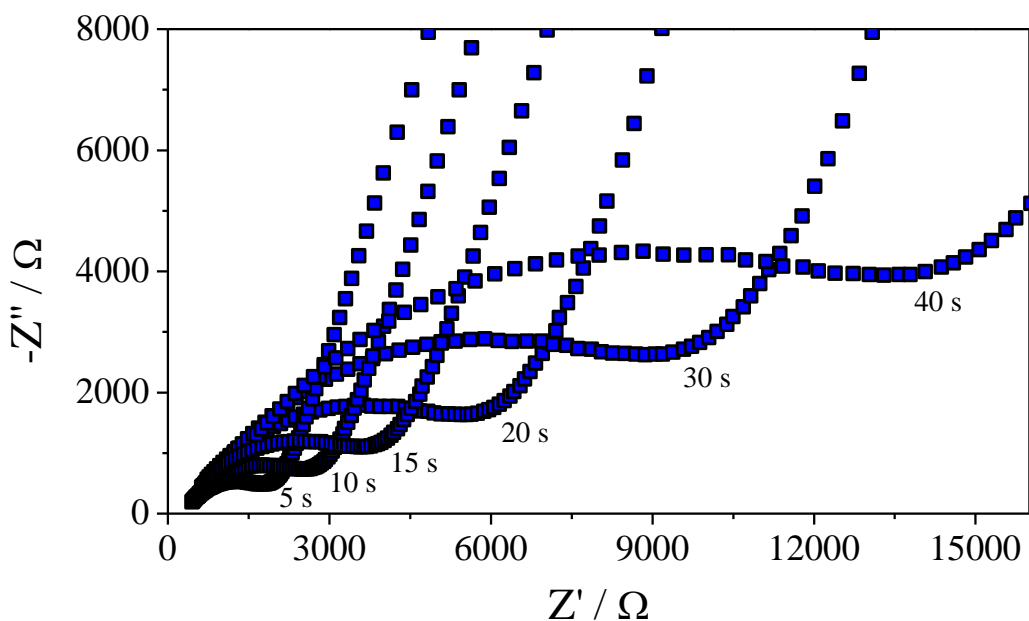
Figura 12 – Voltamogramas cíclicos dos filmes de AP sobre EPG, com tempos de eletrodeposição de (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 30 e (f) 40 s, e ativados em solução equimolar ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) de KCl e de HCl, a  $40 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: autoria própria.

De fato, com base nos diagramas de Nyquist obtidos por EIE, apresentados na Figura 13, comprovou-se aumento do arco capacitivo proporcional ao aumento do tempo de eletrodeposição, associado com a espessura da camada de AP eletrodepositada sobre EPG. Considerando que o filme de AP obtido com 20 s de eletrodeposição apresentou estabilidade e reprodutibilidade superior aos obtidos em intervalos de tempo superior, além de  $R_{tc}$  (607  $\Omega$ ) moderada, este tempo foi selecionado como condição otimizada para a construção do dispositivo. O sensor resultante foi denominado como AP/EPG.

Figura 13 – Diagramas de Nyquist obtidos para redução de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> sobre AP/EPG, em meio de tampão BR pH 5,0, aplicando 0,20 V na faixa de frequência de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz, com amplitude de perturbação de 5,0 mV



Fonte: autoria própria.

#### 5.2.1.4 Imobilização da enzima lacase

É importante ressaltar que, em meio neutro ou alcalino, os filmes de AP têm importante limitação por serem altamente solúveis, necessitando que este receba nova camada protetora (Nafion<sup>®</sup>, polipirrol, polianilina ou quitosana) para impedir sua lixiviação.<sup>135,146</sup> No entanto, em

condições ácidas, este policristal é insolúvel e altamente estável, permitindo, em alguns casos, a imobilização direta dos elementos de biorreconhecimento.

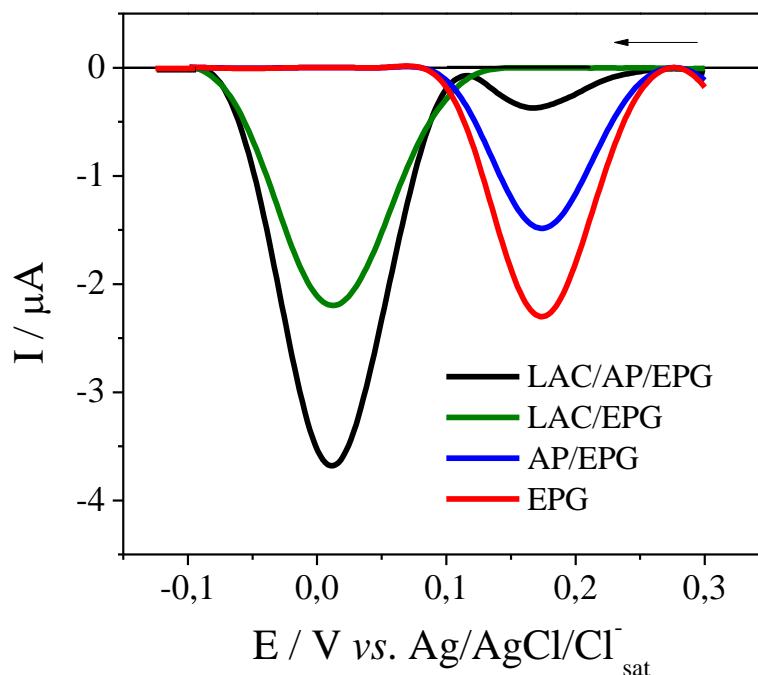
Neste trabalho, a otimização da concentração de LAC (5,00; 7,50; 10,0; 12,5 e 15,0 U mL<sup>-1</sup>) foi realizada com base na intensidade de I<sub>p</sub> obtida com a catálise da oxidação de 4-AMF 4,75×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão BR pH 5,0, para um tempo incubação de 30 minutos. A imobilização se deu diretamente sobre AP/EPG por *drop coating* (200 µL da solução enzimática), sem a necessidade de qualquer reagente para *cross-linking*, com aumento nos valores de corrente até 10 U mL<sup>-1</sup>. Os biossensores construídos com elevadas concentrações de LAC se mostraram mais capacitivos, reduzindo os valores de I<sub>p</sub> e comprometendo seu desempenho como dispositivo analítico. Deste modo, o biossensor enzimático LAC/AP/EPG foi construído pela imobilização direta de 10 U mL<sup>-1</sup> da enzima LAC.

### 5.2.2 Caracterização eletroquímica do biossensor enzimático

Ensaio realizados por VOQ mostraram que, na ausência da enzima, o processo de redução do 4-AMF (+0,1 V) é mais intenso para EPG não modificado quando comparado ao AP/EPG, sugerindo aumento na capacitância do sistema, como ilustrado na Figura 14. No entanto, na presença de LAC, o processo de redução (-0,05 V) foi maior para LAC/AP/EPG em comparação a LAC/EPG, mostrando que os filmes de AP possuem um efeito sinérgico positivo na configuração eletródica e na sensibilidade do dispositivo. Em geral, a modificação de sensores por filmes de AP atribui maior área superficial, permitindo que maior quantidade de LAC seja imobilizada e, conseqüentemente, maior seja a concentração do substrato oxidado e a intensidade do processo redox observada.

Com a estabilização do biossensor em 30 minutos e após 20 ciclos consecutivos, foi constatada a redução de 28% do sinal analítico para LAC/EPG, enquanto que para LAC/AP/EPG foi de apenas 7%, indicando maior estabilidade para este último dispositivo. Esse resultado também mostrou que filmes de AP também conferiram maior aderência da enzima em comparação à EPG não modificado.

Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para redução de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EPG (linha vermelha), AP/EPG (linha azul), LAC/EPG (linha verde) e LAC/AP/EPG (linha preta) em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

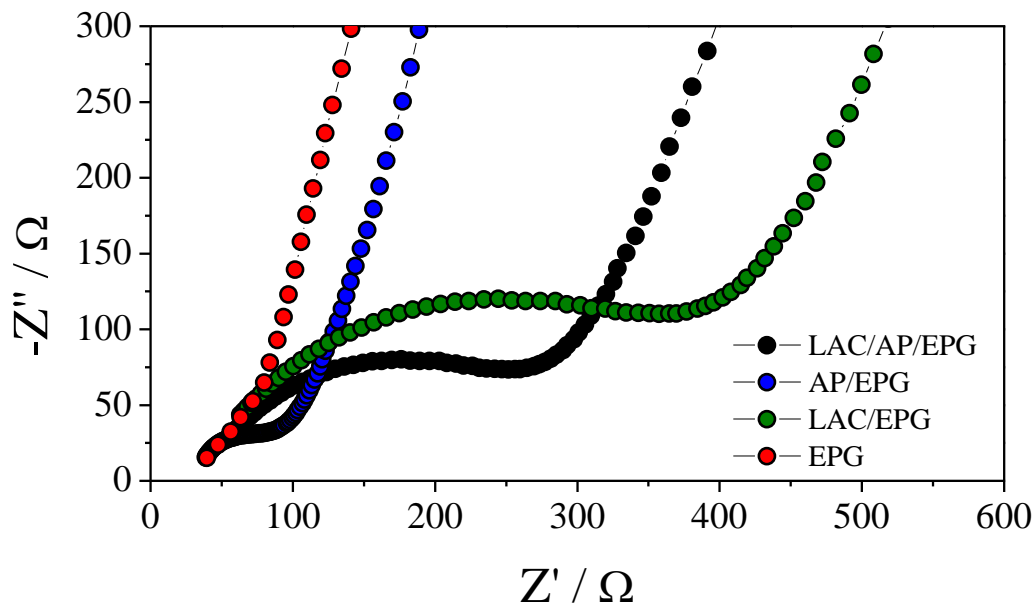


Fonte: autoria própria.

A partir dos diagramas de Nyquist apresentados na Figura 15, obtidos para a redução de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de tampão BR pH 5,0; antes e após a catálise enzimática, também foi possível obter informações acerca da resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ) dos diferentes dispositivos. EPG não modificado apresentou comportamento praticamente linear, característico de processos controlados por difusão, mas a eletrodeposição de AP proporcionou o surgimento de um arco capacitivo ( $R_{tc} = 90 \text{ } \Omega$ ), decorrente do aumento da resistência à transferência de carga. Por outro lado, com a etapa de imobilização da enzima, o efeito capacitivo foi menor para LAC/AP/EPG ( $R_{tc} = 267 \text{ } \Omega$ ) quando comparado à LAC/EPG ( $R_{tc} = 396 \text{ } \Omega$ ), corroborando os dados obtidos por VOQ. Vale ressaltar que o aumento dos arcos capacitivos são indícios do sucesso na imobilização das respectivas camadas.<sup>140</sup> Portanto, os resultados exibidos mostraram que LAC/AP/EPG possui configuração eletródica e sensibilidade mais adequadas para ser utilizado como dispositivo analítico.



Figura 15 – Diagramas de Nyquist obtidos para redução de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre EPG, AP/EPG, LAC/EPG e LAC/AP/EPG em meio de tampão BR pH 5,0, na faixa de frequência de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz, aplicando 0,20 V na ausência e -0,01 V na presença de LAC



Fonte: autoria própria.

### 5.2.3 Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos

O efeito catalítico das enzimas é fortemente influenciado pelo pH do meio, sendo que a atividade das lacases estende-se do meio ácido ao levemente básico.<sup>88</sup> Neste trabalho, a atividade de LAC imobilizada sobre AP/EPG foi investigada no intervalo de pH 2,0 a 8,0. Os resultados indicaram que o aumento do pH proporcionou aumento nos valores de  $I_p$  até pH 5,0, acompanhado de deslocamento linear de  $E_p$  para valores mais negativos. Além disso, foi constatado que, para tempo de incubação de 30 minutos, a catálise completa da reação só foi observada no intervalo de pH entre 4,0 e 6,0, correspondente à faixa de trabalho onde se obtém a maior atividade de LAC, sendo pH 5,0 a condição otimizada.<sup>122,147</sup>

Diferentes concentrações de LAC (5,00; 7,50; 10,0; 12,5 e 15,0  $\text{U mL}^{-1}$ ) foram utilizadas para avaliar a proporção a ser imobilizada sobre AP/EPG. Aumento significativo nos valores de  $I_p$  foram observados até 10  $\text{U mL}^{-1}$ , havendo decaimento em valores superiores, provavelmente, devido ao aumento da resistência ôhmica do dispositivo, que dificultou a transferência de carga.

O tempo de incubação foi otimizado em um intervalo de 60 minutos, de modo que boa estabilidade do sinal analítico (-0,05 V) já era observada ao longo de 30 minutos. Portanto, as melhores condições operacionais obtidas para LAC/AP/EPG foram: pH 5,0, concentração da solução enzimática de  $10 \text{ U mL}^{-1}$  e tempo de incubação de 30 minutos.

A quantificação dos CBM foi realizada por VOQ. Para isso, os parâmetros que afetam o sinal eletroquímico nesta técnica (frequências de 10 a  $300 \text{ s}^{-1}$ , amplitudes de 10 a 60 mV e incrementos de 1 a 8 mV) foram otimizados, a fim de se obter o máximo de sensibilidade analítica em termos de intensidade de  $I_p$ , deslocamento de  $E_p$  e aumento da  $\Delta E_{p/2}$ . Os valores otimizados foram:  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .

#### 5.2.4 *Curvas analíticas e figuras de mérito*

Com base na inibição do pico analítico (-0,05 V) referente à redução da *p*-benzoquinona, produto da oxidação catalítica do 4-AMF, foram construídas curvas analíticas para carbofurano (CBF), carbaril (CBR), formetanato (FMT), pirimicarbe (PMB) e ziram (ZRM). De acordo com as figuras de mérito exibidas na Tabela 4, as curvas analíticas apresentaram ampla região linear, com reduzida dispersão dos dados, onde os valores de  $r$  variaram entre 0,9989 e 0,9997. A maior sensibilidade foi obtida para CBR ( $LD 5,50 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ ), mas resultados aceitáveis também foram encontrados para os demais pesticidas, variando de  $1,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,022 \text{ mg kg}^{-1}$ ) para CBF a  $6,12 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$ ) para FMT.

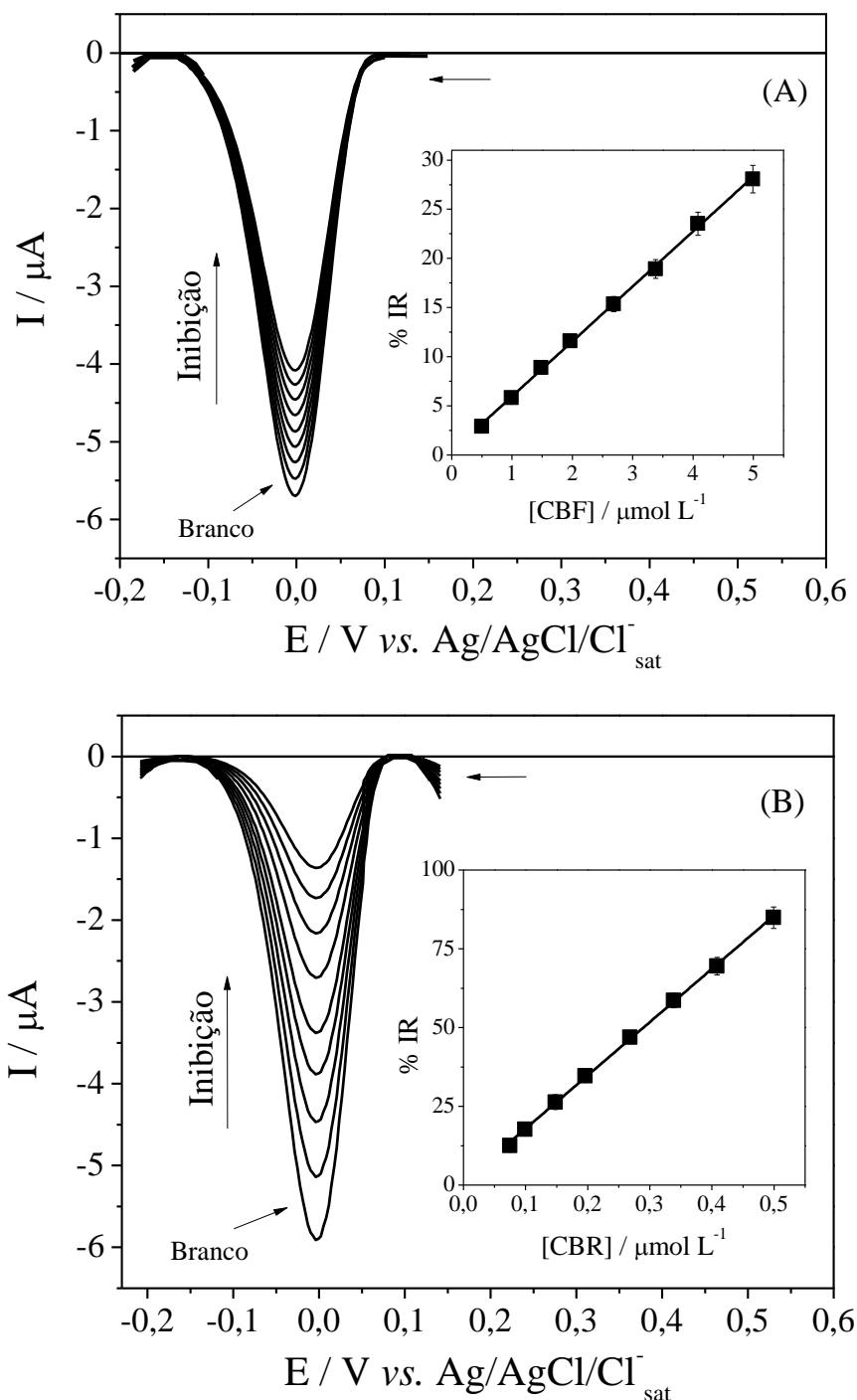
As diferentes porcentagens de inibição estão diretamente relacionadas com o nível de toxicidade de cada composto para com a atividade enzimática.<sup>111,113,119</sup> A Figura 16 ilustra exemplos de curvas analíticas obtidas para os CBM, com diferentes níveis de inibição do sinal analítico. Em todos os casos, a sensibilidade obtida atendeu às exigências das agências de controle de qualidade e segurança alimentar brasileira (ANVISA) e europeia (AESAs) para avaliar se os resíduos de CBM presentes em hortaliças estão dentro dos limites máximos pré-estabelecidos,<sup>141,142</sup> ou seja, de 0,1 a  $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$  para tomate e de 0,05 a  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  para batata. Em outras palavras, os valores de LD e LQ obtidos permitem quantificar valores de CBM muito menores que o LMR exigido pela legislação vigente, reafirmando a elevada sensibilidade do método proposto.

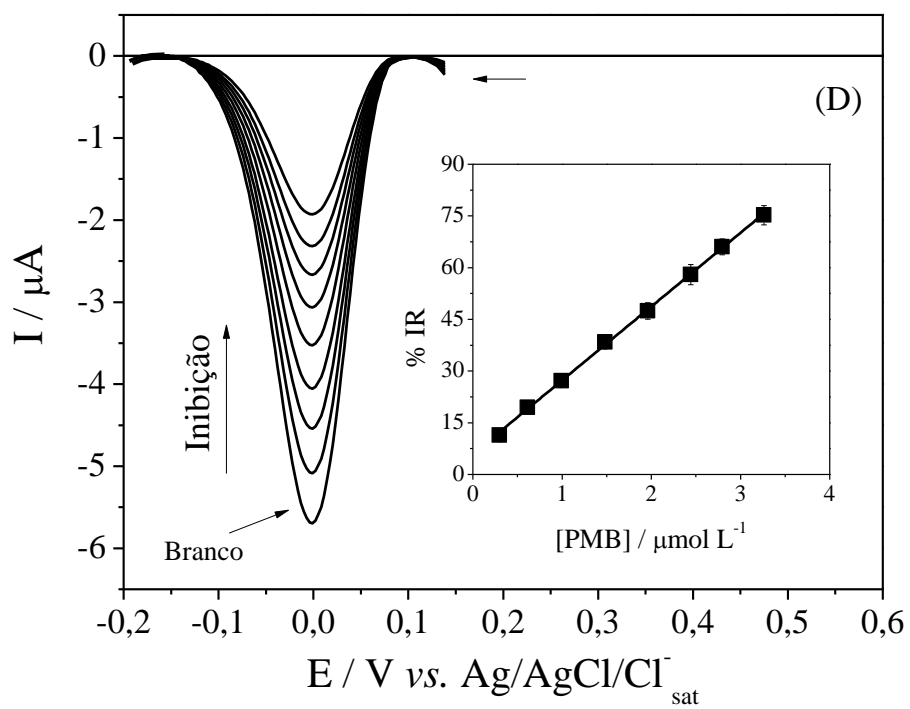
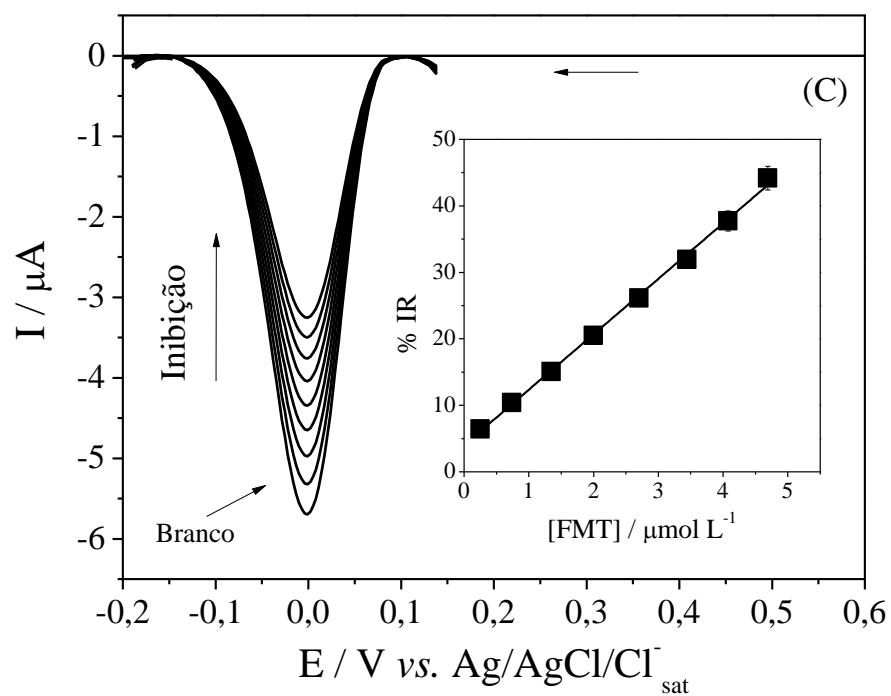
Tabela 4 – Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC/AP/EPG como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 30 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0,  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV

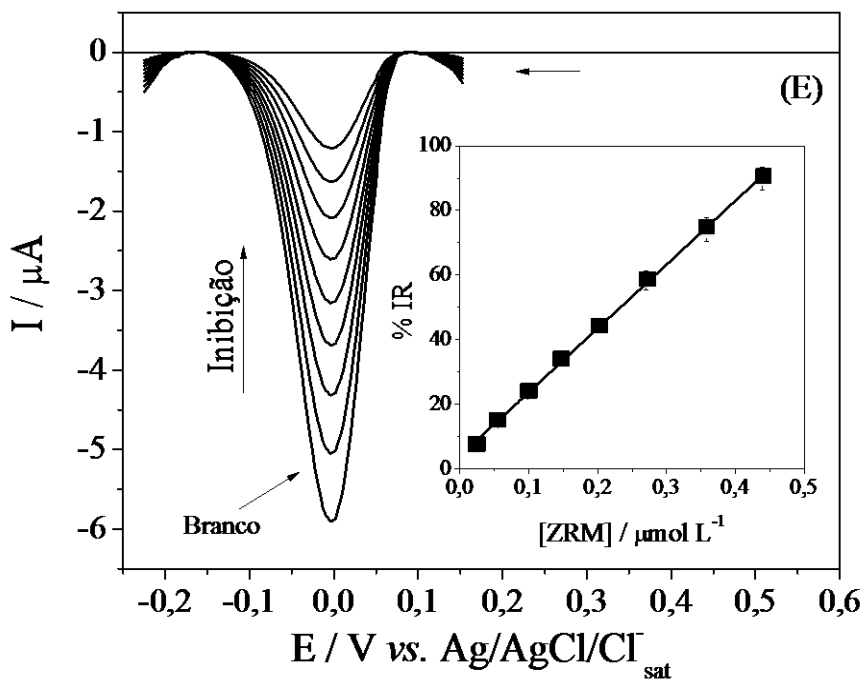
Parâmetro	Carbamatos estudados				
	CBF	CBR	FMT	PMB	ZRM
Faixa de Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	$4,98 \times 10^{-7}$ a $5,88 \times 10^{-6}$	$7,44 \times 10^{-8}$ a $8,47 \times 10^{-7}$	$2,49 \times 10^{-7}$ a $4,76 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-7}$ a $5,66 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-8}$ a $5,66 \times 10^{-7}$
Intercepto (% de inibição)	0,50	1,69	4,01	5,95	3,40
IC do Intercepto	$3,28 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-2}$	$1,05 \times 10^{-3}$	$3,90 \times 10^{-2}$	$2,23 \times 10^{-2}$
Inclinação (% de inibição mol <sup>-1</sup> L)	$3,53 \times 10^6$	$1,66 \times 10^8$	$8,34 \times 10^6$	$2,16 \times 10^7$	$2,02 \times 10^8$
IC da Inclinação	$2,31 \times 10^4$	$1,09 \times 10^6$	$3,89 \times 10^4$	$1,42 \times 10^5$	$1,32 \times 10^6$
<i>r</i>	0,9993	0,9989	0,9990	0,9997	0,9993
LD (mol L <sup>-1</sup> )	$1,01 \times 10^{-7}$	$5,54 \times 10^{-9}$	$6,67 \times 10^{-8}$	$3,10 \times 10^{-8}$	$5,20 \times 10^{-9}$
LD (mg kg <sup>-1</sup> )	0,022	0,001	0,017	0,007	0,002
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	$3,38 \times 10^{-7}$	$1,85 \times 10^{-8}$	$2,22 \times 10^{-7}$	$1,03 \times 10^{-7}$	$1,73 \times 10^{-8}$
LQ (mg kg <sup>-1</sup> )	0,074	0,003	0,057	0,024	0,006
Repetibilidade (intra-day, %DPR)	2,1	3,3	2,9	2,5	1,8
Repetibilidade (inter-day, %DPR)	3,4	3,8	3,4	2,9	2,4
Reprodutibilidade (%DPR)	6,3	4,8	4,1	4,9	5,0

Fonte: autoria própria.

Figura 16 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com biossensor LAC/AP/EPG para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) carbaril, (C) formetanato, (D) pirimicarbe e (E) ziram, usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro







Fonte: autoria própria.

Os testes de repetibilidade *intra-day* e *inter-day* foram realizados com 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de tampão BR pH 5,0 e na presença dos CBM ( $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  para CBR e ZRM e  $1,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para CBF, FMT e PMB). Os valores de %DPR variaram de 1,8 a 3,3% para a repetibilidade *intra-day* e de 2,4 a 3,8% para a *inter-day*. Esse resultado também pode ser comprovado pelas barras de erro nas inserções da Figura 16. Os testes de reprodutibilidade também foram satisfatórios, de modo que os valores de %DPR variaram de 4,1 a 6,3%.

A estabilidade foi avaliada durante 30 dias, usando diferentes dispositivos, preparados nas mesmas condições e armazenados a  $\pm 4,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Houve redução de 9,3% do sinal analítico, indicando que a atividade da enzima no biossensor é mantida por um período aceitável.<sup>90</sup> Deste modo, pode-se concluir que o biossensor LAC/AP/EPG possui possibilidades de emprego como ferramenta analítica, com destaque para sua facilidade de preparação, sensibilidade, estabilidade, precisão das medidas, além de tempo de análise relativamente curto.

### 5.2.5 Experimentos de recuperação e estudo de interferentes

LAC/AP/EPG foi utilizado para quantificar CBM em extratos de tomate e de batata, obtidos pelo método QuEChERS,<sup>133,134</sup> em dois níveis de fortificação, como visto na Tabela 5. REC variou de  $90,2 \pm 0,1\%$  a  $101,1 \pm 0,3\%$  para tomate e de  $91,0 \pm 0,1\%$  a  $100,8 \pm 0,1\%$  para batata, reforçando a sensibilidade do método.

Tabela 5 – Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de tomate e de batata, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC/AP/EPG como biossensor. Condições experimentais: tempo de incubação de 30 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,0,  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV

Parâmetro	Carbamatos avaliados				
	CBF	CBR	FMT	PMB	ZRM
<b>Fortificação 1</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,21	0,02	0,21	0,23	0,02
<b>Recuperação em</b> <b>tomate (%)</b>	$90,2 \pm 0,1$	$92,7 \pm 0,4$	$94,6 \pm 0,1$	$96,9 \pm 0,1$	$97,6 \pm 0,1$
<b>Recuperação em</b> <b>batata (%)</b>	$94,0 \pm 0,3$	$95,0 \pm 0,4$	$91,0 \pm 0,1$	$97,0 \pm 0,1$	$98,0 \pm 0,1$
<b>Fortificação 2</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,54	0,06	0,64	0,58	0,10
<b>Recuperação em</b> <b>tomate (%)</b>	$95,8 \pm 0,1$	$97,5 \pm 0,5$	$97,1 \pm 0,3$	$100,3 \pm 0,2$	$101,1 \pm 0,3$
<b>Recuperação em</b> <b>batata (%)</b>	$96,1 \pm 0,2$	$97,7 \pm 0,4$	$95,8 \pm 0,1$	$98,5 \pm 0,1$	$100,8 \pm 0,1$

Fonte: autoria própria.

Esses valores foram comparáveis aos obtidos por outros autores, usando biossensores enzimáticos à base de acetilcolinesterase (AChE) para quantificar CBF, CBR e PMB.<sup>104,113</sup> Bucur *et al.*<sup>113</sup> desenvolveram biossensores amperométricos constituídos por eletrodos impressos

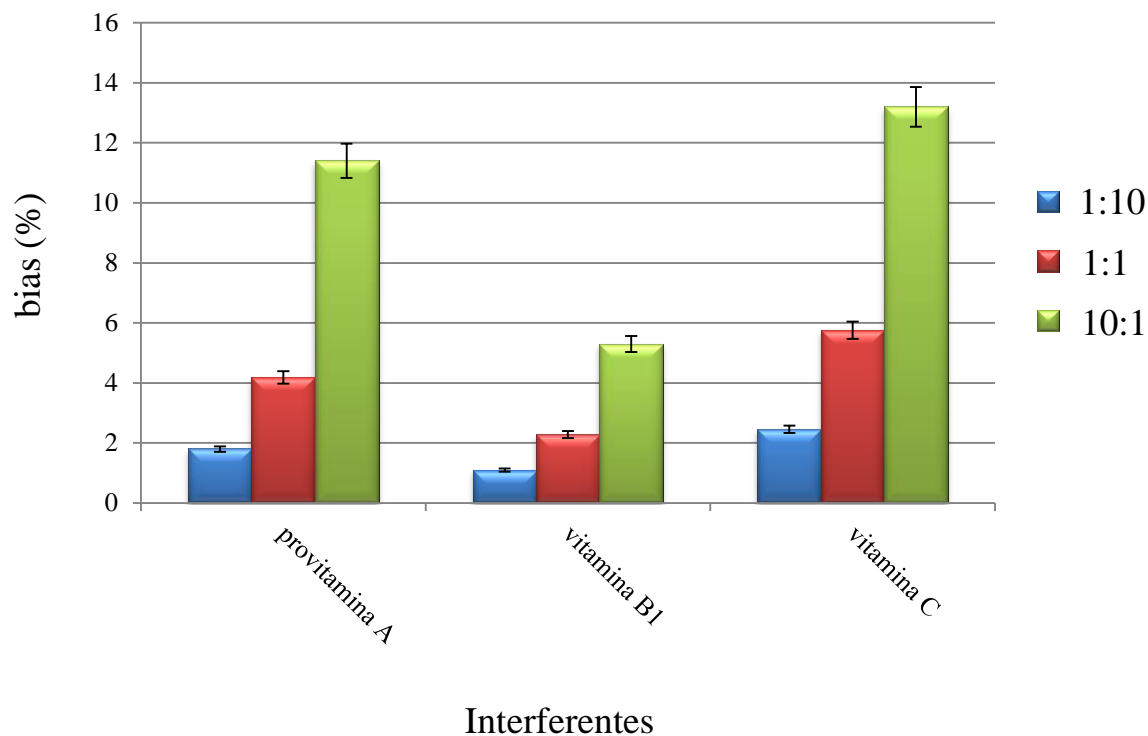
modificados com 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano, seguido da incorporação de mutantes da AChE extraída de *Drosophila melanogaster*, para determinar CBF, CBR e PMB em águas de abastecimento contaminadas. Os maiores valores de REC de CBF (87%; fortificação de  $5,0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>), CBR (90%; fortificação de  $5,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e PMB (91%; fortificação de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) foram obtidos com os dispositivos modificados com os mutantes Y370A, I199V e E69W, respectivamente. Caetano e Machado<sup>104</sup> desenvolveram um método altamente robusto e com baixo nível de interferentes para determinar CBR em tomates, sem qualquer tratamento prévio. O dispositivo era constituído de eletrodos de pasta de carbono modificados com AChE, permitindo valores de recuperação equivalentes a 83,4%, para nível de fortificação de  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

No caso de FMT, Ribeiro *et al.*<sup>148</sup> utilizaram eletrodo de ouro modificado com NpAu e LAC, imobilizada por *cross-linking* com glutaraldeído, para quantificar este CBM em extratos QuEChERS de frutas. Os valores de REC variaram entre 96,1 e 108,6% em amostras de manga (contaminações de 0,49-1,70 mg kg<sup>-1</sup>) e entre 95,5 e 99,8% em amostras de uva (contaminações de 0,73-1,70 mg kg<sup>-1</sup>). Nenhum biossensor para ZRM foi encontrado até o momento.

Considerando que o tomate e a batata são importantes fontes de  $\beta$ -caroteno (provitamina A), tiamina (vitamina B1) e ácido ascórbico (vitamina C), esses compostos foram testados como possíveis interferentes. Os experimentos de VOQ foram realizados na presença de diferentes razões (1:10, 1:1 e 10:1, v/v) entre os interferentes e o substrato ( $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), sendo os resultados expressos como bias (%) e apresentados na Figura 17. A vitamina B1 não mostrou nenhum efeito significativo, havendo perda no sinal de apenas  $5,3 \pm 0,1\%$  para a maior razão estudada (10:1, v/v). Os maiores efeitos foram observados para a provitamina A (perda de sinal de  $11,4 \pm 0,1\%$ ) e vitamina C (perda de sinal de  $13,2 \pm 0,2\%$ ) nos maiores níveis testados. Todavia, essa proporção de interferente é um caso extremo, dificilmente encontrada em condições naturais para a massa de vegetal (10 g) trabalhada, mas que atesta a aplicabilidade da metodologia. Portanto, utilizando o procedimento proposto, foi possível determinar traços de CBM com a seletividade e exatidão necessárias, mesmo na presença de potenciais interferentes.



Figura 17 – Influência da provitamina A, vitamina B1 e vitamina C no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ , para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 ( $n/n$ )



Fonte: autoria própria.

### 5.3 Determinação eletroanalítica de carbamatos em frutas cítricas

#### 5.3.1 Desenvolvimento do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG

##### 5.3.1.1 Proporção de nanopartículas de ouro e quitosana no material compósito

Inicialmente, é necessário informar que EPG (20% de grafeno, m/m) foi o sensor utilizado para a modificação com o filme híbrido, preparado nas condições descritas no item 5.2.1.2. Os ensaios eletroquímicos foram conduzidos em tampão BR pH 5,5, utilizando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato, no intervalo de -0,2 a 0,6 V. Os processos de redução do 4-AMF, antes e

após a catálise enzimática, foram utilizados para avaliar o desempenho do biossensor bi-enzimático.

Retomando as discussões acerca do material compósito, é conhecido na literatura que a quitosana (CS) sofre um processo de geleificação abaixo do seu pKa ( $\approx 6,5$ ), devido à protonação dos grupos amínicos.<sup>146</sup> Nestas condições, este material também pode ser utilizado como veículo para eletroimobilizar enzimas e outros elementos de biorreconhecimento, por sua adequada biocompatibilidade e habilidade como reagente para *cross-linking*.<sup>149,150</sup> Por outro lado, é necessário enriquecer a matriz com materiais condutores para contornar os problemas relacionados com sua elevada resistência elétrica. Neste trabalho, a matriz de CS em pH 5,5 foi modificada com nanopartículas de ouro (NpAu) para superar esta limitação.

Os testes de eletrodeposição da CS, na ausência e na presença do nanomaterial, foram realizados aplicando -1,5 V por 200 s.<sup>130</sup> Constatou-se que a eletroimobilização da matriz de CS não modificada proporcionou redução substancial dos valores de corrente para o processo redox do 4-AMF, devido às propriedades isolantes deste biopolímero. Influência da proporção de NpAu (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70% v/v) no material compósito também foi investigada. Os resultados indicaram aumento linear de  $I_p$  proporcional à quantidade de NpAu em todo o intervalo estudado, mas acima de 40% v/v a matriz polimérica se tornou menos consistente e mais susceptível à lixiviação. Pelo fato do material compósito contendo NpAu 40% v/v ter apresentado incrementos nos valores de  $I_p$  da ordem de duas vezes em comparação à matriz de CS não modificada, mostrando uma contribuição positiva para a sensibilidade do sensor, denominado doravante de NpAu-CS, essa foi a proporção selecionada.

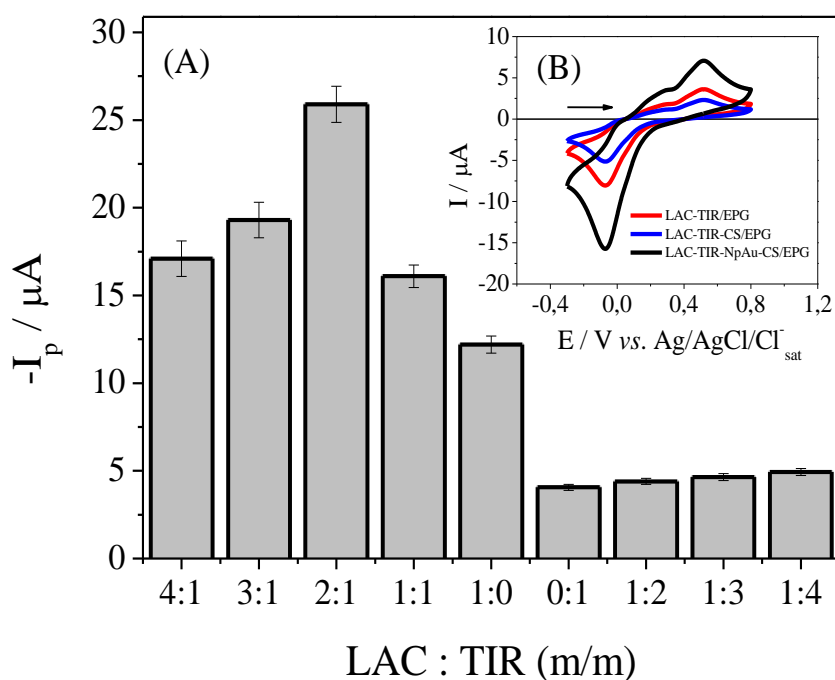
#### 5.3.1.2 Proporção das enzimas lacase e tirosinase no material compósito

Em seguida, a proporção das enzimas lacase (LAC) e tirosinase (TIR) a ser acrescentada ao compósito NpAu-CS foi otimizada. Nesse trabalho, o processo correspondente à redução de *p*-benzoquinona em *p*-hidroquinona (-0,05 V) foi, mais uma vez, utilizado para monitorar a eficiência do processo catalítico do sistema bi-enzimático proposto.

A Figura 18A apresenta as variações de  $I_p$  para os biossensores construídos com a adição de LAC<sub>(s)</sub> e de TIR<sub>(s)</sub> isoladamente e com a mistura dessas enzimas em diferentes proporções (4:1, 3:1, 2:1; 1:1, 1:0, 0:1, 1:2, 1:3 e 1:4, m/m). Valores mais intensos de corrente foram

observados nas misturas em que a quantidade de  $\text{LAC}_{(s)}$  é majoritária, com máximo obtido na proporção entre  $\text{LAC}_{(s)}$  e  $\text{TIR}_{(s)}$  de 2:1 (m/m).

Figura 18 – (A) Intensidade das correntes de pico obtidas para biossensores com diferentes proporções de  $\text{LAC}_{(s)}$  e  $\text{TIR}_{(s)}$  (m/m), usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato, em meio de tampão BR pH 5,5. (B) Comportamento eletroquímico de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre biossensores LAC-TIR/EPG (linha vermelha), LAC-TIR-CS/EPG (linha azul) e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG (linha preta), em tampão BR pH 5,5



Fonte: autoria própria.

Houve efeito sinérgico entre LAC e TIR para oxidação catalítica do 4-AMF, ampliando o sinal analítico e indicando que a resposta obtida com biossensores bi-enzimáticos foi maior que com mono-enzimáticos. Assim, para a construção do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG utilizou-se a proporção de 2:1 ( $\text{LAC}_{(s)}:\text{TIR}_{(s)}$ , m/m), igual a 0,3% m/m da massa total do material composto.

Diferentes biossensores também foram construídos por *drop coating*, usando solução composta por  $20 \text{ U mL}^{-1}$  de LAC e  $10 \text{ U mL}^{-1}$  de TIR, para avaliar a imobilização enzimática sobre EPG, CS/EPG e NpAu-CS/EPG, e a viabilidade das nanopartículas. Como pode ser

observado na Figura 18B, os valores de  $I_p$  obtidos para LAC-TIR-NpAu-CS/EPG foram até três vezes maiores que os obtidos por LAC-TIR/EPG e por LAC-TIR-CS/EPG, reafirmando a importância de NpAu no desempenho analítico do dispositivo.

### 5.3.2 Caracterização eletroquímica do biossensor bi-enzimático

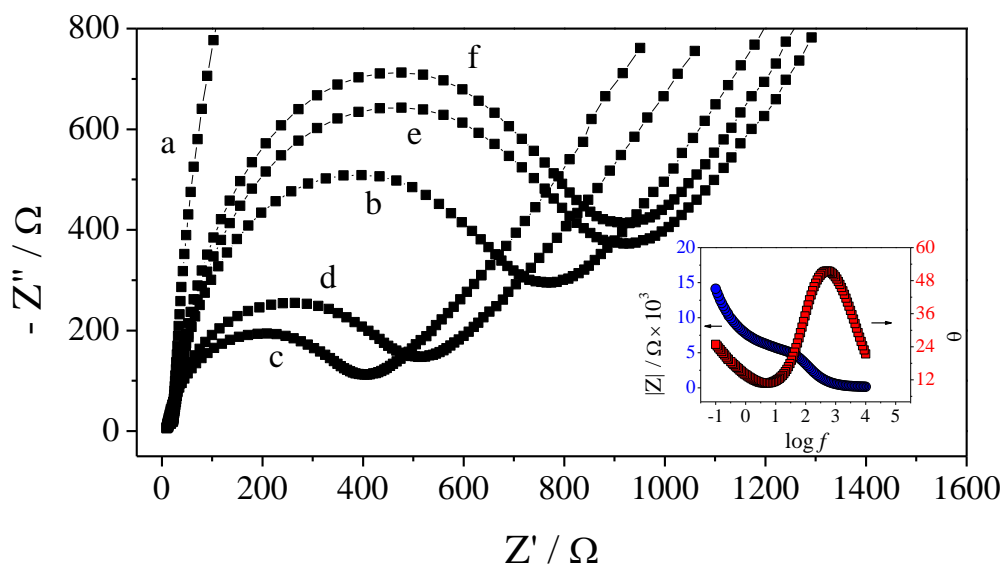
A caracterização eletroquímica de LAC-TIR-NpAu-CS/EPG foi realizada com base nos diagramas de Nyquist apresentados na Figura 19, obtidos a partir do processo redox do 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,5, antes e após a catálise enzimática. Para EPG não modificado, foi observado comportamento linear (linha a) para a relação entre impedância real e imaginária, sugerindo que o processo redox foi controlado por difusão. Quando a matriz de CS foi eletrodepositada sobre EPG, um arco capacitivo foi observado ( $R_{tc} = 767 \Omega$ , linha b), em decorrência do aumento na resistência à transferência de carga, fato comum para biopolímeros não condutores.<sup>130,131</sup> No entanto, quando a matriz de CS foi enriquecida com NpAu (linha c), o arco capacitivo diminuiu pronunciadamente ( $R_{tc} = 407 \Omega$ ), mostrando que NpAu desempenharam importante papel na condutividade do filme híbrido.<sup>86,130</sup>

Com relação à imobilização das polifenoloxidasas, foram investigadas três alternativas: dispersão no compósito NpAu-CS (linha d), imobilização direta sobre o EPG (linha e) por *drop coating* (solução contendo  $20 \text{ U mL}^{-1}$  de LAC e  $10 \text{ U mL}^{-1}$  de TIR) e dispersão na matriz de CS não modificada (linha f). O menor arco capacitivo foi observado para LAC-TIR-NpAu-CS/EPG ( $R_{tc} = 527 \Omega$ ), ou seja, quando LAC e TIR foram dispersas diretamente no compósito NpAu-CS (linha d). Isso sugere maior sensibilidade deste dispositivo em comparação com LAC-TIR/EPG (linha e) e com LAC-TIR-CS/EPG (linha f). Esses dados corroboraram os resultados obtidos por VC em relação à presença de NpAu na configuração eletródica do dispositivo.

Complementando esta discussão, na inserção da Figura 19 está apresentado o comportamento geral observado pelos diagramas de Bode para os diferentes biossensores bi-enzimáticos construídos com LAC e TIR por diferentes estratégias de imobilização. Em geral, para a relação entre o ângulo de fase ( $\theta$ ) e o logaritmo da frequência ( $\log f$ ), foram constatadas apenas alterações na intensidade do pico observado em altas frequências, em virtude das alterações na  $R_{tc}$ , mas que comprova que o dispositivo contendo NpAu possui menor resistência ôhmica frente aos demais. Em síntese, com base nos dados obtidos por VC e EIE, o biossensor

bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG apresentou a configuração eletródica mais adequada como dispositivo analítico.

Figura 19 – Diagramas de Nyquist para (a) EPG, (b) CS/EPG, (c) NpAu-CS/EPG, (d) LAC-TIR-NpAu-CS/EPG, (e) LAC-TIR/EPG e (f) LAC-TIR-CS/EPG, obtidos na faixa de frequência de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz. Condições experimentais: 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$  em meio de tampão BR pH 5,5, potencial de condicionamento de 0,2 V na ausência e -0,01 V na presença das enzimas. A inserção se refere ao comportamento geral observado pelo diagrama de Bode, para o processo redox do 4-AMF sobre as diferentes superfícies

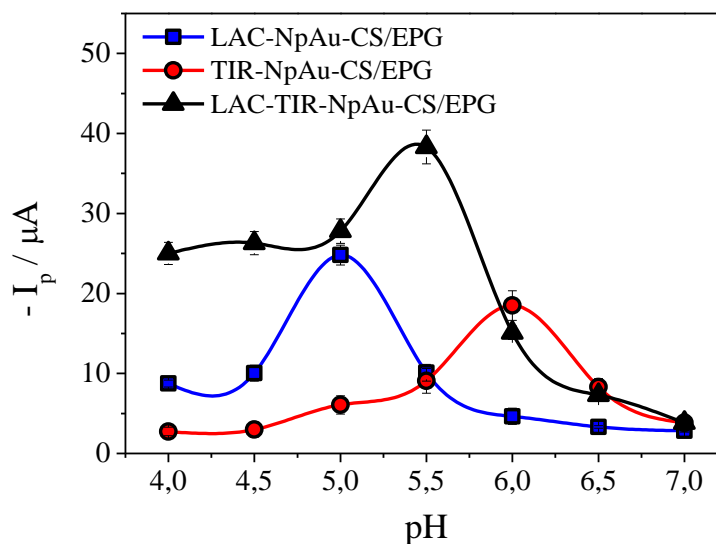


Fonte: autoria própria.

### 5.3.3 Otimização dos parâmetros operacionais e voltamétricos

Embora LAC e TIR sejam enzimas do grupo das polifenoloxidasas, as faixas de pH onde o máximo de atividade de LAC (2,0 – 6,0) e de TIR (5,0 – 8,0) são observadas são distintas.<sup>151,152</sup> Com base em estudos prévios com polifenoloxidasas das mesmas fontes que as utilizadas neste trabalho,<sup>88,121,122,151,152</sup> foi estabelecido o intervalo de pH entre 4,0 e 7,0 a ser otimizado, como ilustrado na Figura 20, usando diferentes biossensores construídos com cada enzima e com a mistura previamente otimizada.

Figura 20 – Relações entre correntes de pico e pH para a reação catalítica de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão BR pH 5,5, obtidas sobre LAC-NpAu-CS/EPG (quadrados), TIR-NpAu-CS/EPG (círculos) e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG (triângulos) a 50 mV s<sup>-1</sup> e tempo de incubação de 15 minutos



Fonte: autoria própria.

Para LAC-NpAu-CS/EPG e TIR-NpAu-CS/EPG, registrou-se um máximo de corrente em pH 5,0 e 6,0, respectivamente, sugerindo o valor de pH onde a atividade enzimática é máxima. No entanto, quando LAC e TIR são utilizadas de forma conjunta (LAC-TIR-NpAu-CS/EPG), o máximo é observado em pH 5,5. A intensidade da resposta obtida para o biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG chegou a ser de até duas vezes maior que a obtida para LAC-NpAu-CS/EPG e TIR-NpAu-CS/EPG, mostrando a contribuição do sistema bi-enzimático na amplificação do sinal analítico. Em todos os casos, o aumento de pH proporcionou deslocamento não linear de  $E_p$  para valores mais negativos. Portanto, pH 5,5 foi estabelecido como ótimo para o uso de LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como dispositivo analítico.

A atividade catalítica de cada enzima, bem como da mistura entre elas, também pode ser estudada com base na equação de Michaelis-Menten.<sup>139</sup> Em Eletroquímica, esta expressão pode ser algebricamente rearranjada para a equação de Lineweaver-Burk, que relaciona os valores de corrente com a concentração do substrato:

$$\frac{1}{I_s} = \frac{K_m(\text{aparente})}{I_{max}} \times \frac{1}{C} + \frac{1}{I_{max}} \quad (11)$$

em que  $I_s$  é a corrente de estado estacionário após a adição do substrato,  $I_{\max}$  corresponde ao máximo de corrente obtido na faixa linear,  $K_m$  (aparente) é a constante de Michaelis-Menten e  $C$  representa a concentração do substrato na solução. Quanto menor for o valor de  $K_m$  (aparente), maior será a atividade catalítica para dado sistema. Aplicando os valores obtidos, encontrou-se valores de  $K_m$  (aparente) relativamente próximos para LAC-NpAu-CS/EPG ( $37,8 \pm 0,2$ ), TIR-NpAu-CS/EPG ( $52,3 \pm 0,4$ ) e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG ( $26,9 \pm 0,5$ ), mas com maior atividade catalítica para o último sistema.

Considerando que a segunda etapa da oxidação do 4-AMF é lenta (determinante da velocidade da reação) e corresponde ao estágio em que o pico analítico ( $-0,05$  V) é estabilizado, o tempo de incubação é outro parâmetro crucial a ser otimizado. Os resultados indicaram um aumento na intensidade do processo até 15 minutos, permanecendo praticamente constante em intervalos maiores. Apesar da necessidade de 15 minutos para a estabilização do sinal, não houve necessidade de tempo de estabilização entre as medidas. Em síntese, os parâmetros operacionais para emprego de LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como sensor foram matriz polimérica composta por CS e NpAu (60:40%, v/v), posteriormente enriquecida com mistura enzimática de LAC e de TIR (2:1, m/m), correspondendo a 0,3% m/m da massa total do material compósito, sendo que o desempenho ótimo foi alcançado em pH 5,5 e com tempo de incubação de 15 minutos.

Os parâmetros da VOQ (frequências de 10 a  $300 \text{ s}^{-1}$ , amplitudes de 10 a 60 mV e incrementos de 1 a 8 mV) foram otimizados para a possível quantificação dos CBM em nível de traços. A otimização teve por base a intensidade de  $I_p$ , deslocamento dos valores de  $E_p$ , aumento de  $\Delta E_{p/2}$  e alterações na relação sinal/ruído. Constatou-se que a sensibilidade do sinal analítico foi mais pronunciada com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .

#### **5.3.4 Curvas analíticas e figuras de mérito**

O desempenho analítico do biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG para a quantificação dos carbamatos carbaril (CBR), formetanato (FMT), propoxur (PPX) e ziram (ZRM) foi investigado, aliando as condições operacionais e voltamétricas descritas, com base na inibição do processo de redução do 4-AMF (conversão de *p*-benzoquinona a *p*-hidroquinona) registrado em  $-0,05\text{V}$ . As figuras de mérito obtidas podem ser encontradas na Tabela 6.

As curvas analíticas, apresentadas na Figura 21, foram construídas seguindo o mesmo princípio de inibição dos biossensores mono-enzimáticos LAC-EPNC e LAC/AP/EPG, havendo alterações com relação à sensibilidade alcançada com LAC-TIR-NpAu-CS/EPG e à toxicidade de cada pesticida. Em geral, obteve-se ampla região linear e baixa dispersão dos dados ( $r$  variando entre 0,9988 e 0,9995), permitindo a análise de traços de CBM. A maior sensibilidade em termos de LD e de LQ foi observada para CBR ( $LD = 1,98 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 6,60 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) e ZRM ( $LD = 1,98 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 6,60 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ), embora valores aceitáveis também tenham sido encontrados para FMT ( $LD = 2,15 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 7,17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) e PPX ( $LD = 1,98 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $LQ = 6,60 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ), por alcançarem os LMR pré-estabelecidos ( $0,05 - 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pelas agências de controle e segurança alimentar brasileira (ANVISA) e europeia (AES) para a análise de CBM em frutas cítricas.<sup>8,30</sup>

Trabalhos eletroanalíticos com sistemas bi-enzimáticos ainda são restritos. Até o momento, não há nenhuma publicação relacionada à determinação de CBM com biossensores bi-enzimáticos. Mesmo assim, a sensibilidade obtida com LAC-TIR-NpAu-CS/EPG para a determinação de CBR foi similar, ou ainda superior, à mencionada por outros autores que utilizaram diferentes sensores ou biossensores (à base de AChE) para a determinação destes pesticidas, conforme descrito no item *Estado da Arte*.<sup>103,104,106,108-110,112,113,115,116,119,120</sup>

Os valores de %DPR para a repetibilidade *intra-day* ( $n = 10$ ) e *inter-day* ( $n = 5$ ) variaram de 1,2 a 2,8% e de 3,2 a 5,8%; respectivamente. No caso da reprodutibilidade, avaliada com base na resposta eletroquímica obtida para quatro diferentes dispositivos construídos nas mesmas condições experimentais, os valores de %DPR variaram entre 3,2 e 6,5%. A elevada precisão das medidas também pode ser constatada pelas barras de erro apresentadas nas inserções da Figura 21. Em adição, avaliando a estabilidade de LAC-TIR-NpAu-CS/EPG para um período de 20 dias, constatou-se redução no sinal analítico de 7,4% em relação à sua resposta inicial. A partir desses dados, é possível afirmar que, além de sensibilidade adequada para a análise de CBM, o biossensor também possui considerável estabilidade e precisão das medidas.<sup>90</sup>

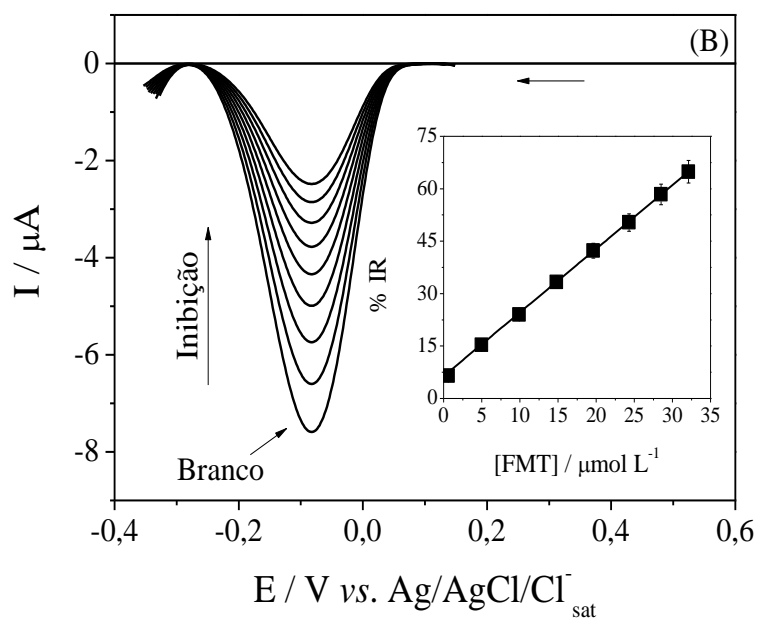
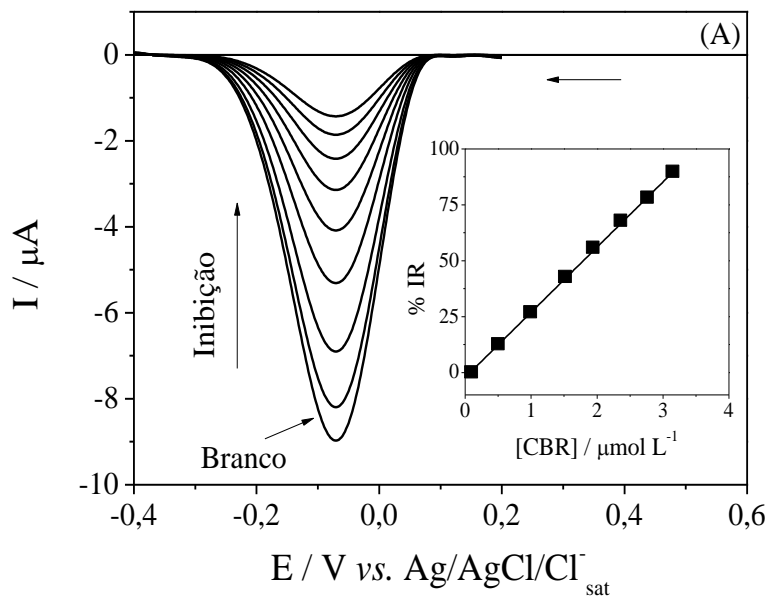


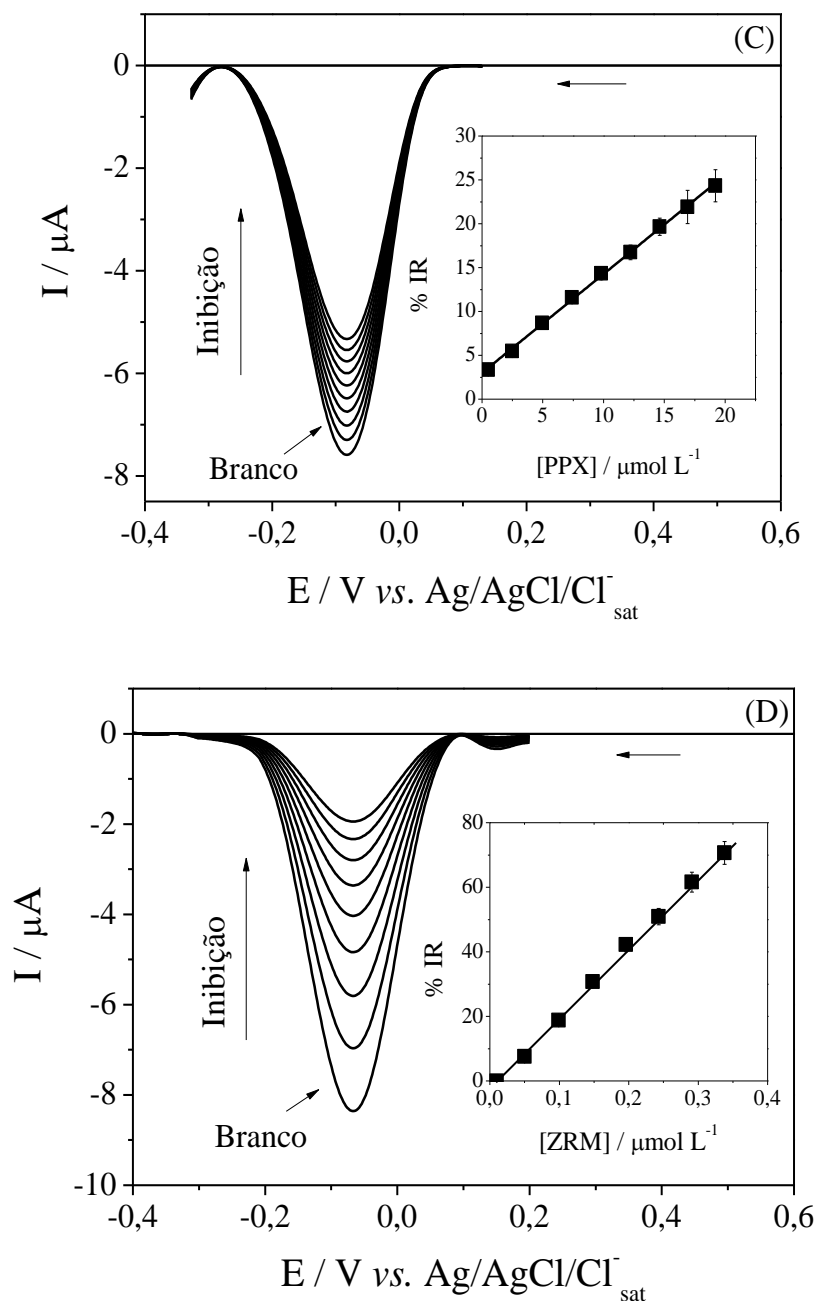
Tabela 6 – Figuras de mérito para a análise de diferentes carbamatos, usando LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como biossensor bi-enzimático. Condições experimentais: tempo de incubação de 15 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,5,  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 40$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV

Parâmetro	Carbamatos estudados			
	CBR	FMT	PPX	ZRM
<b>Faixa de Concentração (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$9,90 \times 10^{-8}$ a $2,91 \times 10^{-6}$	$9,99 \times 10^{-7}$ a $2,43 \times 10^{-5}$	$4,99 \times 10^{-7}$ a $1,92 \times 10^{-5}$	$9,99 \times 10^{-8}$ a $3,38 \times 10^{-7}$
<b>Intercepto (% de inibição)</b>	3,47	5,62	3,10	2,32
<b>IC do Intercepto</b>	$1,54 \times 10^{-2}$	$2,50 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-2}$	$1,03 \times 10^{-2}$
<b>Inclinação (% de inibição mol<sup>-1</sup> L)</b>	$3,13 \times 10^7$	$1,84 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	$2,33 \times 10^8$
<b>IC da Inclinação</b>	$1,39 \times 10^5$	$8,20 \times 10^3$	$5,84 \times 10^3$	$1,03 \times 10^6$
<b>r</b>	0,9995	0,9992	0,9988	0,9989
<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$1,98 \times 10^{-8}$	$2,15 \times 10^{-7}$	$1,87 \times 10^{-7}$	$1,68 \times 10^{-9}$
<b>LD (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,004	0,048	0,039	0,001
<b>LQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$6,60 \times 10^{-8}$	$7,17 \times 10^{-7}$	$6,25 \times 10^{-7}$	$5,62 \times 10^{-9}$
<b>LQ (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,013	0,158	0,131	0,002
<b>Repetibilidade (intra-day, %DPR)</b>	1,2	2,5	2,8	1,5
<b>Repetibilidade (inter-day, %DPR)</b>	3,2	4,3	5,8	3,8
<b>Reprodutibilidade (%DPR)</b>	3,2	5,2	6,5	4,3

Fonte: autoria própria.

Figura 21 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com biossensor LAC/AP/EPG para diferentes concentrações de (A) carbofurano, (B) carbaril, (C) formetanato, (D) pirimicarbe e (E) ziram, usando 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  como substrato em meio de tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ . As inserções se referem às curvas analíticas obtidas para cada pesticida, com as respectivas barras de erro





Fonte: autoria própria.

### 5.3.5 Experimentos de recuperação e estudo de interferentes

O extrato das frutas cítricas (laranja, tangerina e limão) para a análise dos CBM foi obtido pelo método QuEChERS.<sup>133,134</sup> Os ensaios de recuperação foram realizados pelo método da adição de padrão e encontram-se sintetizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Experimentos de recuperação de diferentes carbamatos em extratos de laranja, de tangerina e de limão, obtidos pelo método QuEChERS, usando LAC-TIR-NpAu-CS/EPG como biossensor bi-enzimático. Condições experimentais: tempo de incubação de 15 minutos, 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> como substrato em meio de tampão BR pH 5,5,  $f = 100$  s<sup>-1</sup>,  $a = 40$  mV e  $\Delta E_s = 3$  mV

Parâmetro	Carbamatos estudados			
	CBR	FMT	PPX	ZRM
<b>Fortificação 1</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,01	0,63	0,52	0,01
<b>Recuperação em laranja (%)</b>	96,3 ± 0,4	95,1 ± 0,1	93,9 ± 0,2	95,6 ± 0,4
<b>Recuperação em tangerina (%)</b>	95,7 ± 0,2	96,3 ± 0,4	94,2 ± 0,1	96,5 ± 0,1
<b>Recuperação em limão (%)</b>	94,9 ± 0,1	94,8 ± 0,6	93,8 ± 0,3	95,2 ± 0,2
<b>Fortificação 2</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,03	3,14	2,55	0,04
<b>Recuperação em laranja (%)</b>	96,8 ± 0,1	96,1 ± 0,3	95,6 ± 0,2	97,8 ± 0,3
<b>Recuperação em tangerina (%)</b>	95,7 ± 0,2	96,6 ± 0,3	96,9 ± 0,2	97,3 ± 0,3
<b>Recuperação em limão (%)</b>	94,8 ± 0,1	95,4 ± 0,5	96,2 ± 0,1	97,1 ± 0,1

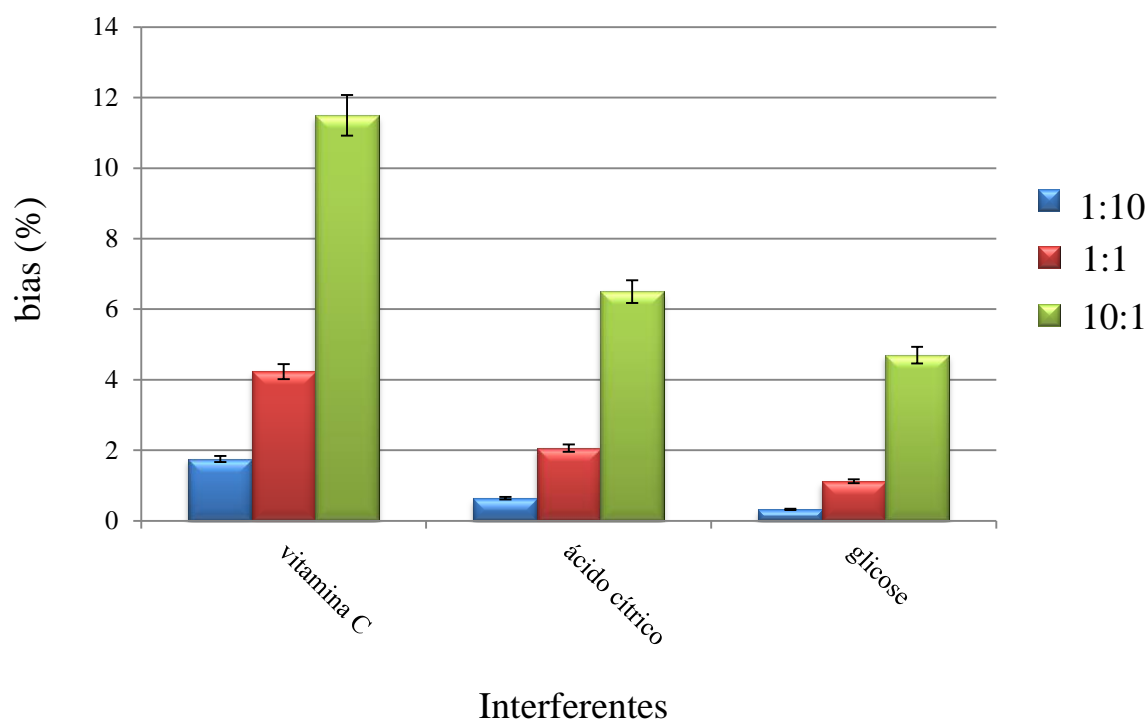
Fonte: autoria própria.

Independente do nível de fortificação investigado, valores satisfatórios de recuperação de CBM nas frutas cítricas foram alcançados (93,9 ± 0,2% a 97,8 ± 0,3% para amostras de laranja; 94,2 ± 0,1% a 97,3 ± 0,3% para amostras de tangerina; 93,8 ± 0,3% a 97,1 ± 0,1% para amostras de limão), demonstrando o êxito na utilização do biossensor LAC-TIR-NpAu-CS/EPG aliado ao método de extração QuEChERS para a análise desses pesticidas em alimentos naturais. As

recuperações obtidas com este dispositivo foram similares, ou ainda superiores, às obtidas com outros biossensores enzimáticos à base de AChE para a quantificação de CBM.<sup>103,104,106,108-110,112,113,115,116,119,120</sup> Em todos os casos, os maiores valores de %IR foram observados para ZRM, enquanto os menores para PPX. Como discutido anteriormente, essas diferenças podem estar diretamente relacionadas ao nível de toxicidade de cada carbamato frente às polifenoloxidasas (LAC e TIR) empregadas na construção do biossensor.<sup>111,113,119</sup>

Sabendo que laranja, tangerina e limão são importantes fontes de ácido ascórbico (vitamina C), ácido cítrico e glicose, estes compostos foram usados como potenciais interferentes na resposta analítica de LAC-TIR-NpAu-CS/EPG. Os experimentos foram conduzidos com diferentes razões interferente/substrato (1:10, 1:1 e 10:1, *n/n*) e os resultados expressos como bias (%), conforme indicado na Figura 22.

Figura 22 – Influência da vitamina C, ácido cítrico e glicose no sinal eletroquímico obtido com a oxidação de 4-AMF  $4,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o biossensor LAC-EPNC, em tampão BR pH 5,0, empregando  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , para razões substrato:interferente de 1:10, 1:1 e 10:1 (*n/n*)



Fonte: autoria própria.

As maiores alterações no sinal foram observadas para o ácido ascórbico, onde, na maior razão testada, calculou-se bias =  $11,5 \pm 0,4\%$ . Considerando esta razão um caso extremo para a quantidade de amostra trabalhada (10 g), pode-se dizer que a presença de ácido ascórbico nessas frutas não limita a aplicação do procedimento proposto. Ácido cítrico e glucose apresentaram menor interferência, havendo perda de  $6,5 \pm 0,1\%$  e  $4,7 \pm 0,3\%$ ; respectivamente, para a maior razão interferente/substrato testada (10:1, *n/n*). Portanto, estes resultados reforçaram a sensibilidade, a seletividade e a precisão da metodologia proposta, indicando que o biossensor bi-enzimático LAC-TIR-NpAu-CS/EPG pode ser uma estratégia promissora para a análise de CBM em frutas cítricas.

É importante ressaltar que, apesar da sensibilidade obtida com os biossensores LAC-EPNC, LAC/AP/EPG e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG para a quantificação dos resíduos de CBM em hortaliças e em frutas cítricas, estes dispositivos não foram seletivos para diferentes carbamatos presentes em uma mesma amostra. Nesse caso, conhecendo os compostos utilizados como defensivos em uma dada cultura, esses biossensores poderão ser utilizados para a análise de carbamatos totais.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho contemplou o desenvolvimento e caracterização de três biossensores enzimáticos que foram aplicados com êxito na determinação eletroanalítica de CBM em hortaliças (tomate, alface e batata) e em frutas cítricas (laranja, tangerina e limão). Embora as amostras de alimentos naturais sejam complexas, o que limita a aplicação direta dos métodos propostos, as vantagens obtidas pela associação da VOQ (baixa contribuição das correntes capacitivas) com o método de extração QuEChERS (alta eficiência na extração dos analitos) permitiram a quantificação de CBF, CBR, FMT, PMB, PPX e ZRM em nível de traços.

A presença de nanomateriais (nanotubos de carbono, grafeno e nanopartículas de ouro) na configuração eletródica dos biossensores LAC-EPNC, LAC/AP/EPG e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG afetou positivamente a cinética de transferência eletródica, permitindo aumento na intensidade do processo redox do substrato 4-AMF, redução da  $R_{tc}$  dos dispositivos e, conseqüentemente, aumento da sensibilidade dos métodos propostos. Essas características foram mantidas independentemente da técnica de imobilização enzimática utilizada.

Apesar da eficiência observada na imobilização de LAC<sub>(s)</sub> por *entrapment* em LAC-EPNC, os filmes de AP e CS também apresentaram importante papel no desenvolvimento e estabilidade dos demais dispositivos, permitindo a imobilização direta de LAC por *drop coating* em LAC/AP/EPG ou de LAC e TIR por eletrodeposição direta em LAC-TIR-NpAu-CS/EPG, sem a necessidade de reagentes tóxicos para *cross-linking*, normalmente empregados para conferir maior aderência das enzimas à superfície dos transdutores.

A sensibilidade obtida com os biossensores em questão (valores de LD variando de 0,001 a 0,093 mg kg<sup>-1</sup>) permitiu quantificar resíduos de CBM bem abaixo dos LMR para hortaliças e frutas cítricas, pré-estabelecidos pelas agências de segurança e controle alimentar brasileira (ANVISA) e europeia (AESA). Os procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos também proporcionaram medidas precisas (DPR para medidas de repetibilidade e reprodutibilidade abaixo de 7,0%), exatas (%REC variando 91,0 ± 0,1% a 101,10 ± 0,1% em contaminações de 0,01 a 3,14 mg kg<sup>-1</sup>) e com nível de interferentes relativamente baixo (bias variando de 4,70 ± 0,30% a 14,11 ± 0,01%, para uma razão interferente/substrato de 10:1, *n/n*). Deste modo, os biossensores LAC-EPNC, LAC/AP/EPG e LAC-TIR-NpAu-CS/EPG podem ser ferramentas promissoras para a análise e controle de qualidade de CBM em matrizes ambientais complexas.

## REERÊNCIAS

---

- 1 JIANG, J.-Q.; ZHOU, Z.; SHARMA, V.K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - A review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292–300, 2013.
- 2 SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. **Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais**. Caderno Temático, v. 6, Campinas: UNICAMP, 2007.
- 3 FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis of emerging contaminants in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 240–253, 2013.
- 4 MAURICIO, A.Q.; LINS, E.S. The national agricultural laboratories of Brazil and the control of residues and contaminants in food. **Food Additives & Contaminants**, v.29, p. 482–489, 2012.
- 5 LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011.
- 6 CALDAS, E.D. Pesticide poisoning in Brazil. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 419-427, 2011.
- 7 SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, Barsil). Casos de intoxicação por agrotóxicos em geral por unidade federada, segundo zona de ocorrência registrado em 2009. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/Agrotoxicos% 20em% 20geral% 202009% 20-% 20Tabela% 204.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/Agrotoxicos%20em%20geral%202009%20-%20Tabela%204.pdf)>. Acesso em 25 ago. 2013
- 8 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista de Referência de LMRs para as Culturas do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> Acessado em 25 ago. 2013.



- 
- 9 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Indicadores agropecuários. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/mapa\\_site/mapa\\_site.php#indicadores](http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#indicadores)>. Acessado em: 29 out. 2013.
  - 10 AGROTÓXICO está com maior poder de contaminação. **Diário do Nordeste**, Fortaleza, 20 de abril de 2011. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=967742>>. Acessado em: 29 out. 2013.
  - 11 AGROTÓXICO usado de forma indiscriminada no Ceará, alerta Anvisa. **Diário do Nordeste**, Fortaleza, 24 de abril de 2008. Disponível em: <<http://limoeirodonorte.blogspot.com.br/2008/05/aumentam-casos-de-cncer.html>>. Acessado em: 29 out. 2013.
  - 12 MILHOME, M.A.L.; SOUSA D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 363-372, 2009.
  - 13 MARINHO, A.M.C.P. **Contexto e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe – CE: o espelho do (des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente**. 2010. 245 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
  - 14 MORAIS, S.; DIAS, E.; PEREIRA, M.L. **Carbamates: human exposure and health effects**. In: JOKANOVIĆ, M. (Ed.). *The impact of pesticides*. Cheyenne: AcademyPublish.org, 2012.
  - 15 GENTHE, B.; LE ROUX, W.J.;SCHACHTSCHNEIDER, K.; OBERHOLSTER, P.J.; ANECK-HAHN, N.H.; CHAMIER, J. Health risk implications from simultaneous exposure to multiple environmental contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 171–179, 2013.
  - 16 PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C.T.; CONNOLLY, L. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1590–1596, 2013.

- 
- 17 ADLER, S.R. **Cellular mechanisms of endocrine disruption**. In: GORE, A.C. (Ed.). *Endocrine-disrupting chemicals: from basic research to clinical practice*. Totowa: Humana Press, 2007.
  - 18 GIERACH, I.; SHAPERO, K.; EYSTER, T.W.; WOOD, D.W. Bacterial biosensors for evaluating potential impacts of estrogenic endocrine disrupting compounds in multiple species. **Environmental Toxicology**, v. 28, p. 179–189, 2013.
  - 19 DE OLIVEIRA, M.F.; BRIGHENTI, A.M. **Comportamento dos herbicidas no ambiente**. In: OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Ominipax, 2011.
  - 20 RATHORE, H.S.; NOLLET, L. M. L. **Pesticides: evaluation of environmental pollution**. New York: CRC, 2012.
  - 21 WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; YAMASHITA, N.; SAITO, T. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, p. 311–319, 2003.
  - 22 SKINNER, M. K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 337–343, 2011.
  - 23 SIM, W.-J.; KIM, H.-Y.; CHOI, S.-D.; KWON, J.-H.; OH, J.-E. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, p. 219–227, 2013.
  - 24 REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p.283–288, 2007.
  - 25 BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4ª Ed., Porto Alegre: Bookman, 2011.
  - 26 CARSON, R. **Silent Spring**. New York: Houghton Mifflin Company, 1962.

- 
- 27 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.
- 28 MCKINLAY, R.; PLANT, J.A.; BELL, J.N.B.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 34, p. 168-183, 2008.
- 29 JENSEN, A.F.; PETERSEN, A.; GRANBY, K. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamate pesticides in the Danish diet. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, p. 776–785, 2003.
- 30 EU pesticide residues database. EU pesticide residues database for all the EU-MRLs. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/database\\_pesticide\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/database_pesticide_en.htm)> Acessado em 28 jul. 2013.
- 31 CALDAS, E.D.; BOON, P.E.; TRESSOU, J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. **Toxicology**, v. 222, p. 132-142, 2006.
- 32 YANOVSKY, I.; FINKIN-GRONER, E.; ZAIKIN, A.; LERMAN, L.; SHALOM, H.; ZEELI, S.; WEILL, T.; GINSBURG, I.; NUDELMAN, A.; WEINSTOCK, M. Carbamate derivatives of indolines as cholinesterase inhibitors and antioxidants for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10700–10715, 2012.
- 33 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Monografias de agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acessado em 27 ago. 2013.
- 34 ZUIN, V.G.; SCHELLIN, M.; MONTERO, L.; YARIWAKE, J.H.; AUGUSTO, F.; POPP, P. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 180–187, 2006.

- 
- 35 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Relatório de Atividades 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acessado em 14 set. 2013.
- 36 LACHENMEIER, D.W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 116–120, 2006.
- 37 BAFFA JÚNIOR, J.C.; MENDONÇA, R.C.S.; PEREIRA, J.M.A.T.K.; PEREIRA, J.A.M.; SOARES, N.F.F. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1383–1387, 2011.
- 38 UBEDA, C.; BALSERA, C.; TRONCOSO, A.M.; CALLEJÓN, R.M.; MORALES, M.L. Validation of an analytical method for the determination of ethyl carbamate in vinegars. **Talanta**, v. 89, p. 178–182, 2012.
- 39 ALCARDE, A.R.; DE SOUZA L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 27–31, 2012.
- 40 AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; BENCS, L.; VISZKET, E.; MIHUCZ, V.G. Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1301–1305, 2013.
- 41 CHIN-CHEN, M.-L.; RAMBLA-ALEGRE, M.; DURGBANSHI, A.; BOSE, D.; MOURYA, S.K.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Micellar liquid chromatographic determination of carbaryl and 1-naphthol in water, soil, and vegetables. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- 42 CHOWDHURY, M.A.Z.; FAKHRUDDIN, A.N.M.; ISLAM, MD.N.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S.H.; ALAM, MD.K. Detection of the residues of

- 
- nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Food Control**, v. 34, p. 457–465, 2013.
- 43 PRASAD, R.; UPADHYAY, N.; KUMAR, V. Simultaneous determination of seven carbamate pesticide residues in gram, wheat, lentil, soybean, fenugreek leaves and apple matrices. **Microchemical Journal**, v. 111, p. 91–96, 2013.
- 44 SONG, X.-Y.; SHI, Y.-P.; CHEN, J. Carbon nanotubes-reinforced hollow fibre solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of carbamate pesticides in apples. **Food Chemistry**, v. 139, p. 246–252, 2013.
- 45 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.
- 46 PARK, K.H.; CHOI, J.-H.; EL-ATY, A.M.A.; RAHMAN, MD.M.; JANG, J.; KO, A.-Y.; KWOND, K.S.; PARK, H.R.; KIM, H.S.; SHIM, J.-H. Quantifying fenobucarb residue levels in beef muscles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and QuEChERS sample preparation. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2306–2311, 2013.
- 47 MALIK, A.K.; FAUBEL, W. Capillary electrophoretic determination of zinc dimethyldithiocarbamate (Ziram) and zinc ethylenebisdithiocarbamate (Zineb). **Talanta**, v. 52, p. 341–346, 2000.
- 48 CASSELLA, A.R.; GARRIGUES, S.; DE CAMPOS, R.C.; DE LA GUARDIA, M. Fourier transform infrared spectrometric determination of ziram. **Talanta**, v. 54, p. 1087–1094, 2001.
- 49 AGARWAL, S.; AGGARWAL, S.G.; SINGH, P. Quantification of ziram and zineb residues in fog-water samples. **Talanta**, v. 65, p. 104–110, 2005.
- 50 MANAHAN, S.E. **Fundamentals of environmental and toxicological chemistry: sustainable science**. 4<sup>th</sup> ed., Boca Raton: CRC Press, 2013.

- 
- 51 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação específica de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm>>. Acessado em 31 ago. 2013.
- 52 DRAGUNSKI, J. C. **Desenvolvimento e aplicações de eletrodos modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas em matrizes de alimentos**. 2007. 129 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 53 LIU, S.; ZHENG, Z.; LI, X. Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 63–90, 2013.
- 54 YADAV, S.K.; CHANDRA, P.; GOYAL, R.N.; SHIM, Y.-B. A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 14–24, 2013.
- 55 MIX, M.; RÜGER, J.; KRÜGER, S.; BROER, I.; FLECHSIG, G.-U. Electrochemical detection of 0.6% genetically modified maize MON810 in real flour samples. **Electrochemistry Communications**, v. 22, p. 137–140, 2012.
- 56 GUPTA, V.K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 179–196, 2011.
- 57 ARRIBAS, A.S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; MORENO, M.; BERMEJO, E.; ZAPARDIEL, A.; CHICHARRO, M. Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1183–1192, 2013.
- 58 OLIVEIRA, T.M.B.F.; RIBEIRO, F.W.P.; DO NASCIMENTO, J.M.; SOARES, J.E.S.; FREIRE, V.N.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; ADRIANA N. 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.

- 
- 59 MELZ, Z.; CHU, H.; CHEN, W.; XUE, F.; LIU, J.; XU, H.; ZHANG, R.; ZHENG, L. Ultrasensitive one-step rapid visual detection of bisphenol A in water samples by label-free aptasensor. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 39, p. 26–30, 2013.
- 60 MIRČESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIČ, Š.; LOVRIČ, M. **Square-wave voltammetry: theory and application**. In: SCHOLZ, F. (Ed). Monographs in Electrochemistry. Berlin: Springer, 2007.
- 61 QURESHI, A.; KANG, W.P.; DAVIDSON, J.L.; GURBUZ, Y. Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. **Diamond and Related Materials**, v. 18, p. 1401–1420, 2009.
- 62 MARINHO, B.; GHISLANDI, M.; TKALYA, E.; KONING, C.E.; DE WITH, G. Electrical conductivity of compacts of graphene, multi-wall carbon nanotubes, carbon black, and graphite powder. **Powder Technology**, v. 221, p. 351–358, 2012.
- 63 KUILA, T.; BOSE, S.; KHANRA, P.; MISHRA, A.K.; KIM, N.H.; LEE, J.H. Recent advances in graphene-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 4637–4648, 2011.
- 64 LI, C.; THOSTENSON, E.T.; CHOU, T.-W. Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: A review. **Composites Science and Technology**, v. 68, p. 1227–1249, 2008.
- 65 MARTINIANO, L.C.; ABRANTES, V.R.; NETO, S.Y.; MARQUES, E.P.; FONSECA, T.C.O.; PAIM, L.L.; SOUZA, A.G.; STRADIOTTO, N.R.; AUCÉLIO, R.Q.; CAVALCANTE, G.H.R.; MARQUES, A.L.B. Direct simultaneous determination of Pb(II) and Cu(II) in biodiesel by anodic stripping voltammetry at a mercury-film electrode using microemulsions. **Fuel**, v. 103, p. 1164–1167, 2013.
- 66 RODRIGUES, J.A.; RODRIGUES, C.M.; ALMEIDA, P.J.; VALENTE, I.M.; GONÇALVES, L.M.; COMPTON, R.G.; BARROS, A.A. Increased sensitivity of anodic stripping voltammetry at the hanging mercury drop electrode by ultracathodic deposition. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, p. 152–156, 2011.

- 
- 67 SOUČKOVÁ, J.; SKOPALOVÁ, J.; MÜLLER, L.; VYMĚTALÍKOVÁ, M.; BARTÁK, P. A novel fused-silica capillary dropping mercury electrode with long drop-time and its application on determination of critical micelle concentration. **Talanta**, v. 84, p.187–191, 2011.
- 68 TAVARES, E.M.; CARVALHO, A.M.; GONÇALVES, L.M.; VALENTE, I.M.; MOREIRA, M.M.; GUIDO, L.F.; RODRIGUES, J.A.; DONEUX, T.; BARROS, A.A. Chemical sensing of chalcones by voltammetry: *trans*-Chalcone, cardamomin and xanthohumol. **Electrochimica Acta**, v. 90, p. 440–444, 2013.
- 69 LUCARELLI, F.;MARRAZZA, G.; TURNER, A.P.F.; MASCINI, M. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.19, p. 515–530, 2004.
- 70 MARTÍNEZ-PAREDES, G.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.B.; COSTA-GARCÍA, A. Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, p. 329–335, 2010.
- 71 KIM, G.-Y.; KANG, M.-S.; SHIM, J.; MOON, S.-H. Substrate-bound tyrosinase electrode using gold nanoparticles anchored to pyrroloquinoline quinone for a pesticide biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 1–4, 2008.
- 72 TAN, F.; METTERS, J.P.; BANKS, C.E. Electroanalytical applications of screen printed microelectrode arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 454–462, 2013.
- 73 JUNQUEIRA, J.R.C.; DE ARAUJO, W.R.; SALLES, M.O.; PAIXÃO, T.R.L.C. Flow injection analysis of picric acid explosive using a copper electrode as electrochemical detector. **Talanta**, v. 104, p.162–168, 2013.
- 74 CUIBUSF.M.; ISPAS, A.; BUND, A.; ILEA, P. Square wave voltammetric detection of electroactive products resulting from electrochemical nitrate reduction in alkaline media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 675, p. 32–40, 2012.
- 75 PINTADO, S.; AMARO, R.R.; MAYÉN, M.; MELLADO, J.M.R. Electrochemical determination of the glyphosate metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in



- 
- drinking waters with an electrodeposited copper electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 305–312, 2012.
- 76 NAGY, L.; NAGY, G.; HAJÓS, P. Copper electrode based amperometric detector cell for sugar and organic acid measurements. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 76, p. 494–499, 2001.
- 77 KÖHLER, C.; KLOKE, A.; DRZYZGA, A.; ZENGERLE, R.; KERZENMACHER, S. Fabrication of highly porous platinum electrodes for micro-scale applications by pulsed electrodeposition and dealloying. **Journal of Power Sources**, v. 242, p. 255–263, 2013.
- 78 WUDARSKA, E.; CHRZESCIJANSKA, E.; KUSMIEREK, E.; RYNKOWSKI, J. Voltammetric studies of acetylsalicylic acid electrooxidation at platinum electrode. **Electrochimica Acta**, v. 93, p. 189–194, 2013.
- 79 FALCIOLA, L.; PIFFERI, V.; POSSENTI, M.L.; CARRARA, V. Square wave voltammetric detection of furan on platinum and platinum-based screen printed electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 664, p. 100–104, 2012.
- 80 DE OLIVEIRA, L.S.; BALBINO, M.A.; DE MENEZES, M.M.T.; DOCKAL, E.R.; DE OLIVEIRA, M.F. Voltammetric analysis of cocaine using platinum and glassy carbon electrodes chemically modified with Uranyl Schiff base films. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 374–378, 2013.
- 81 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.
- 82 VILELA, D.; GONZÁLEZ, M.C.; ESCARPA, A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p.24–43, 2012.
- 83 LUO, X.; MORRIN, A.; KILLARD, A.J.; SMYTH, M.R. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, p. 319–326, 2006.

- 
- 84 RASSAEI, L.; MARKEN, F.; SILLANPAA, M.; AMIRI, M.; CIRTIU, C.M.; SILLANPAA, M. Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1704–1715, 2011.
- 85 LI, N.; YUAN, R.; CHAI, Y.; CHEN, S.; AN, H.; LI, W. New antibody immobilization strategy based on gold nanoparticles and azure I/multi-walled carbon nanotube composite membranes for an amperometric enzyme immunosensor. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.111, p. 8443–8450, 2007.
- 86 PRAKASH, S.; CHAKRABARTY, T.; SINGH, A.K.; SHAHI, V.K. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 43–53, 2013.
- 87 LIU, T.; SU, H.; QU, X.; JU, P.; CUI, L.; AI, S. Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. **Sensors and Actuators B**, v. 160, p. 1255–1261, 2011.
- 88 DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907–931, 2002.
- 89 PUNDIR, C.S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, p. 19–31, 2012.
- 90 SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489–511, 2012.
- 91 FACCIO, G.; KRUIUS, K.; SALOHEIMO, M.; THÖNY-MEYER, L. Bacterial tyrosinases and their applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1749–1760, 2012.
- 92 KUDANGA, T.; NYANHONGO, G.S.; GUEBITZ, G.M.; BURTON, S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 195–208, 2011.

- 
- 93 BATISTELA, D.M. **Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- 94 ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.
- 95 SHAO, Y.; WANG, J.; WU, H.; LIU, J.; AKSAY, I.A.; LIN, Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 22, p. 1027–1036, 2010.
- 96 RAO, T.N.; LOO, B.H.; SARADA, B.V.; TERASHIMA, C.; FUJISHIMA, A. Electrochemical detection of carbamate pesticides at conductive diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1578-1583, 2002.
- 97 WEI, H.; SUN, J.-J.; WANG, Y.-M.; LI, X.; CHEN G.-N. Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbofuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode. **Analyst**, v. 133, p. 1619–1624, 2008.
- 98 QIU, P.; NI, Y.N. Determination of ziram in vegetable samples by square wave voltammetry. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, p. 1337–1340, 2008.
- 99 RAJASEKHAR REDDY, S.; CHANDRAMOHAN, K.; BABU, T.R.; SUBRAHMANYAM, K. Electrochemical behaviour of the acharicide methiocarb and its residues in soil and water samples. **International Journal of Environmental Science**, v. 2, p. 1119–1126, 2011.
- 100 PUSHPALATHA, M.; KUMAR, P.C.R.; BALAJI, K.; SRIDEVI, C.; REDDY, C.S. Electrochemical reduction behavior and analysis of aldicarb sulfone. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 3, p. 1651–1659, 2013.
- 101 HITCHMAN, M.L.; RAMANATHAN, S. The determination of a carbamate insecticide in soil samples by differential pulse polarography. **Analytica Chimica Acta**, v. 157, p. 344–354, 1984.

- 
- 102 SWARUPA, CH.; PRASAD, M.S.; DHANANJAYULU, M.; SREEDHAR, N.Y. Electrochemical determination and reduction behaviour of mancozeb at glassy carbon electrode modified with polyaniline based nanosensors. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 4, p. 1234-1245, 2013.
- 103 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.
- 104 CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S. Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 40–46, 2008.
- 105 ZAMFIR, L.-G.; ROTARIU, L.; BALA, C. Acetylcholinesterase biosensor for carbamate drugs based on tetrathiafulvalene–tetracyanoquinodimethane/ionic liquid conductive gels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 61–67, 2013.
- 106 MARTORELL, D.; CÉSPEDES, F.; MARTÍNEZ-FÀBREGAS, E.; ALEGRET, S. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7,7,8,%tetracyanoquinodimethane-modified, graphite-epoxy biocomposite. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, p. 305-313, 1997.
- 107 CIUCU, A.A.; NEGULESCU, C.; BALDWIN, R.P. Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 303–310, 2003.
- 108 XUE, R.; KANG, T.-F.; LU, L.-P.; CHENG, S.-Y. Immobilization of acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides. **Applied Surface Science**, v. 258, p. 6040– 6045, 2012.
- 109 CESARINO, I.; MORAES, F.C.; LANZA, M.R.V.; MACHADO, S.A.S. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. **Food Chemistry**, v. 135, p. 873–879, 2012.

- 
- 110 SUN, X.; GONG, Z.; CAO, Y.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on poly(diallyldimethylammonium chloride)-multi-walled carbon nanotubes-graphene hybrid film. **Nano-Micro Letters**, v. 5, p. 47-56, 2013.
- 111 HILDEBRANDT, A.; BRAGÓS, R.; LACORTE, S.; MARTY, J.L. Performance of a portable biosensor for the analysis of organophosphorus and carbamate insecticides in water and food. **Sensors and Actuators B**, v. 133, p. 195–201, 2008.
- 112 VALDÉS-RAMÍREZ, G.; CORTINA, M.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; MARTY, J.-L. Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 699-707, 2008.
- 113 BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A.; MARTY, J.-L. Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 115–121, 2006.
- 114 SRISOMBAT, L.; JAMISON, A.C.; LEE, T.R. Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, p. 1-19, 2011.
- 115 PEDROSA, V.A.; CAETANO, J.; MACHADO, S.A. S.; BERTOTTI, M. Determination of parathion and carbaryl pesticides in water and food samples using a self assembled monolayer/acetylcholinesterase electrochemical biosensor. **Sensors**, v. 8, p. 4600-4610, 2008.
- 116 CANCINO, J.; RAZZINO, C.A.; ZUCOLOTTI, V.; MACHADO, S.A.S. The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 717–723, 2013.
- 117 KIM, N.; PARK, I.-S.; KIM, D.-K. High-sensitivity detection for model organophosphorus and carbamate pesticide with quartz crystal microbalance-precipitation sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1593–1599, 2007.
- 118 OLIVEIRA, T.M.B.F.; BARROSO, M.F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; 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.
- 119 CAMPANELLA, L.; LELO, D.; MARTINI, E.; TOMASSETTI, M. Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase + choline oxidase opee and application to natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 587, p. 22–32, 2007.
- 120 DE ALBUQUERQUE, Y.D.T.; FERREIRA, L.F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 210–221, 2007.
- 121 FERNANDES, S.C.; 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.
- 122 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**, v. 155, p. 331–339, 2011.
- 123 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.
- 124 KRISHNAMOORTHY, K.; KIM, G.-S.; KIM, S.J. Graphene nanosheets: Ultrasound assisted synthesis and characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 644–649, 2013.
- 125 AMARNATH, C.A., HONG, C.E., KIM, N.H., KU, B.-C., KUILA, T., LEE, J.H. Efficient synthesis of graphene sheets using pyrrole as a reducing agent. **Carbon**, v. 49, p. 3497–3502, 2011.
- 126 KIMLING, J.; MAIER, M.; OKENVE, B.; KOTAIDIS, V.; BALLOT, H.; PLECH, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 15700–15707, 2006.

- 
- 127 GARRIDO, E.M.; DELERUE-MATOS, C.; LIMA, J.L.F.C.; BRETT, A.M.O. Electrochemical methods in pesticides control. **Analytical Letters**, v. 37, p. 1755-1791, 2004.
- 128 MOSTAFA, G.A.E. Electrochemical biosensors for the detection of pesticides. **The Open Electrochemistry Journal**, v. 2, p. 22–42, 2010.
- 129 BARROSO, M.F.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Electrochemical DNA-sensor for evaluation of total antioxidant capacity of flavours and flavoured waters using superoxide radical damage. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 3748–3754, 2011.
- 130 XUE, M.-H.; XU, Q.; ZHOU, M.; ZHU, J.-J. In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan–gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1468–1474, 2006.
- 131 PENICHE, H.; OSORIO, A.; ACOSTA, N.; DE LA CAMPA, A.; PENICHE, C. Preparation and characterization of superparamagnetic chitosan microspheres: application as a support for the immobilization of tyrosinase. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 98, p. 651–657, 2005.
- 132 MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. United Kingdom: Pearson Prentice Hall, 2005.
- 133 ZHANGA, J.-M.; WUB, Y.-L.; LUA, Y.-B. Simultaneous determination of carbamate insecticides and mycotoxins in cereals by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 915-916, p. 13–20, 2013.
- 134 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.
- 135 RIVAS, G.A.; RUBIANES, M.D.; RODRÍGUEZ, M.C.; FERREYRA, N.F.; LUQUE, G.L.; PEDANO, M.L.; MISCORIA, S.A.; PARRADO, C. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta**, v. 74, p. 291–307, 2007.

- 
- 136 BANKS, C.E.; COMPTON, R.G. New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite. **Analyst**, v. 131, p. 15–21, 2006.
- 137 BRITTO, P.J.; SANTHANAM, K.S.V.; ALONSO, V.; RUBIO, A.; AJAYAN, P.M. Improved charge transfer at carbon nanotube electrodes. **Advanced Materials**, v. 11, p. 154–157, 1999.
- 138 MERISALU, M.; KRUSMA, J.; BANKS, C.E. Metallic impurity free carbon nanotube paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 144–147, 2010.
- 139 BARTLETT, P.N. (Ed.). **Bioelectrochemistry – fundamentals, experimental techniques and applications**. New York: John Wiley & Sons, 2008.
- 140 ORAZEM, M.E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- 141 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil). Monografias de pesticidas autorizados. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em 20 set. 2013.
- 142 EU PESTICIDE RESIDUES DATABASE. EU pesticide residues database for all the EU-MRLs. Disponível em <<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/database>>. Acesso em 01 out. 2013.
- 143 DEAN, J.R. **Extraction techniques in analytical science**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.
- 144 PUMERA, M.; AMBROSI, A.; BONANNI, A.; CHNG, E.L.K.; POH, H.L. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TrAc Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 954–965, 2010.
- 145 JIANG, Y.; ZHANG, X.; SHAN, C.; HUA, S.; ZHANG, Q.; BAI, X.; DAN, L.; NIU, L. Functionalization of graphene with electrodeposited Prussian blue towards amperometric sensing application. **Talanta**, v. 85, p. 76–81, 2011.
- 146 BO, Y.; WANG, W.; QI, J.; HUANG, S.A DNA biosensor based on graphene paste electrode modified with Prussian blue and chitosan. **Analyst**, v. 136, p. 1946–1951, 2011.



- 
- 147 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.
- 148 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.
- 149 ODACI, D.; TELEFONCU, A.; TIMUR, S. Maltose biosensing based on co-immobilization of  $\alpha$ -glucosidase and pyranose oxidase. **Bioelectrochemistry**, v. 79, p. 108–113, 2010.
- 150 YANG, M.; YANG, Y.; YANG, Y.; SHEN, G.; YU, R. Bionzymatic amperometric biosensor for choline based on mediator thionine in situ electropolymerized within a carbon paste electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 334, p. 127–134, 2004.
- 151 YANG, Z.; WU, F. Catalytic properties of tyrosinase from potato and edible fungi. **Biotechnology**, v. 5, p. 344–348, 2006.
- 152 KOCHANA, J.; NOWAK, P.; JAROSZ-WILKOŁASKA, A.; BIEROŃ, M. Tyrosinase/laccase bionzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. **Microchemical Journal**, v. 89, p. 171–174, 2008.

---

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### **\*ARTIGOS:**

OLIVEIRA, T.M.B.F.; BARROSO, M.F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; 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**, 47 (2013) 292–299.

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**, 106 (2013) 137–143.

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**, 109 (2013) 84–92.

RIBEIRO, F.W.P.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; SILVA, L.F.; MENDONÇA, G.L.F.; HOMEM-DE-MELO, P.; BECKER, H.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. Sensitive voltammetric responses and mechanistic insights into the determination of residue levels of endosulfan in fresh foodstuffs and raw natural waters. **Microchemical Journal**, 109 (2013) 84–92.

SANDRINO, B.; CLEMENTE, C.S.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; RIBEIRO, F.W.P.; PAVINATTO, F.J.; MAZZETO, S.E.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; PESSOA, C.A.; WOHNATH, K. Amphiphilic porphyrin-cardanol derivatives in Langmuir and Langmuir Blodgett films applied for sensing. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, 425 (2013) 68–75.

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**, 23 (2012) 110–119.

---

MAIA, F.J.N. ; CLEMENTE, C.S.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; LOMONACO, D.; OLIVEIRA, T.I.S.; ALMEIDA, M.O.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; MAZZETO, S.E. Electrochemical and computational studies of phenolic antioxidants from cashew nutshell liquid. **Electrochimica Acta**, 79 (2012) 67–73.

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**, 413, (2011) 148–156.

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

OLIVEIRA, T.M.B.F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. ; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. The role of gold nanoparticles on the sensitivity of a bi-enzymatic biosensor for carbamate pesticides determination. In: **3<sup>rd</sup> Jornadas de Electroquímica e Inovação**, 2013, Porto – Portugal.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. ; OLIVEIRA, M. B. P. P. ; DELERUE-MATOS, C. Influence of Prussian Blue films on pesticides enzymatic biosensing by graphene doped carbon paste modified electrode. In: **18<sup>th</sup> Meeting of the Portuguese Electrochemical Society**, 2013, Porto – Brasil.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MORAIS, S.; BARROSO, M.F.; DE LIMA-NETO, PEDRO; CORREIA, A.N.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. Biossensor enzimático para carbamatos à base de eletrodos de pasta de grafeno modificados com Azul da Prússia. In: **XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XIX SIBEE**, 2013, Campos do Jordão (SP) – Brasil.

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

---

OLIVEIRA, T.M.B.F.; CORREIA, A.N. Electroanalytical method for simultaneous assay of diclofenac, dexamethasone and tartrazine in effluents of treatment plants. In: **63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - 63rd ISE**, 2012, Prague – Czech Republic.

LUCAS, F.W.S.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; DE SOUZA, D. Determinação de resíduos do pesticida dimetomofte em bebidas derivadas de uvas da espécie *Vitis vinifera* L. In: **XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica**, 2012, Fortaleza (CE) – Brasil.

LUCAS, F.W.S.; CAMELO, A.L.M.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; LONGHINOTTI, E.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; SOARES, J.E.S. Proposição mecanística para eletrooxidação direta do pesticida dimetomorfe. In: **XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica**, 2012, Fortaleza (CE) – Brasil.

OLIVEIRA, T.I.S.; MAIA, F.J.N.; CLEMENTE, C.S.; OLIVEIRA, T.M.B.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; MAZZETO, S. E. Electrochemical evaluation of the antioxidant capacity of phenolic compounds derivative of the cashew nut shell liquid. In: **XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica**, 2012, Fortaleza (CE) – Brasil.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MORAIS, S.; BARROSO, M.F.; CORREIA, A.N.; DE LIMA-NETO, P.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. Biosensor development for pirimicarb pesticide determination. In: **3<sup>rd</sup> Portuguese Young Chemists Meeting**, 2012, Porto – Portugal.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MORAIS, S.; BARROSO, M.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. Biossensor enzimático para a determinação eletroanalítica do pesticida pirimicarbe em amostras de hortaliças. In: **11<sup>o</sup> Encontro de Química de Alimentos**, 2012, Bragança – Portugal.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MORAIS, S.; BARROSO, M.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. Screening of carbamate pesticides using enzymatic biosensors. In: **Energy, Environment and Sustainability - 1st International Conference**, 2012, Porto – Portugal.

---

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MORAIS, S.; BARROSO, M.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. Screening of pirimicarb in tomato and lettuce samples applying a laccase-based biosensor. In: **7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment. 13th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides**, 2012, Porto – Portugal.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. Detecção e quantificação eletroquímica do fungicida dimetomorfe em amostras de alimentos. In: **XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2011, Bento Gonçalves (RS) – Brasil.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; RIBEIRO, F.W.P.; SOARES, JANETE 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. In: **XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2011, Bento Gonçalves (RS) – Brasil.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; MARINHO, M.M.; RIBEIRO, F.W.P.; SILVA, F.L.F.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. Determinação eletroanalítica de endosulfan em amostras in natura de cana-de-açúcar e tomate. In: **16º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2011, Campos do Jordão (SP) – Brasil.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; LONGHINOTTI, E.; DE SOUZA, D.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. Análise do fungicida dimetomorfe: estudo comparativo entre cromatografia gasosa e voltametria de onda quadrada. In: **16º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2011, Campos do Jordão (SP) – Brasil.

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: **1º Encontro Regional de Química**, 2011, Mossoró (RN) – Brasil.