



**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**GRUPO DE PESQUISAS EM QUÍMICA ANALÍTICA E EDUCAÇÃO**

**TESE DE DOUTORADO**

**“DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS  
ATRAVÉS DE MÉTODO ENZIMÁTICO”**

**Autor:** Marcos Paulo da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Matthieu Tubino

**CAMPINAS**

**Fevereiro 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

Si38d Silva, Marcos Paulo da.  
Determinação de pesticidas organofosforados através  
de método enzimático / Marcos Paulo da Silva. --  
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Pesticidas. 2. Organofosforados. 3. Enzima.  
4. Análise por FIA. I. Tubino, Matthieu. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Determination of organophosphorus pesticides through the enzymatic method

**Palavras-chaves em inglês:** Pesticides, Organophosphorus, Analysis by FIA

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Matthieu Tubino (orientador), Prof. Dr. Leonardo Pezza (IQ-UNESP), Profa. Dra. Eny Maria Vieira (IQSC-USP), Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 01/02/2011



Sou um técnico, mas tenho técnica só dentro da técnica.  
Fora disso sou doido, com todo o direito a sê-lo.  
Com todo o direito a sê-lo, ouviram?

Álvaro de Campos (Lisbon Revisited, 1923)



Dedico esta Tese à minha família:

Meus Pais, Lázaro e Divina por tudo que me proporcionaram, mas principalmente pelo amor e exemplo.

Aos meus irmãos, Lázaro, Daniel e Andrea por todo apoio

Aos meus sobrinhos, Gabi, Leo e Felipe pelo carinho

Ao meu Tio Raimundo (in memorian), Tia Maria e meus primos Pedro e Raimundo pelo apoio



## Agradecimentos

Ao Professor Dr. Matthieu Tubino pela paciência, apoio, orientação e pelo exemplo de pessoa.

A Professora Dra. Eny Maria Vieira pela primeira oportunidade de iniciação científica e por sua dedicação a docência com tanto afinho.

A Professora Dra. Tereza Cristina Rodrigues ao Professor Dr. Olaf Elsholz e a Professora Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila pelo apoio.

Aos colegas do grupo de pesquisa em química analítica e educação pelo ótimo convívio e amizade, Marta, Eva, Sol, Flávio, Lília, Sabir, Surayya, Gustavo, Geraldo, Carlos, Marcelo, Reinaldo, Juliana Terra e em especial Ácacia Adriana Salomão pela imensa ajuda.

Aos professores do instituto de Química especialmente aos Professores Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder, Dra. Adriana Vitorino Rossi, Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno e Dra. Solange Cadore pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e na defesa da Tese

Aos funcionários e funcionárias do Instituto de Química da Unicamp em especial Mário pela construção da cela de permeação e injetores, Nelson do Laboratório de ensino. Ao pessoal da CPG, Miguel, Bel e Gabriela.

Ao Professor Dr. Leonardo Pezza por suas contribuições na defesa.

Aos grandes amigos que tive na Unicamp, Cristien Marcos, Eduardo Spinola, Fabiano Ionta, Andriei Gutierrez e Mauro Bueno.

Aos professores que ao longo de toda minha vida escolar e acadêmica contribuíram para minha formação.

Ao Professor Helder Ribeiro do IFBA - Campus Barreiras, pelo apoio quando necessitei me ausentar. Aos Professores Messias e Pedro Coimbra pela amizade.

A todos amigos que torceram e enviaram vibrações positivas especialmente de Itamaraju, Luciana, Marcondes, Rodrigo, Carina e Marcos Emilio.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.



# CURRICULUM VITAE

## 1- Formação acadêmica:

**Mestrado em ciências** (Química Analítica)

Universidade de São Paulo (IQSC-USP)

Ano de conclusão: 2002

**Bacharelado em Química**

Universidade de São Paulo (IQSC-USP)

Ano de conclusão: 1999

## 2- Produção Científica:

### 2.1 Resumo de trabalhos científicos

- 1) A conductometric MSFIA system for the determination of organophosphorus pesticides. In: 14 th International Conference on Flow Injection analysis - ICFIA: including related techniques, 2007, Abstractband 14 th ICFIA . Berlim – Alemanha. RODRIGUES, T. C. ; ELSHOLZ, O. ; TUBINO, M. ; SILVA, M. P. Berlim - Alemanha, 2007. v. 1. p. 52-52.
- 2) FI- biosensor System for the determination of Parathion-methyl. SILVA, M. P; TUBINO, M; ELSHOLZ, O; RODRIGUES, T.C.; 10<sup>th</sup> International Conference on Flow Analysis. Porto- Portugal. 3 a 8 Setembro, 2006
- 3) Desenvolvimento de um procedimento em fluxo associado a um biossensor enzimático para a determinação clorpirifos em água. SILVA, M. P; RODRIGUES, Jr. A ; VILA, M. M. D. C; TUBINO, M. 29<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Águas de Lindóia – SP- Pôster QA-183, Maio de 2006.
- 4) A Química do chocolate. TUBINO, M; SILVA, M. P; VASCONCELOS, S.P; SOLFERINI, V.N. 29<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Águas de Lindóia – SP- Pôster ED-048, Maio de 2006.
- 5) Determinação de pesticidas organofosforados usando sistema de fluxo associado a biossensor. SILVA, M. P; TUBINO, M; VILA, M. M. D. C; RODRIGUES, Jr. A; ELSHOLZ, O; RODRIGUES, T.C. 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). Universidade Federal Fluminense (UFF) Niterói – RJ. Painel A-178. Setembro 2005.
- 6) Construção de um colorímetro com detecção foto-térmica. SILVA. M. P; TUBINO, M. 28<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Poços de Caldas Pôster QA-192 — junho 2005
- 7) Determinação visual ‘in situ’ de metilparation com biossensor baseado na enzima acetilcolinesterase. 12<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) - Universidade Federal do Maranhão (UFMA) São Luís. Pôster OT-050 — outubro 2003
- 8) Utilização da radiólise gama do Co-60 como indutora da degradação do pesticida alaclor em meio aquoso. 25<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Poços de Caldas. Pôster AB-001 — Maio 2002

### 2.2. Artigo Publicado

M. P. SILVA.; VIEIRA, E. M.; **Degradation of alachlor herbicide by gamma radiation from cobalt-60 in aqueous and alcohol solution.** Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. v. 281, n. 3, p. 323-327, 2009.

## 3- Outros

### 3.1 – Monitorias

- 1) Auxiliar de ensino na disciplina Química II (química analítica) no Programa de Estágio Docente (PED) – Departamento de Química Analítica - UNICAMP – Campinas – agosto a dezembro 2005
- 2) Auxiliar de ensino na disciplina Química Geral Experimental no Programa de Estágio Docente (PED) – Departamento de Química Analítica - UNICAMP – Campinas – agosto a dezembro 2004
- 3) Monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina de Laboratório de Química Inorgânica –Universidade de São Paulo - USP - São Carlos – agosto a dezembro 2001

### **3.2 – Cursos**

- 1) Oficina de **Qualidade da água e controle da poluição**. Carga horária 32 hs. Instrutor Prof. Dr Roque Angélico Araújo e Coordenadora Prof Dr<sup>a</sup> Viviana Maria Zanta. Rede de capacitação e extensão tecnológica em saneamento ambiental. UFBA / NURENE. Salvador – Abril de 2008.
- 2) Oficina de **Processos e Tratamento e Reuso de Esgotos**. Carga horária 40 hs. Instrutor Prof. Dr Sérgio Rolim Mendonça e Coordenadora Prof Dr<sup>a</sup> Viviana Maria Zanta. Rede de capacitação e extensão tecnológica em saneamento ambiental. UFBA / NURENE. Salvador – Setembro de 2008.
- 3) **Tratamento de esgotos sanitários por lagoa de estabilização**. Carga Horária 40 hs. Instrutora Prof MSc Ursula Thais de Paula Medeiros - SENAI- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Departamento Regional da Bahia. Salvador – Outubro de 2008

### **4 – Experiência profissional**

- 1) Professor Ensino Médio e Supletivo, Colégio do Centro Acadêmico Armando de Salles Oliveira (CAASO) - São Carlos - fevereiro 1995 a dezembro 1998.
- 2) Professor Ensino Médio. Rede Estadual de Ensino do Estado de São Paulo - São Paulo- SP - fevereiro de 1999 a janeiro 2000
- 3) Professor Ensino Médio - Rede Estadual de Ensino do Estado de São Paulo - Descalvado - SP – março a agosto 2002
- 4) Professor (Programa de formação continuada de professores do ensino fundamental e médio Teia do Saber, da Secretária de Estado da Educação de São Paulo em conjunto com a Universidade Estadual de Campinas), UNICAMP- Campinas – Abril a dezembro 2005
- 5) Professor Ensino médio e técnico no Centro Federal de Educação Tecnológica da Bahia – CEFET-BA – Salvador –BA – Agosto -2006 a Maio 2007.
- 6) Químico da Empresa Baiana de Águas e Saneamento S.A. EMBASA- Área de análise e tratamento de água e esgoto – BA - Maio 2007 a Janeiro de 2009
- 7) Professor do ensino médio do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA- Campus Barreiras - Ensino Médio – Barreiras – BA. Jan 2009 - atual

### **5- Demais atividades acadêmicas**

- 1) III Jornada científica e tecnológica do oeste baiano – Barreiras – BA- Outubro de 2010
- 2) IV encontro de Química da Bahia – Barreiras – BA – Setembro 2010
- 3) Conferência Regional Nordeste de Ciência, Tecnologia e Inovação – Maceió – AL – Abril 2010

## RESUMO

### “DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS ATRAVÉS DE MÉTODO ENZIMÁTICO”

**Autor:** Marcos Paulo da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Matthieu Tubino

**Palavras-chave:** Pesticidas organofosforados, enzima, análise por injeção em fluxo.

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas. A agência nacional de vigilância sanitária constatou em 2008 que aproximadamente 15 % da amostras analisadas possuíam limite máximo de resíduos (LMR) acima do permitido por lei.

Quando os pesticidas são utilizados de maneira adequada trazem ganhos à produção. Porém, quando mal usados podem trazer sérias conseqüências ao meio ambiente e à população, o que tem levado a sociedade civil a cobrar dos órgãos ambientais um controle mais rigoroso e aumentado a demanda por dados analíticos.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de varredura para a determinação de pesticidas organofosforados através de procedimento FIA associado a um biossensor enzimático baseado na enzima acetilcolinesterase. O método é seletivo para inibidores desta enzima, sendo de execução muito simples, é de custo baixo e apresenta baixos limites de detecção. Para a introdução no sistema FIA a solução contendo o pesticida deve ser aquosa, não sendo, no entanto, necessário realizar a pré-concentração do analito.

Para o pesticida metil paration o limite de detecção está faixa de  $10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ , o coeficiente de correlação é de 0,9917 e o desvio padrão relativo médio é de 4,8 % (n=6). Para o pesticida clorpirifos o limite de detecção é, cerca de,  $10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ , o coeficiente de correlação é de 0,9979, o desvio padrão relativo médio é 2,3%. Para o pesticida malation o limite de detecção apresenta-se na faixa de  $10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ , o coeficiente de correlação é de 0,9902, o desvio padrão relativo médio de 5,8 (n=3). Para o pesticida diclorvos o limite de detecção é cerca de  $10^{-10}$  mol  $L^{-1}$ , o coeficiente de correlação é de 0,9921 e o desvio padrão relativo médio é 3,8% (n=6).



## ABSTRACT

### “DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES THROUGH THE ENZYMATIC METHOD”

**Author:** Marcos Paulo da Silva

**Supervisor:** Prof. Dr. Matthieu Tubino

**Keywords:** Organophosphorus pesticides, enzyme, flow injection analysis.

Brazil is one of the world's largest consumers of pesticides. The national agency for health monitoring found, in 2008, that approximately 15% of samples had maximum residue limit (MRL) above the permitted by Law.

When used properly pesticides help increase production. But when misused they can be extremely detrimental to the environment and to the population, which has led civil society to demand tighter control from environmental agencies and increased the demand for analytical data.

In this work, we developed a scanning method for the determination of organophosphorus pesticides using a FIA procedure associated with an enzymatic biosensor based on acetylcholinesterase. The method is selective for inhibitors of this enzyme and is extremely simple, of low cost and very good. detection limits. For introduction into the FIA system, the solution containing the pesticide should be in aqueous solution but it is not necessary to perform any prior concentration of the analyte.

For the pesticide methyl parathion the detection limit is the range of  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. The correlation coefficient is 0.9917 and the average relative standard deviation is 4.8% (n = 6). For the pesticide chlorpyrifos the detection limit is about  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, the correlation coefficient is 0.9979 and the average relative standard deviation is 2.3%. For the pesticide malathion the detection limit is in the range of  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, the correlation coefficient is 0.9902 and the average relative standard deviation is 5.8 (n = 3). For the pesticide dichlorvos the detection limit was about  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, the correlation coefficient was 0.9921 and the average standard deviation of 3.8 (n = 6).



# ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Figuras.....	xxi
1 Introdução.....	1
1.1 Pesticidas.....	3
1.1.1 Histórico, toxicidade e classificação dos pesticidas.....	4
Larvicidas.....	9
1.1.2 Pesticidas no ambiente.....	9
1.1.3 Pesticidas organofosforados.....	15
1.1.4 Pesticidas organofosforados estudados neste trabalho.....	20
1.2 Análise por injeção em fluxo (FIA).....	23
1.3 Cromatografia gasosa e Espectrometria de massas (CG/MS).....	26
1.4 Enzimas.....	29
1.5 Biossensores.....	31
1.5.1 Imunossensores.....	32
1.5.2 Biossensores enzimáticos.....	41
1.5.3 Imobilização enzimática.....	48
2 Objetivos.....	55
3 Parte experimental.....	57
3.1 Equipamentos e reagentes.....	57
3.1.1 Equipamentos.....	57
3.1.2 Reagentes.....	57
3.2 Preparação da solução tampão fosfato de Sörensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	58
3.3 Preparação da solução de cloreto de acetilcolina.....	59
3.4 Preparação da solução de TMB-4.....	59
3.5 Preparação da solução de púrpura de bromocresol (PBC).....	59
3.6 Preparação das soluções dos pesticidas estudados.....	60
3.7 Imobilização da enzima.....	61
3.7.1 Imobilização nas esferas de vidro em meio aquoso.....	62
3.7.2 Imobilização nas esferas de vidro em meio orgânico.....	63
3.7.3 Imobilização da enzima nas esferas de vidro.....	63
3.8 Construção da coluna enzimática.....	64
3.9 Método.....	64
3.10 Sistema de análise por injeção em fluxo.....	65
3.11 Células de permeação gasosa.....	66
3.12 Método de preparação da membrana de sílica.....	68
4 Resultados e discussões.....	69
4.1 Introdução.....	69
4.2 Imobilização enzimática.....	72
4.3 Células de permeação e membrana.....	74
4.4 Efeito da variação das condições do sistema FIA.....	75
4.4.1 Efeito da variação de temperatura.....	75
4.4.2 Efeito da concentração do substrato.....	76
4.4.3 Efeito da variação do volume de injeção.....	77
4.4.4 Efeito da variação da vazão.....	78

4.4.5	Efeito da variação da concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	79
4.4.6	Efeito da concentração de TMB-4.....	80
4.4.7	Efeito do pH .....	81
4.5	Determinação do pesticida metil paration .....	82
4.6	Determinação do pesticida clorpirifos .....	88
4.7	Determinação do pesticida malation.....	93
4.8	Determinação do pesticida diclorvos .....	98
4.9	Comparativo todos pesticidas .....	102
5	Conclusões.....	105
6	Referências .....	107

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1- OMS classificação recomendada de pesticidas pelo perigo.....	8
Tabela 2- Classificação dos pesticidas quanto à classe e grupo químico.....	9
Tabela 3- Sistema de detecção e exemplos de marcadores.....	34
Tabela 4- Algumas vantagens e desvantagens na aplicação de imunossensores em química analítica.....	41
Tabela 5- Métodos de imobilização.....	51
Tabela 6- Condições de trabalho para o sistema FIA.....	82
Tabela 7- Relação entre a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) de metil paration oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.....	83
Tabela 8- Relação entre a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) de clorpirifos oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.....	89
Tabela 9-Relação entre a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) de malation oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.....	94
Tabela 10- Relação entre a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) do diclorvos oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.....	99



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Pesticidas orgânicos de origem vegetal.....	5
Figura 2- Primeiros pesticidas sintéticos.....	6
Figura 3- Diagrama esquemático da contaminação ambiental por pesticidas.....	10
Figura 4- Diagrama esquemático da contaminação da água por pesticidas.....	12
Figura 5- Pesticida Tetraetilpirofosfato.....	15
Figura 6- Estrutura básica de inseticidas organofosforados.....	16
Figura 7- Primeiros pesticidas organofosforados.....	17
Figura 8- Pesticidas organofosforados.....	18
Figura 9- Reação de hidrólise da acetilcolina.....	19
Figura 10- Fórmula estrutural da molécula do pesticida Metil-Paration.....	20
Figura 11- Fórmula estrutural da molécula do pesticida Clorpirifos.....	21
Figura 12- Fórmula estrutural da molécula do pesticida Malation.....	22
Figura 13- Fórmula estrutural da molécula do pesticida Diclorvos.....	22
Figura 14- Componentes básicos de um cromatógrafo gasoso.....	26
Figura 15- Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa.....	28
Figura 16- Esquema simplificado de uma resposta imunológica.....	33
Figura 17- Esquema de imunoensaio tipo sanduíche.....	36
Figura 18- Kit para ensaio ELISA.....	37
Figura 19- Aplicações de biossensores enzimáticos.....	42
Figura 20- Região de ação dos pesticidas organofosforados.....	44
Figura 21- Esquema da inativação irreversível da enzima por organofosforado.....	45
Figura 22- Síntese do carbaril.....	45
Figura 23- Diagrama esquemático da determinação de pesticida.....	46
Figura 24- Reação catalítica da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.....	47
Figura 25- Reativação enzimática.....	48
Figura 26- Representação esquemática de formas de imobilização de enzimas.....	52
Figura 27- Frasco transparente para solução PBC com filtro.....	59
Figura 28- Etapas envolvidas na imobilização enzimática.....	60
Figura 29- Figura do reator enzimático empregado com a enzima imobilizada em esferas de vidro.....	63

Figura 30- Diagrama esquemático do sistema FIA.....	65
Figura 31- Célula de permeação gasosa redonda.....	66
Figura 32- Célula de permeação retangular.....	67
Figura 33- Diagrama representando a determinação de um pesticida inibidor da enzima acetilcolinesterase.....	69
Figura 34- Grupos silanóis.....	73
Figura 35- Ativação das pérolas de vidro com reagente bifuncional.....	73
Figura 36- Bases de Schiff.....	73
Figura 37- Gráfico do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	75
Figura 38- Gráfico representando o efeito da concentração do substrato sobre o sinal analítico.....	76
Figura 39- Gráfico do efeito do volume injetado sobre o sinal analítico.....	77
Figura 40- Gráfico do efeito da vazão sobre o sinal analítico.....	79
Figura 41- Efeito da variação da concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	80
Figura 42- Efeito da variação do pH do tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	81
Figura 43- Produtos de degradação do metil paration.....	84
Figura 44- Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase antes e após oxidação com água de bromo.....	85
Figura 45- Cromatograma do pesticida metil paration após oxidação.....	87
Figura 46- Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS.....	88
Figura 47- Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase antes e após oxidação com água de bromo.....	90
Figura 48- Figura esquemática dos caminhos dos produtos de degradação do pesticida clorpirifos na presença de cloro e bromo.....	91
Figura 49- Cromatograma do pesticida clorpirifos após oxidação.....	92
Figura 50- Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS.....	93
Figura 51- Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase antes da oxidação e após oxidação com água de bromo.....	95
Figura 52- Caminhos dos produtos de degradação do malation.....	96
Figura 53- Cromatograma do pesticida malation após oxidação.....	97
Figura 54- Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS.....	98

Figura 55- Relação entre porcentagens de inibição da acetilcolinesterase antes da oxidação e após oxidação com água de bromo.....	100
Figura 56- Cromatograma do pesticida diclorvos.....	101
Figura 57- Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS.....	102
Figura 58- Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase para os pesticidas estudados antes da adição da água de bromo.....	103
Figura 59- Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase para os pesticidas estudados após da adição da água de bromo.....	104



# 1 Introdução

O Brasil, em 2008 alcançou a marca de 733,9 milhões de toneladas de pesticidas vendidos, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (Sindag), superando os Estados Unidos, o maior produtor mundial de alimentos, que consumiu 646 milhões de toneladas. No caso brasileiro, o maior consumo está relacionado em parte com o aumento da área cultivada; na safra 2009, o país deverá colher 135 milhões de toneladas de grãos, cerca de 6% da produção mundial, estimada em 2,2 bilhões de toneladas. O Brasil é atualmente o segundo maior produtor de soja e o terceiro de milho.

No Brasil, o programa de análise de resíduos de pesticidas da Anvisa analisou mais de 1,7 mil amostras em 2008 e constatou que 15,28% das amostras possuíam resíduos em concentrações acima do permitido por lei, além da descoberta de princípios ativos não permitidos em todas as culturas analisadas. Em 64% das amostras de pimentão foi constatada a presença de pesticidas, morango, uva e cenoura também apresentaram índices elevados de resíduo de pesticidas. A segunda causa de intoxicações, depois de medicamentos, é por pesticidas, e a situação pode ser ainda mais grave, pois os casos de intoxicação e morte por pesticidas são subnotificados.

Segundo o Sinitox, sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas da fundação Oswaldo Cruz, em 2007, foram notificados mais de 5,3 mil intoxicações; contudo, sabe-se que muitos outros casos não são notificados. Segundo o banco de dados do Sinitox foram mais de 1,5 mil trabalhadores rurais contaminados e 1,2 mil casos de intoxicações acidentais, sendo nove casos de intoxicação por ingestão de alimentos com resíduos de pesticidas acima do permitido. Com isso, faz-se cada vez mais necessário um rigoroso programa para o monitoramento de resíduos em alimentos e outras matrizes ambientais.

As Nações Unidas fizeram uma lista com produtos químicos que deverão ser proibidos ou terão o seu uso severamente restrito; muitos dos produtos químicos desta lista são pesticidas. Ao mesmo tempo que o uso de pesticidas

altamente persistentes, como o DDT, tem provado ser muito eficiente na erradicação de graves doenças como a malária, efeitos adversos têm sido devastadores para o meio ambiente, como por exemplo, populações inteiras de pássaros têm sido eliminadas (RICHARDSON, 1998).

O aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos verificado nas últimas décadas tem causado problemas ambientais de modo geral em quase todas as partes do mundo. A proteção ambiental vem adquirindo grande importância na opinião pública e em organismos não governamentais que têm cobrado das autoridades competentes, mecanismos rápidos e eficientes de controle dos meios de contaminação ambiental e tratamento das áreas atingidas (KOPLIN, 2000).

Existe atualmente um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Não menos importante, é a contribuição da atividade agrícola, dos esgotos sanitários e dos resíduos domésticos (ROSATO, 2001).

O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo o preparo da amostra e análise de laboratório), além do comum corte de verbas das agências de monitoramento, têm imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental (KARUBE, 1995). O aumento na quantidade de dados analíticos tende a aumentar a confiabilidade nas decisões de gerenciamento ambiental, por caracterizar melhor os compostos poluentes “in situ” e avaliar a eficiência dos procedimentos de descontaminação (MARKO-VARGA, 1995).

Frente a estes desafios, uma estratégia de varredura poderia identificar as amostras negativas para eliminá-las do conjunto de amostras e ajudar a priorizar as positivas, reduzindo custos e melhorando os serviços analíticos.

Deste modo, é importante contar com novas tecnologias analíticas que permitam um aumento no número de análises dos diversos tipos de poluentes com rapidez, seletividade e sensibilidade a um custo acessível (NISTOR, 1999; SVITEL, 1998). Com o rápido avanço no campo da biologia, os sistemas

biológicos vêm se tornando uma importante ferramenta a ser usada na química analítica. Métodos bioanalíticos podem ser usados como uma estratégia de varredura ou como uma ferramenta analítica de fato.

Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento "*on-line*" de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas têm aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, principalmente nos que visam à área de controle ambiental (ROSATO, 2001).

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos capazes de detectar rapidamente espécies químicas e/ou biológicas (analito), tanto qualitativa como quantitativamente. Esses dispositivos estão sendo recomendados para serem empregados nas áreas da saúde, ambiental, alimentícia e até na prevenção de bioterrorismo (FURTADO, *et al*, 2008).

## **1.1 Pesticidas**

Pesticidas são substâncias químicas naturais ou sintéticas, destinadas a exterminar, controlar ou combater de algum modo pragas, no sentido mais amplo: tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem. Adotando-se essa definição, tem-se entre as pragas: insetos, carrapatos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida animal ou vegetal danosa à saúde e ao bem estar do homem, à lavoura, à pecuária e seus produtos e a outras matérias primas alimentares (ZAMBRONE, 1986).

Por extensão, incluem-se nesta categoria os agentes desfolhantes, os desseccantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Essa definição

exclui fertilizantes e hormônios administrados a animais para estimular o crescimento ou modificar o comportamento reprodutivo.

### **1.1.1 Histórico, toxicidade e classificação dos pesticidas**

Na primeira metade do século XX, predominaram os inseticidas naturais de origem orgânica ou inorgânica. Os inseticidas inorgânicos mais utilizados foram arseniatos de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Entre estes, os arseniatos mostravam-se extremamente tóxicos ao homem, animais superiores e ao meio ambiente como um todo (CORBETT, 1984; SANTOS, *et al*, 2007).

Dentre os inseticidas orgânicos de origem natural apresentados na Figura 1, foram muito utilizados: nicotina, nor-nicotina, anabasina, piretrinas e aletrina, rotenóides como a rotenon e, em menor escala, alguns quassinóides, como a quassina. Um inseticida conhecido desde o primeiro século da era cristã era o piretro, constituído basicamente de piretrinas, extraído das folhas do *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Até a II Guerra Mundial, o piretro, rotenona e a nicotina eram os principais produtos orgânicos de origem vegetal utilizados no controle de insetos (CORBETT, 1984; SANTOS, *et al*, 2007).

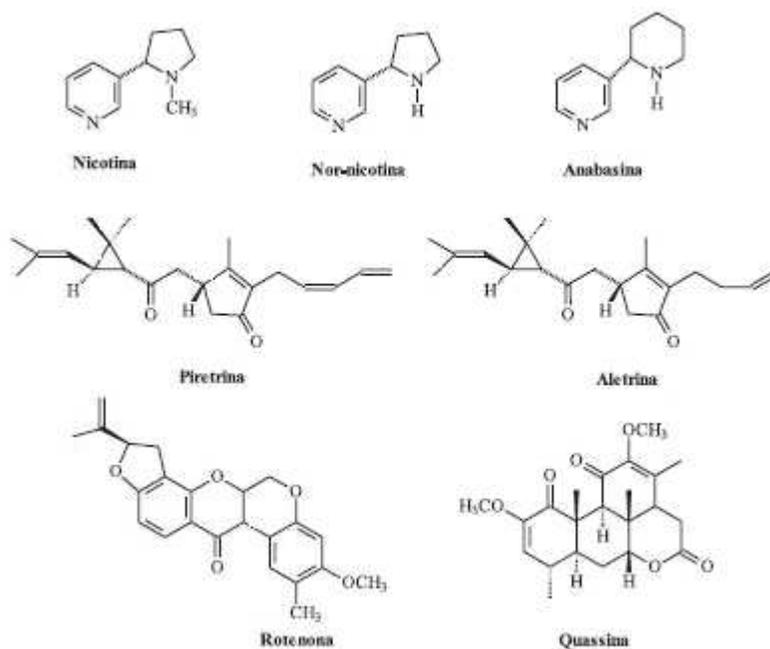


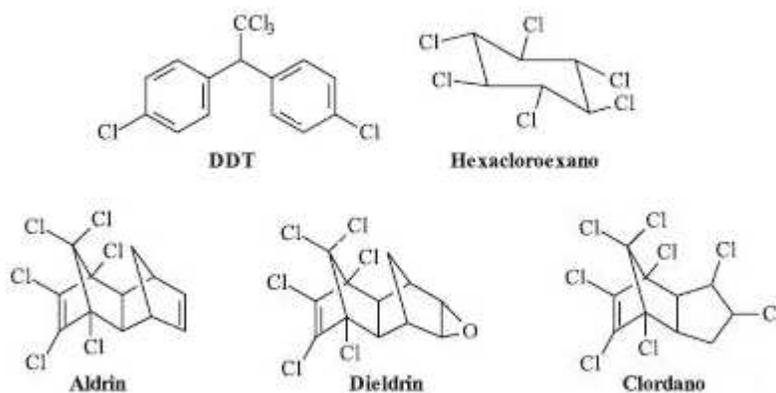
Figura 1: Pesticidas orgânicos de origem vegetal (SANTOS, *et al*, 2007)

Em 1874, Othmar Zeidler sintetizou um composto orgânico, o 1,1-bis (4-clorofenil)-2, 2,2-tricloroetano, mais conhecido como DDT, mas só em 1939, Paul Müller descobriu suas propriedades como pesticida, o que lhe valeu um prêmio Nobel. O DDT foi o primeiro pesticida sintético organoclorado maciçamente utilizado (ZAMBRONE, 1986).

Após a II Guerra Mundial, a indústria, especialmente a química, teve grande desenvolvimento e, com ela, os pesticidas sintéticos. Atualmente, os pesticidas têm utilização cada vez mais ampla, tanto na agricultura como na saúde pública e sem dúvida já se incorporaram no nosso dia-a-dia (ZAMBRONE, 1986). Existe ainda o aspecto lucrativo do uso de pesticidas; uma estimativa sugeriu que nos Estados Unidos, no ano de 1997, para cada dólar investido em pesticidas havia um retorno da ordem de quatro dólares.

Nas décadas de 50 a 70, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade inseticida que se mostraram mais potentes e mais específicos, substituindo rapidamente o inseticida de origem

natural. Passaram a ser utilizados o DDT ([1,1-bis-(4-clorofenil)-2, 2,2-tricloroetano]), HCH (hexacloroexano), aldrin, dieldrin e clordano, apresentados na Figura 2 (CORBETT, 1984; SANTOS, *et al*, 2007).



**Figura 2: Primeiros pesticidas sintéticos (SANTOS, *et al*, 2007)**

Contudo, os organoclorados estão nos primeiros lugares em várias listas de poluentes, devido à sua grande persistência no meio ambiente e fácil acumulação (MARICONI, 1981). Em função de sua persistência, têm sido responsabilizados como poluidores do meio ambiente. Acumulam-se nos tecidos gordurosos do homem, causam redução de fertilidade em animais e desequilíbrios biológicos na natureza, ressaltando que muitas espécies de insetos se tornaram resistentes aos organoclorados (VIEIRA, *et al*, 1999; SANTOS, *et al*, 2007).

No Brasil, os pesticidas foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser usados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960. Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de pesticidas, condiciona o agricultor a comprar esse produto com recursos do crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de pesticida para cada financiamento requerido (OPAS, 1997).

Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou um enorme incremento e disseminação da utilização dos pesticidas no Brasil, que

é atualmente um dos maiores consumidores mundiais, do que resultam inúmeros problemas, tanto de saúde da população como do meio ambiente. Muitos desses produtos não possuem antídotos e são proibidos em seus países de origem (OPAS, 1997).

Todos os pesticidas são substâncias tóxicas, podendo sua utilização oferecer ou não perigo para o ser humano. A segurança que se pode ter em seu uso está diretamente relacionada à toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo em que se fica exposto a ele durante a aplicação. De modo geral, deve estender-se o risco de contaminação a todos, desde operários da indústria que os fabricam e os que manipulam durante a aplicação (contaminação direta), até a população em geral, consumidora de produtos em que foram aplicados, ou populações que ficam expostas em áreas contaminadas (contaminação indireta) (ZAMBRONE, 1986).

A toxidez de uma substância química em insetos não a qualifica necessariamente como inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxidez frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativo no tecido adiposo de seres humanos e de animais domésticos. Fica evidente que as características citadas referem-se àquele pesticida tido como ideal o que raramente será o caso. Dentro da classificação de pesticidas são incluídas também substâncias que repelem e que atraem insetos (SAKKAS *et al*, 2002; NATH *et al*, 1999; ADDOR, 1994).

Do ponto de vista toxicológico, os pesticidas podem ser mais ou menos tóxicos ao homem, existindo para cada um uma avaliação toxicológica correspondente. No Brasil, esta avaliação está a cargo do Ministério da Saúde, e a nível internacional pela FAO/OMS (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação/ Organização Mundial da Saúde). A avaliação toxicológica mais comum é dada pela dose letal 50, ou DL<sub>50</sub>, que é geralmente estudada em ratos albinos e outros animais de laboratórios, das quais uma das mais importantes é a dose aguda oral, (quando a exposição se dá por meio de

uma única dose via oral), havendo ainda, a dérmica (quando a exposição ocorre pela pele) ou ainda a inalatória (pelas vias respiratórias) (BAPTISTA, 1999).

A DL<sub>50</sub> é definida como “a dose que previsivelmente causará uma resposta de 50% em uma população na qual se procurará o efeito letal”, e sua unidade é mg kg<sup>-1</sup> (BAPTISTA, 1999). A OMS recomenda a classificação de pesticidas pelo perigo dentro de 5 classes básicas de valores de DL<sub>50</sub>, de acordo com a Tabela 1. A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificam os agentes químicos dentro de grupos de trabalho de acordo com o potencial cancerígeno em seres humanos e, experimentalmente, em animais. Um certo número de pesticidas e seus produtos de degradação (herbicidas ácidos clorofenol, DDT, ETU, clorofenol, alguns derivados de anilina) estão dentro do grupo de possíveis agentes cancerígenos (HATRIK, 1996).

**Tabela 1: OMS classificação recomendada de pesticidas pelo perigo (HATRIK, 1996)**

Classe		DL <sub>50</sub> dose oral para ratos (mg kg <sup>-1</sup> massa corpórea)	
		Sólido	Líquido
Ia	Extremamente tóxicas	≤5	≤20
Ib	Altamente tóxicas	5-50	20-200
II	Moderadamente tóxicas	50-500	200-2000
III	Levemente tóxicas	>500	>2000
III+	Relativamente tóxicas	>2000	>3000

A OMS estima que ocorram no mundo cerca de três milhões de intoxicações agudas por pesticidas, com 220 mil mortes por ano. Dessas, cerca de 70% ocorrem em países do chamado Terceiro Mundo. Além da intoxicação de trabalhadores que tem contato direto ou indireto com esses produtos, a contaminação de alimentos tem levado a um grande número de intoxicações e mortes (OPAS, 1997).

Dada a grande diversidade de produtos, cerca de 300 princípios ativos em 2 mil formulações comerciais diferentes no Brasil, é importante conhecer a classificação dos pesticidas quanto à sua ação e ao grupo a que pertencem (OPAS, 1997). É importante notar que a classificação entre a classe e o grupo químico não tem correlação, o que pode ser verificado na Tabela 2.

**Tabela 2: Classificação dos pesticidas quanto à classe e grupo químico.**

Classe		Grupo químico	
Inseticidas	Contra insetos nocivos	Organoclorados	DDT, aldrin, lindano
Fungicidas	Contra fungos	Organofosforados	Malation, folidol
Herbicidas	Contra ervas daninhas	Carbamatos	Aldicarb, carbofuran
Raticidas	Combate a roedores	Piretróides	Permetrina, cipotrim
Acaricidas	Combate a ácaros	Uréias substituídas	Monuron, linuron
Nematicidas	Combate a nematóides	Triazinas	Atrazina, ametrina
Molusquicidas	Combate a molusco (esquistossomose)	Ácidos	2,4D, picloran
Larvicidas	Destruir larvas de insetos	Acetanilidas	Alaclor, propaclor

### 1.1.2 Pesticidas no ambiente

Em todo o mundo, o uso de novas técnicas agrícolas, fertilizantes e pesticidas, iniciado na década de 60 fez a produção mundial de alimentos triplicar. Quando os pesticidas são usados corretamente, podem trazer ganho na colheita; entretanto, quando mal aplicados podem causar consideráveis conseqüências no meio ambiente e na saúde pública.

Além de causar doenças nas pessoas que manipulam e aplicam esses produtos, muitas vezes sem o cuidado necessário, podem também contaminar as pessoas que consomem os alimentos devido aos resíduos acima dos níveis

permitidos, e principalmente agravar a poluição dos solos, águas superficiais e subterrâneas, de onde podem ser transferidos para várias formas de vida, pois os pesticidas podem permanecer com atividade por um tempo maior do que o estipulado para exercer sua função, atingindo assim todo o ecossistema (LARA *et al*, 1992). Isso pode ser visualizado melhor na Figura 3.

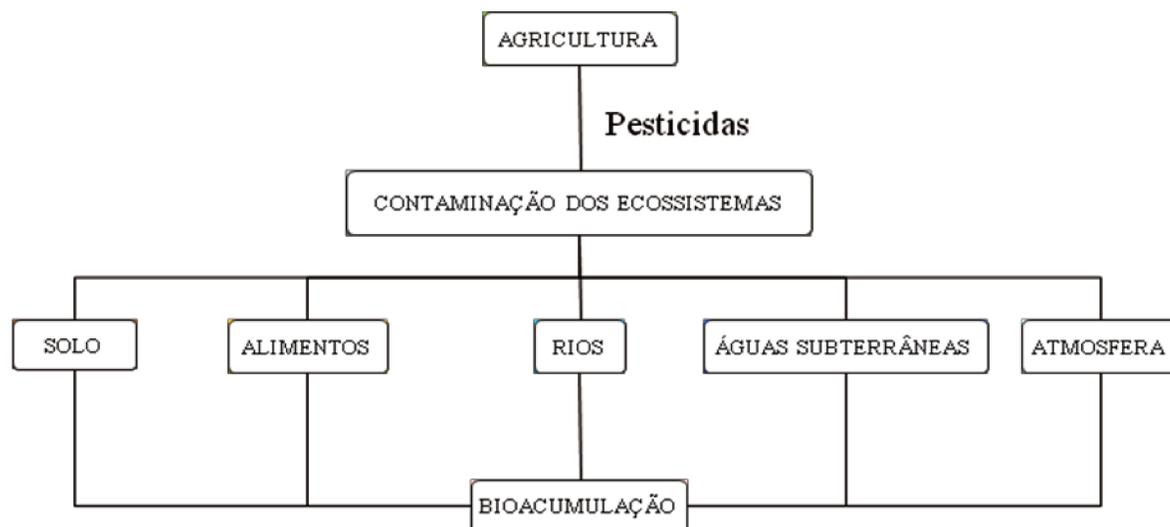


Figura 3: Diagrama esquemático da contaminação ambiental por pesticidas (LUCHINI, 1995)

O solo é o compartimento do agroecossistema considerado mais complexo e cuja probabilidade de contaminação por pesticidas é maior exatamente porque é onde as aplicações são feitas, ou onde cai a folhagem tratada ou água de chuva que lavou a superfície dessa folhagem tratada. Os resíduos de pesticidas podem interagir com as fases sólida, líquida e gasosa, e com a porção viva do solo, isto é, com a microbiota ou ainda contaminar a atmosfera por evaporação de resíduos da superfície da cultura ou do solo contaminado. Estas interações determinarão a ocorrência de diferentes processos que envolvem transformações químicas, físicas, biológicas ou a combinação dessas (ANDREA, 1998).

O exemplo mais importante de transformações físicas e químicas de resíduos é o que envolve o processo de adsorção da molécula deste na matéria particulada do solo (matéria orgânica e argila, principalmente), reduzindo a concentração do composto na solução e conseqüentemente diminuindo a sua disponibilidade para o ataque microbiano. Além disso, o processo de adsorção

pode imobilizar mesmo que temporariamente o composto, e também diminuir o transporte das substâncias por lixiviação (ANDREA, 1998).

No solo, a matéria orgânica (MO) é o componente mais importante na retenção de pesticidas não iônicos, pois quanto maior a quantidade de matéria orgânica maior a capacidade de adsorção pelos solos, diminuindo portanto a lixiviação dos pesticidas adsorvidos, principalmente para os não iônicos (LUCHINI, 1995).

Como efeitos de transformação química, cita-se o efeito do pH, que determina, muitas vezes, a prevalência de degradação da molécula por processo puramente químico. Mas o pH do solo também tem efeito bioquímico, pois influencia a atividade microbiana e, desta forma, conforme o pH do meio, haverá ou não predominância de atividade microbiana atuando sobre a degradação de pesticidas (ANDREA, 1998).

Os processos de transformação e desaparecimento dos pesticidas no solo dependem tanto das características do próprio solo, como das características físicas e químicas das substâncias, pois moléculas de massa molar muito grande ou com elementos halogêneos e/ou anéis aromáticos altamente condensados, por exemplo, são mais persistentes. A persistência depende também da eficiência de processos físicos de transformação, tais como evaporação, lixiviação, erosão e absorção pelas culturas. A taxa pela qual o composto está disponível na solução do solo pode ainda determinar maior ou menor persistência por influenciar nos processos bióticos ou abióticos de degradação (ANDREA, 1998).

Outro importante fator para o aumento da contaminação ambiental por pesticidas é o comportamento desses compostos em água, pois quanto maior a hidrossolubilidade, maior a facilidade de transporte destes do ponto de aplicação até rios, atmosfera, sedimentos e outros (RAO *et al*, 1983). A Figura 4 apresenta o diagrama esquemático da contaminação da água por pesticidas.



**Figura 4: Diagrama esquemático da contaminação da água por pesticidas (ANDREA, 1998)**

A água é um dos mais importantes constituintes do ecossistema terrestre, daí a importância da preservação da sua qualidade. A intensificação da produção agrícola, com o sistema de monoculturas para produção de alimentos e matéria prima para indústria requer mais detalhes na regulamentação do uso de pesticidas para se evitar a contaminação da água com vários pesticidas e seus produtos de transformação (HATRIK, 1996).

Os pesticidas podem entrar nos sistemas aquáticos por aplicação direta para controle de pragas, dispersão por aplicações aéreas ou terrestres e podem ainda contaminar águas subterrâneas e cursos d'água pela lavagem de máquinas utilizadas nas aplicações, manuseio impróprio e descarga de restos de formulações em rios e lagos, e por intermédio de efluentes industriais. Podem também ser transportados do solo e contaminar cursos d'água e águas subterrâneas, através do escoamento superficial ou "run-off" e por lixiviação.

Segundo RAO *et al*, o escoamento superficial é o transporte físico do poluente presente na superfície do solo pela água de chuva ou de irrigação que não percolou através do perfil desse, e lixiviação é o transporte do pesticida pela água no perfil do solo (RAO *et al*, 1983). Assim, quanto mais água de chuva ou irrigação sobre a lavoura, mais as moléculas dos pesticidas adsorvidas à

superfície das partículas do solo podem ser desorvidas ou arrastadas para outro ambiente.

Segundo HASSETT *et al*, quando os pesticidas encontram o meio aquático podem: (1) estar associados aos materiais em suspensão e, eventualmente, migrar para os sedimentos. Estando no sedimento, podem ser liberados para a água, ou ser adsorvidos, alterados ou degradados por microorganismos. Muitos sedimentos são anaeróbicos e, nestas condições, a maioria dos pesticidas não é degradada. Entretanto, alguns compostos como os clorados são degradados facilmente em condições de anaerobiose, sendo então importante que estes pesticidas fiquem adsorvidos nas partículas em suspensão presentes no meio aquoso. Além disso, podem ainda: (2) permanecer dissolvidos na água e posteriormente ser adsorvidos pelos sedimentos, degradados por microorganismos, absorvidos por organismos vivos ou diluídos nos oceanos. A degradação microbiana, neste casos, é muito menor do que a degradação dos pesticidas associados aos sedimentos, devido à baixa concentração de microorganismos presentes na água (HASSETT *et al*, 1975).

Outro fator que pode influenciar o comportamento de um pesticida num ambiente aquático é a exposição destes compostos à radiação solar, e a conseqüente degradação fotoquímica. Esta fotodecomposição ocorre em maior extensão onde houver maior penetração da luz solar. Em águas límpidas, muitos pesticidas são drasticamente mudados quando expostos à luz ultravioleta artificial ou à luz solar. Mas, em águas com grande turbidez, a fotodegradação de pesticidas pode ser insignificante (LUCHINI, 1995).

Segundo FÜHR, o pesticida ideal deveria ser degradado totalmente (mineralizado) até seus elementos estruturais após sua ação para a qual foi intencionalmente aplicado (FÜHR, 1984). Entretanto, na prática, em alguns casos, a molécula original do pesticida pode ser convertida em substâncias ainda mais tóxicas, ou seus produtos de degradação entram em reações sintéticas que podem resultar na formação de moléculas mais complexas e mais tóxicas do que a molécula original (LICHTENSTEIN, 1980).

Os produtos de degradação podem ser divididos arbitrariamente, segundo KOVACS, em: (a) metabólitos volatilizados ou eliminados: incluem as substâncias respiráveis, isto é, produtos originais ou intermediários; (b) metabólitos livres não voláteis: produtos derivados da molécula original após dehalogenação, hidrólise, oxidação, redução, condensação, etc; (c) metabólitos conjugados: produtos de metabolismo secundário, envolvendo reações com substratos como açúcares e ou sulfatos, que geram substâncias que são componentes naturais da célula; (d) constituintes naturais: resíduos que são componentes normais de células, mas são derivados de um pesticida ou de seus metabólitos; (e) resíduos ligados ou resíduos não extraíveis: os resultantes da ligação do pesticida ou de seus metabólitos com componentes dos solos, plantas ou animais que são dificilmente extraíveis (KOVACS, 1986).

Um princípio muito interessante das instruções da Council (Official Journal of the European Communities) foi a decisão da inclusão da avaliação do risco dos metabólitos para aprovação de pesticidas. Os pesticidas modernos, de fato, são em geral menos persistentes que os antigos, mas podem se transformar em compostos perigosos para o meio ambiente. Temos como exemplo alguns fungicidas como o zinebe e manebe que formam etilentiourea (ETU), um metabólito cancerígeno e alguns herbicidas derivados de uréia, que formam dicloroanilina, um precursor de compostos carcinogênicos. Muitos metabólitos podem ser mais móveis no solo do que o composto inicial, atingindo mais facilmente águas subterrâneas (GALASSI *et al*, 1996).

A aplicação intensiva de inseticidas de largo espectro no controle de insetos-praga tem causado impacto negativo nos agroecossistemas, além do crescente aumento de casos de resistência a pesticidas (JAMAL, *et al*, 2002; KEY, *et al* 2002). Estudos de impactos ou efeitos de inseticidas sobre inimigos naturais de pragas são de grande importância econômica e ambiental. O uso de inseticidas seletivos é um fator preponderante dentro do manejo integrado de praga. Após o uso intensivo de inseticidas no controle de pragas, muitas espécies de insetos têm desenvolvido resistência a inseticidas através de uma variedade de mecanismos (JAMAL, *et al*, 2002). As espécies de insetos utilizam diferentes mecanismos de

resistência para se adaptarem à pressão seletiva imposta pelo mesmo inseticida (KEY, *et al* 2002). Um dos mecanismos de resistência desenvolvidos por insetos é a modificação da proteína alvo do inseticida (BURCHENAL *et al*, 1977; AMARANTE, *et al*, 2002).

Novas substâncias são necessárias para efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixo impacto ambiental. Assim, os inseticidas modernos estão sendo concebidos para prevenir a infestação excessiva de pragas e, conseqüentemente, elevar o rendimento da produção agrícola ou pecuária e a qualidade das colheitas, com menos toxicidade e em doses menores com efeito mais seletivo sobre certas pragas.

### 1.1.3 Pesticidas organofosforados

O primeiro pesticida organofosforado sintetizado foi o tetraetilpirofosfato (TEEP) em 1854, Figura 5, mas inicialmente não se conheciam suas propriedades como pesticida. A partir de 1932, começou-se a investigar esses agentes, inicialmente como praguicidas e mais tarde para uso como armas químicas (SANTOS, *et al*, 2007).

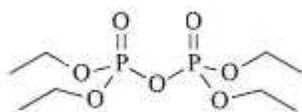


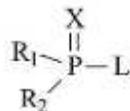
Figura 5: Pesticida Tetraetilpirofosfato (TEEP) (SANTOS, *et al*, 2007)

O desenvolvimento de gases de guerra está intimamente ligado ao desenvolvimento dos inseticidas. Todos os derivados orgânicos do ácido fosfórico são tóxicos e têm penetração cutânea, em maior ou menor extensão (VANIN, 1992).

Historicamente, postula-se que os pesticidas organofosforados surgiram na década de 40, mas os principais representantes desta classe foram introduzidos na década de 60 e 80 e mesmo com a implantação de outras classes de pesticidas e de novas metodologias de controle de pragas, 40% do mercado mundial de pesticidas em 1999 era representado por organofosforados. A principal razão para o sucesso dos compostos organofosforados como inseticidas é sua forte atividade biológica acoplada com sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida em plantas da ordem de 2 até 10 dias. Deve-se notar que durante os últimos 30 anos, inseticidas organofosforados têm sido amplamente usados como alternativa para substituir compostos organoclorados no controle de insetos; são os mais utilizados devido ao baixo custo, à síntese fácil e baixa toxidez para muitos organismos (VIEIRA, *et al*, 1999; SANTOS, *et al*, 2007).

A continuidade do interesse por esta classe deve-se à facilidade de síntese de novos derivados, à possibilidade de síntese de pró inseticidas, que sofrem ativação preferencial em insetos e não em mamíferos, e à maior biodegradabilidade em comparação com os organoclorados. Os organofosforados apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h do contato. Os inseticidas organofosforados são importantes não somente pela proteção agrícola que oferecem mas também, pelos propósitos industriais, domiciliares e ambientais (KLOCHER, *et al*, 1991; SANTOS, *et al*, 2007).

Os inseticidas organofosforados que representam a classe de maior interesse comercial e toxicológico, são ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico e usualmente têm a estrutura geral descrita na Figura 6.



X= O, S e Se

R<sub>1</sub>; R<sub>2</sub> = alquil, SR', OR' ou NHR'

L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos

**Figura 6: Estrutura fundamental de inseticidas organofosforados (SANTOS, *et al*, 2007)**

Usualmente, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são grupos arilas ou alquilas que são ligados diretamente ao átomo de fósforo, formando fosfinatos, ou através de um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfatos e fosfortioatos. Em outros casos, R<sub>1</sub> está diretamente ligado ao átomo de fósforo e R<sub>2</sub> está ligado por um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfonatos ou tiosfosfonatos. Os fosforamidatos apresentam no mínimo um grupo -NH<sub>2</sub> na molécula; os grupos amino dos fosforamidatos podem ser não-substituídos, mono ou di-substituídos; os átomos que podem formar ligação dupla com o fósforo podem ser oxigênio, enxofre ou selênio. Finalmente, o grupo **L** pode pertencer a uma variedade de grupos, tais como halogênios, alquila, arila ou heterocíclicos. O grupo **L**, ligado através de um oxigênio ou átomo de enxofre ligado ao átomo de fósforo, é chamado de grupo de saída, que é liberado pelo átomo de fósforo quando o mesmo é hidrolisado pela fosfotriesterase (PTE), ou pela interação com o sítio da proteína (AChE) (HOLLINGWORTH, 1976; CHAMBERS, *et al* 1995; SANTOS, *et al*, 2007).

A aplicação industrial e comercial de compostos organofosforados na agricultura começou com Schrader e colaboradores, que descobriram, em 1941, o inseticida octametilpirofosforamida (Figura 7), que foi chamado de Scharadan.



**Figura 7: Primeiros pesticidas organofosforados (SANTOS, *et al*, 2007)**

Depois deste, um grande número de inseticidas ésteres organofosforados também foram descobertos, incluindo o primeiro com práticas inseticidas chamado de Bladan, que continha tetraetilpirofosfato, ou TEEP, preparado na Alemanha em 1944. Na verdade, a síntese do tetraetilpirofosfato foi realizada pela primeira vez por Moschine em 1854. Contudo, o TEEP causava perturbações como náuseas e alta toxicidade, apesar do que, foi muito usado na Alemanha como substituto da nicotina para matar pulgões (SANTOS, *et al*, 2007).

O grande avanço dos inseticidas organofosforados na agricultura e de seu conhecimento científico na relação estrutura-atividade deu-se pela descoberta do composto parathion por Schrader em 1944, primeiro produto de novo grupo de inseticidas revolucionários usados até hoje. Apesar de sua toxidez relativa, outros inseticidas menos tóxicos tinham sido desenvolvidos com poucas modificações estruturais; por exemplo, clorhion, fenthion e fenitrothion (Figura 8).

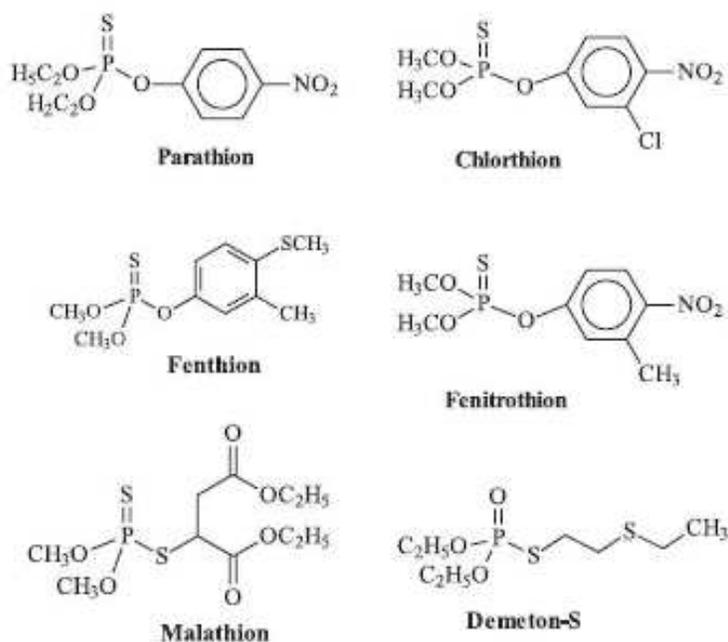


Figura 8: Pesticidas organofosforados (SANTOS, *et al*, 2007)



Pode ocorrer também a lixiviação, que é o transporte pelo perfil do solo contaminando o lençol freático o que pode causar um amplo espectro de efeitos tóxicos em organismos aquáticos e seres humanos. Pesticidas organofosforados foram determinados 19 dias após experimentos de simulação de aplicação e transporte superficial (BASANTA, *et al* 1995).

#### 1.1.4 Pesticidas organofosforados estudados neste trabalho

##### 1.1.4.1 Metil Paration

Tiofosfato de O,O-dimetil,O-p-nitrofenil é um inseticida e acaricida amplamente usado no controle de pestes na agricultura, em sementes, frutas e hortaliças. É um composto altamente tóxico de acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA). Sua classificação toxicológica pertence ao grupo Ib, apresentando grande penetração cutânea. Em 1991, se tornou um pesticida de uso restrito (U.S EPA, 2006). Em particular o enxofre torna a molécula muito mais estável quanto à hidrólise. Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 10, a sua fórmula molecular é  $C_8H_{10}NO_5PS$ , e a massa molar sendo  $263,21 \text{ g mol}^{-1}$ . É um sólido branco, apresentando-se na forma de cristais. Sua solubilidade em água é de 50 ppm, sendo solúvel na maioria dos solventes orgânicos.  $DL_{50}$ : 14, 24  $\text{mg kg}^{-1}$  (MERK, 1997)

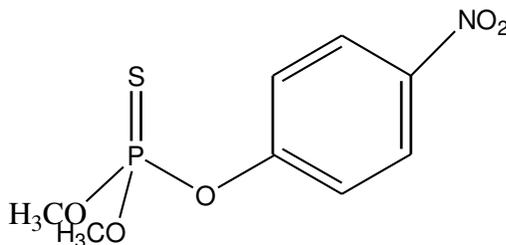


Figura 10. Fórmula estrutural da molécula do pesticida Metil Paration

### 1.1.4.2 Clorpirifos

Fosforotioato O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil é um inseticida e acaricida usado amplamente na agricultura, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 11.

Apresenta fórmula molecular  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ , e massa molar  $350,59 \text{ g mol}^{-1}$ . Em temperatura ambiente, apresenta-se na forma de cristais brancos. A solubilidade em água é de 2 ppm, sendo solúvel na maioria dos solventes orgânicos.  $DL_{50}$   $145 \text{ mg kg}^{-1}$  (MERK, 1997).

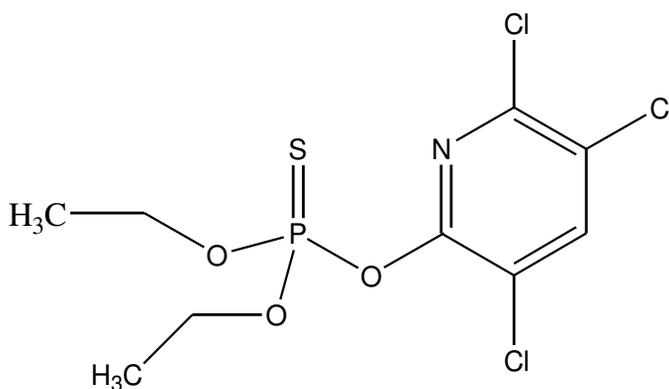


Figura 11. Fórmula estrutural da molécula do pesticida Clorpirifos

### 1.1.4.3 Malation

O S-(1,2-dicarbetoietil) O,O dimetilditiofosfato é um inseticida derivado do ácido succínico usado na agricultura. Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 12 e sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ . A massa molar é  $330,36 \text{ g mol}^{-1}$ . Em temperatura ambiente, é um líquido âmbar com odor característico. A solubilidade em água é de 145 ppm, sendo solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Sofre hidrólise na faixa de pH entre 5,00 e 7,00. É estável em solução tampão pH 5,3.  $DL_{50}$   $1375 \text{ mg kg}^{-1}$  (MERK, 1997).

Como todo organofosforado, age por inibição da colinesterase, que contudo é reversível para doses sub-letais. Produz como efeitos a bronco-constricção, suor, salivação e outras secreções glandulares, anorexia, náusea, vômito, diarreia,

constricção muscular, convulsão, paralisia da respiração. Embora estes efeitos sejam reversíveis, o paciente precisa de alguns dias para se recuperar.

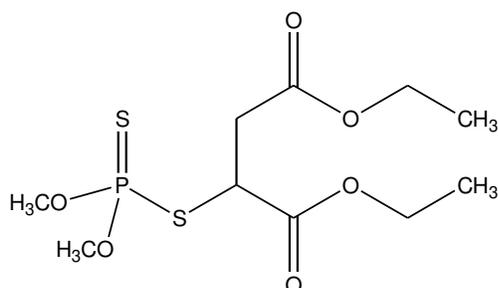


Figura 12: Fórmula estrutural da molécula do pesticida Malation

#### 1.1.4.4 Diclorvos

Fosfato de 0,0-dimetil-2,2-diclorovinila, é um inseticida cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 13. Sua fórmula molecular é  $C_4H_7Cl_2O_4P$ . A massa molar é  $220,98 \text{ g mol}^{-1}$ . É um líquido de coloração âmbar, odor aromático e sua solubilidade em água é  $1 \text{ g/100 mL}$ . É solúvel em álcool e na maioria dos solventes não polares.  $DL_{50}$ :  $80, 56 \text{ mg kg}^{-1}$  (MERK, 1997). A molécula de diclorvos é estável ao aquecimento e é hidrolisada rapidamente em meio alcalino. Em meio ácido sua hidrólise é lenta.

Possui efeito toxicológico leve em seres humanos e, em altas doses, ataca o sistema nervoso central, uma vez que é um agente anticolinesterase. O principal problema relacionado à utilização deste pesticida é que o emprego exagerado, tanto doméstico, no combate à moscas, baratas e pernilongos, como na agricultura e pecuária, faz com que a contaminação humana se torne freqüente (OLIVEIRA, 2004).

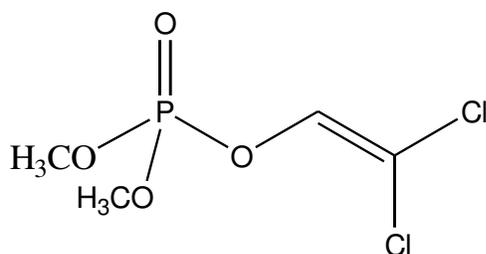


Figura 13. Fórmula estrutural da molécula do pesticida diclorvos.

## 1.2 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Os sistemas de análise por injeção em fluxo têm como objetivo a mecanização da análise química através da introdução da solução da amostra em um fluido transportador, não segmentado, que conduz a amostra em direção à cela de detecção, sendo possível, ao longo do percurso analítico, receber reagentes e passar por etapas de processamentos, como: separações, diluições, extração líquido-líquido, pré-concentração etc. (RUZICKA & HANSEN, 1975; KRONKA, *et al*, 1997)

Podemos dizer que a análise por injeção em fluxo é uma técnica de automação que, essencialmente, combina três princípios básicos: injeção de amostra, dispersão controlada da amostra e reprodutibilidade no tempo dos eventos. O volume injetado, a vazão do carregador e o tempo de residência são parâmetros que afetam a dispersão da amostra. A grandeza da dispersão da amostra é muito importante no desenvolvimento de um método FIA, pois se relaciona diretamente com a sensibilidade, a frequência de amostragem e o grau de mistura entre os reagentes (REIS, *et al*, 1989; REIS, 1996; ZAGATTO, *et al*, 1999)

Desde a proposta do conceito de “Flow Injection Analysis” por RUZICKA e HANSEN (1975), vários procedimentos de automação/meccanização de procedimentos analíticos foram desenvolvidos. A fácil assimilação desta técnica pela comunidade científica se deve à simplicidade da instrumentação, facilidade operacional e da implementação dos módulos de análise, utilizando em muitos casos, instrumentação de baixo custo.

Segundo a IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, a automação é definida como sendo o uso combinado de dispositivos mecânicos e instrumentais para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o esforço e a inteligência humana na execução de um dado processo no qual, pelo menos, uma das operações é controlada sem a intervenção humana, por um sistema de realimentação (*feedback*). A definição para mecanização, também segundo a IUPAC, refere-se ao uso de dispositivos para substituir, refinar, ampliar ou

suplementar o esforço humano, diferenciando da automação por não ser efetuada a realimentação em nenhuma parte do processo (KINGSTON, *et al*, 1994).

Assim, muitos sistemas de fluxo podem ser melhor designados como instrumentos mecanizados, que executam funções previamente determinadas sem a intervenção humana, porém não podem tomar decisões ou mudar o curso da análise durante sua execução (CALATAYUD, 1996).

Os sistemas em fluxo podem medir diretamente uma propriedade da espécie dissolvida na amostra injetada ou exigir reações químicas ou enzimáticas para a conversão da espécie química de interesse em outra com propriedades mais favoráveis às determinações. Os métodos envolvendo biossensores e reatores enzimáticos têm sido empregados com esta finalidade. A partir de reações enzimáticas, há a formação de novas espécies, as quais serão detectadas (REIS, 1996).

Os biossensores, os reatores enzimáticos e os sistemas de fluxo são totalmente compatíveis (DE LA GUARDIA, 1995). O uso de enzimas imobilizadas em sistemas de análise por injeção em fluxo permite o desenvolvimento de análises rápidas, simples e específicas, com consumo de quantidades reduzidas de reagentes (REIS, 1996).

Nesta tese o sistema FIA continha uma cela de permeação gasosa por onde o ácido acético, proveniente de uma reação enzimática, sofria pervaporação e entrava em contato com um indicador ácido-base obtendo-se o sinal analítico.

O uso de membranas de difusão gasosa tem sido usado há vários anos em sistemas FIA para aumento de seletividade, uma vez que apenas algumas espécies são suficientemente voláteis a temperatura ambiente (LÁZARO, *et al* 1988).

As membranas podem ser usadas em FIA para transferir certos compostos de um fluxo doador (amostra), para um fluxo receptor (detector). O gás absorvido muda o pH do fluxo receptor, e isto pode ser medido espectrofotometricamente, via um indicador ácido-base, sendo a variação da absorbância proporcional à concentração do analito. Métodos condutométricos são também empregados, sendo o princípio baseado na mudança de condutividade de um fluxo receptor

pela absorção dos compostos voláteis (KUBAN, *et al*, 1993).

O sistema FIA emprega os componentes básicos usuais associados a uma cela de permeação gasosa que contém uma membrana semi-permeável que deve apresentar boa estabilidade química e física (KUBAN, *et al* 1993). Nos sistemas FIA com membranas de difusão gasosa, as variáveis de significância são principalmente: a vazão, o tipo de membrana e o procedimento de instalação da mesma (TRYZELL, *et al*, 1995).

### 1.3 Cromatografia gasosa e Espectrometria de massas (CG/MS)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária.

Na cromatografia gasosa (CG), a amostra é vaporizada e injetada no topo de uma coluna cromatográfica. Essas colunas são tubos longos de metais como aço ou cobre, vidro ou teflon. Colunas de CG têm diâmetro de cerca de 3 mm e comprimento em torno de 3 m.

A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel, que neste caso não interage com as moléculas do analito. Sua única função é transportar o analito através da coluna. Os gases utilizados como fase móvel devem ter alta pureza e ser inertes em relação à fase estacionária. Hidrogênio, nitrogênio e hélio são os mais usados. A Figura 14 apresenta um esquema básico de um cromatógrafo a gás (SKOOG, *et al*, 2002).

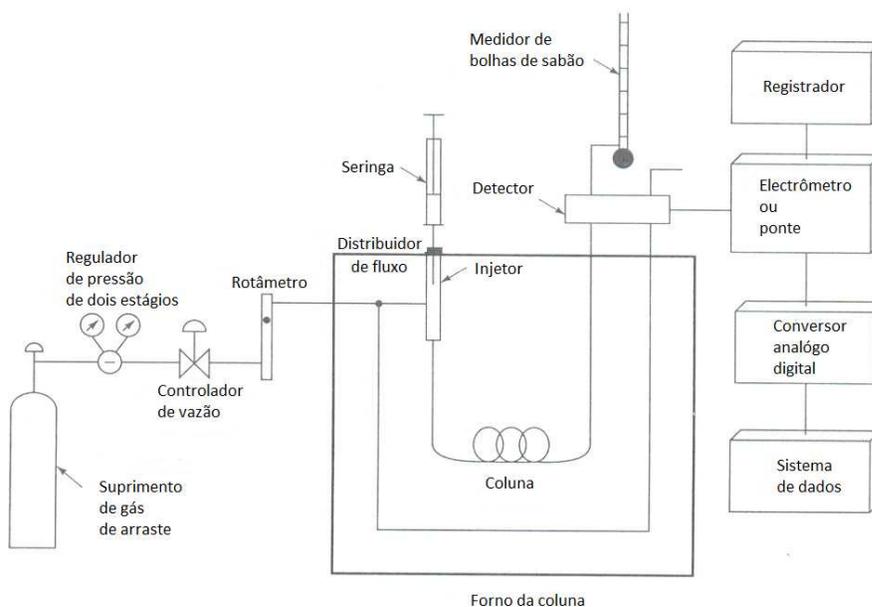


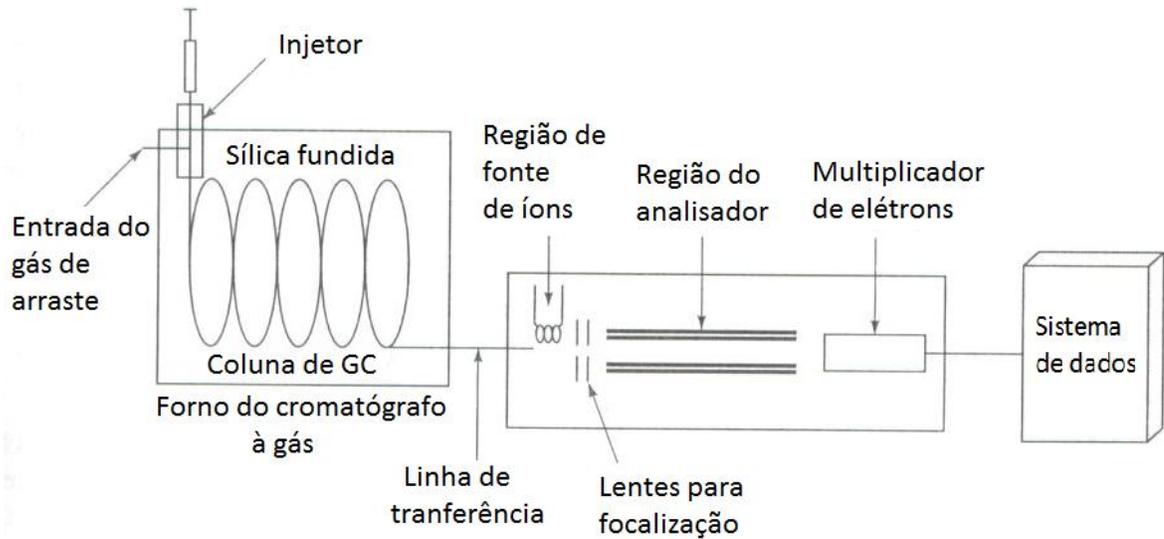
Figura 14: Componentes básicos de um cromatógrafo a gás (SKOOG, *et al*, 2002).

O principal mecanismo de separação da cromatografia gasosa está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. A utilização de fases estacionárias sólidas, as quais levariam à separação por adsorção, apresenta poucas aplicações. A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas. A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente (COLLINS, *et al*, 1997).

Os detectores de maior aplicação são o detector por ionização em chama e o detector de condutividade térmica. Os dados podem ser obtidos através de um registrador potenciométrico, um integrador ou um microcomputador, sendo as amostras identificadas por seus tempos de retenção.

Nesses equipamentos é necessário o controle da temperatura do injetor, da coluna e do detector, as quais são mantidas por termostatos. Como a temperatura é um fator extremamente importante, grande parte das análises por cromatografia gasosa é feita com programação de temperatura, obtendo-se melhor separação com picos mais simétricos em menor tempo.

Atualmente, espectrômetros de massas têm sido acoplados a equipamentos de cromatografia gasosa, que dão ao químico uma ferramenta poderosa para a identificação de compostos de misturas complexas, gerando assim os chamados métodos hifenados. A Figura 15 apresenta um esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (SKOOG, *et al*, 2002).



**Figura 15:** Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (SKOOG, *et al*, 2002).

No espectrômetro de massas, a amostra precisa ser volatilizada e ionizada. Os íons são separados por campos magnéticos ou elétricos em uma câmara de vácuo e a corrente iônica é detectada e gravada em função da massa. O parâmetro medido pelo MS é a razão massa/carga ( $m/z$ ), que é a razão do número de massa de uma dada partícula pelo número de unidades de carga eletrostática carregadas pela partícula (WATSON, 1997).

## 1.4 Enzimas

Praticamente todos os componentes moleculares de um organismo podem, potencialmente, reagir uns com os outros. Muitas dessas reações são favoráveis de modo termodinâmico. Mesmo assim, somente um pequeno subconjunto de todas as reações possíveis de fato ocorrem em quantidade significativa em um organismo. A velocidade de uma dada reação depende não somente da diferença entre a energia livre os estados inicial e final, mas também do caminho pelo qual os reagentes são transformados em produtos. Os organismos vivos fazem uso dos catalizadores, que são substâncias que aumentam a velocidade das reações em direção ao equilíbrio sem, contudo, afetar a  $\Delta G$  da reação. Os catalisadores biológicos são chamados de enzimas e a maioria são proteínas (VOET, *et al*, 2000).

As enzimas aceleram as reações bioquímicas pela interação física com os reagentes e produtos, propiciando um caminho mais favorável para a transformação de um no outro. As enzimas aumentam a velocidade das reações, fazendo com que a interação entre os reagentes aumente a probabilidade de a reação completar-se (VOET, *et al*, 2000).

Os biocatalizadores são constituídos principalmente por cadeias polipeptídicas. A parte protéica da enzima, sem cofatores ou grupos prostéticos, é denominada apoenzima, e não apresenta atividade catalítica. Os cofatores são pequenas moléculas orgânicas como as coenzimas FAD e NAD ou são íons como Fe(II), Mn(II), Cu(II), etc, os quais ligam-se fracamente à apoenzima e estão envolvidos diretamente na atividade catalítica. O grupo prostético, ao contrário, se liga fortemente à apoenzima. A associação do cofator ou grupo prostético à apoenzima forma a holoenzima que é a enzima ativa (LEHNINGER, 1995; SAID, *et al*, 2002; LEITE, 2005).

A molécula sobre a qual a enzima atua para formar o produto é chamada substrato. Em geral, o sítio de ligação do substrato consiste de um entalhe ou sulco na superfície de uma enzima, complementar ao formato dos substratos (complementaridade geométrica). As moléculas que se diferem do substrato no

formato ou na distribuição de grupos funcionais não podem ligar-se produtivamente à enzima. Complementaridade entre as enzimas e seus substratos é a base do modelo “chave e fechadura” da função enzimática proposto por Emil Fischer em 1894 (VOET, *et al*, 2000).

A primeira proposta, elaborada em 1894 por Fisher, foi o modelo “chave-fechadura”, no qual considera-se a existência de uma impressão negativa do substrato sobre a superfície da enzima. O substrato encaixa-se nesse sítio de ligação como uma chave a uma fechadura. Nesse modelo, o sítio ativo apresenta características estruturais rígidas que são complementares àquelas de cada substrato. Ele porém não prevê os efeitos de interações alostéricas (LEITE, 2005). Os efeitos alostéricos são aqueles nos quais a ligação de um ligante a um sítio afeta a ligação de outro ligante a outro sítio, geralmente requerem interações entre subunidades de proteínas oligoméricas (VOET, *et al*, 2000).

Outro modelo, sugerido por Koshland em 1968, conhecido como ajuste induzido, sugere um ajuste na conformação da superfície da enzima com a aproximação do substrato, formando um sítio de ligação. Neste modelo, os sítios ativos são flexíveis, apresentando uma estrutura complementar àquela do substrato somente quando estiverem ligadas à enzima. As reações catalisadas por enzimas ocorrem em velocidades que são  $10^9$  a  $10^{12}$  vezes mais rápidas que as reações correspondentes não catalisadas (LEHNINGER, 1995; SAID, *et al*, 2002; LEITE, 2005).

A aplicação analítica de enzimas imobilizadas vem sendo utilizada preferencialmente no lugar da enzima em solução. A imobilização de enzimas em matrizes inertes aparece como uma boa alternativa para manter a atividade catalítica e a estabilidade das enzimas.

Enzimas imobilizadas encontram amplo uso em química analítica na construção de biossensores e de reatores enzimáticos que são acoplados a sistema de análise em fluxo (GUILBAULT, 1991; LAM, 1995; LEITE, 2005).

## 1.5 Biossensores

Biossensores representam uma ferramenta promissora para complementar técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento "*in situ*" rápido. Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como alternativas para técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a elas, pois alguns biossensores ainda podem apresentar problemas de estabilidade (NISTOR, 1999).

Devido ao recente avanço nas áreas de microeletrônica, biotecnologia e fibras óticas, a definição de um biossensor evoluiu do conceito clássico de um eletrodo associado a uma enzima para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise ou bioafinidade (THEVENOT, 2001).

Um biossensor compreende dois elementos distintos: um elemento de reconhecimento biológico (anticorpo, enzima, células receptora, organela, tecido animal ou vegetal, microorganismo, ácidos nucleicos) em contato íntimo a um segundo elemento transdutor do sinal, o qual pode ser classificado em eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico) ou óptico (medida de luminescência, fluorescência). Este encontra-se conectado com um sistema de aquisição e processamento dos dados, que converte o sinal de um elemento biológico em um sinal elétrico quantificável (PATEL, 2002). Por exemplo, Thévenot et al (1999) definiram um biossensor eletroquímico como um dispositivo integrado independente, o qual é capaz de produzir um sinal analítico específico, quantitativo ou semiquantitativo, usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é imobilizado em contato direto com o elemento transdutor eletroquímico. Os autores recomendam que um biossensor não deve ser confundido com um sistema bioanalítico, uma vez que este requer um passo adicional no processo, como a adição de reagentes.

Cronologicamente, o primeiro biossensor foi um sensor enzimático desenvolvido por Clark e Lyons em 1962. Este sensor era utilizado com glucose oxidase na superfície de um eletrodo amperométrico de oxigênio e foi usado para quantificar diretamente glicose em amostras (CLARK and LYONS, 1962). Desde então, inúmeros sensores enzimáticos em diferentes configurações têm sido desenvolvidos.

### **1.5.1 Imunossensores**

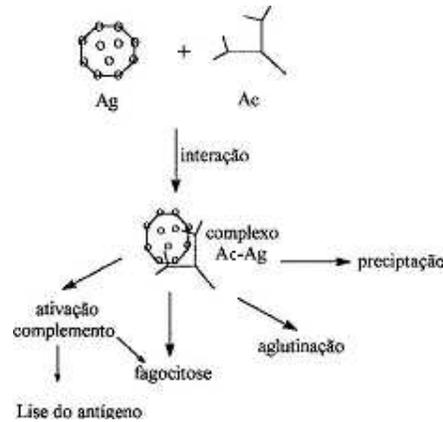
A seletividade do reconhecimento do analito pelo componente biológico ativo, aliada à sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos na área de biossensor catalítico (WOLFBEIS, 2000; ZHANG, *et al*, 2000). No entanto, a determinação de níveis de concentrações aceitáveis de compostos poluentes e de drogas ou hormônios, em química clínica, requer o desenvolvimento de metodologias confiáveis com detecção na ordem de  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Nesse caso, a tecnologia imunológica, que é baseada na habilidade do anticorpo (Ac) formar complexo com o correspondente antígeno (Ag) é essencial pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade (RICCARDI, *et al*, 2002).

O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado (SKLÁDAL, *et al*, 1997; MORGAN, *et al*, 1996).

#### **1.5.1.1 Princípio do imunoensaio**

Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominadas imunoglobulinas (Ig). São produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas denominadas imunógenos ou antígenos (RICCARDI, *et al*,

2002). Os antígenos (substâncias imunogênicas) são capazes de desencadear reações em cadeia, como apresentado na Figura 16, ativando linfócitos (glóbulos brancos) e a síntese de anticorpos específicos (sistema imune humoral) (GIL, *et al*, 1999).



**Figura 16.** Esquema simplificado de uma resposta imunológica (GIL, *et al*, 1999)

Ao desenvolver o imunossensor, há que se dispor do anticorpo adequado para a substância em questão. Alguns são disponíveis comercialmente, porém as rotas para a produção seguem esquema conhecido e têm sido descritas (GIL, *et al*, 1999; NARDI, *et al*, 1988).

No imunoensaio, o anticorpo combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixa massa molar que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico) formando um complexo, conforme a Equação 1. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade,  $K_A$ , definida pelas concentrações do complexo (AgAc), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2 (RICCARDI, *et al*, 2002).



$$K_A = \frac{[AcAg]}{[Ac][Ag]} \quad \text{Equação 2}$$

Os valores das constantes de afinidade entre  $10^4$  e  $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup> resultam na alta sensibilidade dos imunoenaios. Embora estudos para a determinação das constantes tenham sido realizados, na determinação do anticorpo, antígeno ou hapteno, freqüentemente o valor da constante não é diretamente empregado (RICCARDI, *et al*, 2002).

Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (sem qualquer marcador), porém grande parte dos imunoenaios lançam mão de marcadores (método indireto). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados e, então, são denominados conjugados.

Os primeiros imunoenaios empregavam marcadores radioativos, mas a restrição quanto ao emprego de radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo o ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), o mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas (RICCARDI, *et al*, 2002). A Tabela 3 apresenta alguns sistemas de detecção e respectivos marcadores utilizados em imunoenaios (GIL, *et al*, 1999).

**Tabela 3. Sistema de detecção e exemplos de marcadores.**

Sistema de Detecção	Exemplos de marcadores
Eletroquímicos	enzimas: <i>peroxidases, oxidases</i>
Radioativos	isótopos: <sup>125</sup> I, <sup>14</sup> C, <sup>3</sup> H
Piezoelétricos*	macromoléculas (Anticorpos)
Fluorimétricos	fluoresceína, quelatos de lantanídeos
Luminométricos	luminol, isoluminol, lucigenina, acridina

\* sistema de detecção direta, os demais são, na maioria, indiretos.

Os imunoenaios são classificados como homogêneos, quando para a detecção não se faz necessária a separação entre espécies marcadas e livres; heterogêneos quando se necessita, para a quantificação precisa, de uma etapa adicional para separação das frações livres e ligadas da espécie marcada (Ag ou Ac)(GIL, *et al*, 1999).

Dentre os diversos formatos de imunoenaios, os denominados competitivos e sanduíche têm sido os mais empregados. No ensaio competitivo, o antígeno marcado com enzima (Ag\*) e o antígeno livre (Ag) competem pela ligação com o anticorpo imobilizado, formando o complexo de acordo com a seguinte equação:



Após a competição pela quantidade restrita de Ac, o excesso de reagente é eliminado por lavagens sucessivas e o complexo formado é medido através do agente empregado como marcador. Neste ensaio imunológico, a grandeza de medida é inversamente proporcional à concentração de antígeno livre, apresentando alta sensibilidade. Alternativamente, o antígeno pode ser imobilizado e o anticorpo é conjugado com uma enzima (Ac\*).

O ensaio tipo sanduíche (heterogêneo não competitivo) pode ser realizado pela imobilização do Ac ou Ag em uma superfície sólida e, após a reação com o analito, adiciona-se um sistema para o monitoramento da reação Ag-Ac compreendido por um anti-analito conjugado a uma enzima. Ele proporciona, teoricamente, uma alta sensibilidade e especificidade, uma resposta linear para um intervalo de concentração considerável e um curto tempo de reação comparando-se com o ensaio competitivo.

Apesar da alta especificidade, o ensaio tipo sanduíche pode ocasionar um alto “background” e uma dependência de fatores de diluição. Contudo, a configuração depende do reconhecimento simultâneo de sítios de ligações distintos no analito e requer uma grande quantidade de anticorpos reagentes. Além disso, no caso de moléculas pequenas (por exemplo, resíduos de pesticidas ou seus produtos metabólicos), a ligação torna-se impossibilitada por impedimento estérico (RICCARDI, *et al*, 2002). A Figura 17 apresenta um esquema simplificado.

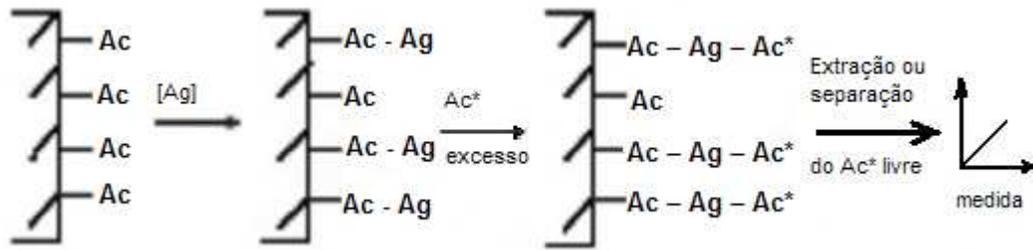


Figura 17: Esquema de imuno ensaio tipo sanduíche (GIL, *et al*, 1999)

### 1.5.1.2 Enzima-imunoensaios (EIAs)

Enzimas são os marcadores mais utilizados na atualidade, com as vantagens de não apresentarem riscos associados à exposição de radioisótopos, bem como a possibilidade de amplificação catalítica (uma única enzima pode gerar várias espécies detectáveis) e da associação com outros marcadores, como por exemplo, os quimiluminescentes e fluorescentes, resultando em ensaios de baixo limite de detecção (TSUJI, *et al*, 1989).

O exemplo significativo mais clássico de EIAs heterogêneos é o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Este método emprega anticorpos imobilizados em placa de poliestireno com número variável de ensaios (Figura 18).

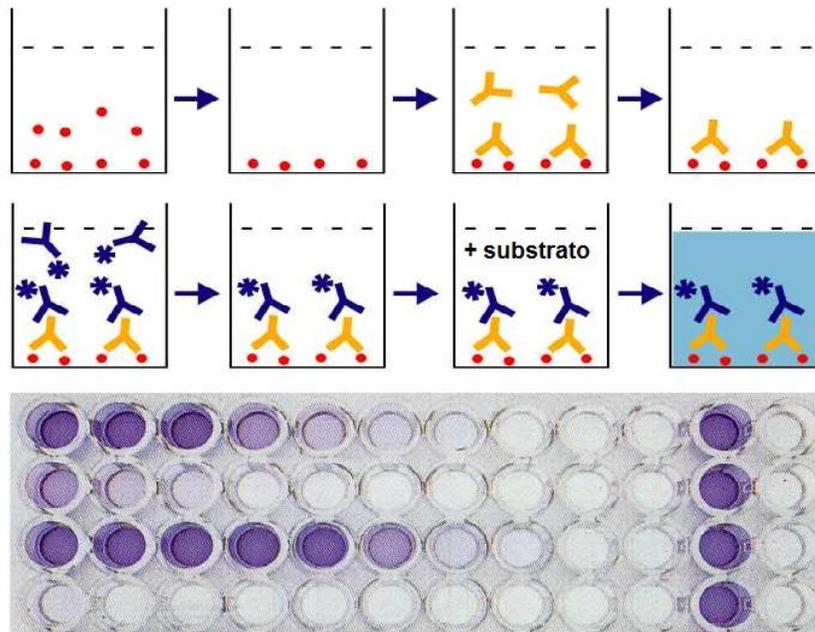


Figura 18: Kit para ensaio ELISA.

Este método é realizado em 8 etapas: 1- ativação da placa, 2- lavagem, 3- imobilização dos anticorpos, 4- lavagem, 5- incubação, 6 – lavagem, 7- adição do substrato cromogênico e 8- leitura óptica dos poços. Este sistema de placas possibilita a realização do ensaio de maneira que garanta a uniformidade de todas as etapas, tanto para as amostras quanto para as referências, condição essencial para a confiabilidade dos dados. Outro ponto a ser considerado é que devido à alta sensibilidade e rapidez do método, o mesmo é feito em micro escala, o que o torna bastante econômico dado à reduzida quantidade de reagentes utilizada.

O teste ELISA pode operar de forma competitiva ou não competitiva. Na versão competitiva, antígenos marcados com enzimas competem com antígenos livres (analito) por número limitado de anticorpos imobilizados. Depois do período de incubação (1 a 4 horas) a placa é lavada para remoção de espécies não ligadas. Em seguida, adiciona-se excesso de substrato e mede-se a atividade enzimática. Esta será inversamente proporcional à concentração do analito. Nesta tecnologia, a curva de calibração e a análise propriamente dita são feitas simultaneamente sob condições padronizadas (GIL, *et al*, 1999).

### **1.5.1.3 Aplicações de imunossensores**

Segundo NUNES *et al* (1998) o teste ELISA está sendo cada vez mais utilizado para a quantificação de pesticidas, como técnica complementar aos métodos cromatográficos tradicionais. Por apresentar alta seletividade e sensibilidade, os testes ELISA, baseados na reação entre antígeno e anticorpo, podem ser adequados à análise de contaminantes orgânicos em vários tipos de amostras.

Uma das vantagens é que os testes ELISA podem ser feitos *in situ* e para um grande número de amostras simultaneamente. Vários estudos mostram excelente correlação com resultados obtidos por cromatografia e por ELISA. Há necessidade de se avaliar a aplicabilidade do método para diversos tipos de amostras ambientais (DANKWARDT, *et al*, 1996).

Fatores como a presença de cátions e ânions, tempo de reação, pH e conteúdo de matéria orgânica podem ser responsáveis por efeito de matriz, interferindo em reações imunoquímicas. Em geral, o efeito de matriz produz diminuição da intensidade de coloração (absorbância), levando a resultados errôneos, uma vez que o desenvolvimento de coloração é inversamente proporcional à concentração do analito (TOSCANO, *et al*, 1998).

Em estudos de otimização de ensaios ELISA, não se pode deixar de considerar que em amostras de águas são encontrados vários compostos, especialmente matéria orgânica que, de alguma forma, influenciam na determinação do analito sendo, portanto, necessário um estudo de um procedimento de preparo das amostras.

Um exemplo do efeito de matriz é a tendência de superestimar a concentração do pesticida carbaril, possivelmente devido à adsorção do pesticida pelo material húmico. Este comportamento, particularmente em baixas concentrações do analito, pode ser resultado do efeito de matriz proveniente dos elevados teores de matéria orgânica, levando a resultados falso-positivos (DANKWARDT, *et al*, 1996; TOSCANO, *et al*, 1998). Pode-se dizer que este método se apresenta como um aliado aos métodos cromatográficos como um pré-teste (análise *in situ*). O teste ELISA é uma ferramenta analítica alternativa, pois as várias etapas envolvidas são compensadas pela grande quantidade de amostras que podem ser testadas simultaneamente.

Aga *et al* (1994) determinaram o herbicida alaclor (um dos herbicidas mais utilizados nos EUA com potencial carcinogênico) e seus metabólitos (que apresentam alta persistência e alta mobilidade no ambiente) em água por meio da extração em fase sólida (SPE) e imunoensaio (ELISA). Os resultados do teste ELISA foram comparados com cromatografia gasosa para o alaclor e com cromatografia líquida para os metabólitos (Ácido Etanosulfônico - ESA e Ácido Oxoacético - OXA). Segundo os autores, o teste ELISA pode ser aplicado na análise de resíduos no solo e água. Trata-se de uma técnica sensível, rápida e que pode ser conduzida em laboratório e no campo. Entretanto, em amostras

ambientais com matrizes complexas o teste foi limitado devido aos resultados falso-positivos.

Segundo Aga *et al* (1994), o acoplamento da extração em fase sólida com o teste ELISA pode ser aplicado para análises de traços de alaclor e seus metabolitos majoritários. A metodologia SPE foi um procedimento simples e elegante devido à retirada dos interferentes, concentração e separação do pesticida em uma única etapa. Além disso, também foi possível analisar um dos metabólitos (ESA) do alaclor devido a forte reatividade cruzada do ESA com anticorpo anti-alaclor. A metodologia foi viável para águas da superfície e subterrâneas, sendo que as análises podem ser comparadas às técnicas cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Por outro lado, devido ao fato do anticorpo anti-alaclor ter uma forte reatividade cruzada com um dos metabolitos, pode-se ter um falso-positivo para o alaclor.

Os pesticidas N-metilcarbamatos são amplamente utilizados na agricultura para o combate de um grande número de pestes e seus resíduos são encontrados em frutas e vegetais. Estes tornaram-se substituintes dos compostos organoclorados devido a sua grande eficiência como inseticidas e nematicidas, baixa toxicidade para mamíferos e baixo potencial de bioacumulação.

Foi estabelecido por vários países um programa de monitoramento do Limite Máximo de Resíduos permitido (LMR), e este controle depende em grande parte do número de análises. A técnica mais utilizada na determinação destes compostos é a CLAE, que requer uma instrumentação complexa de alto custo operacional e pessoal qualificado. Uma alternativa é o uso de imunoensaios que são simples, de baixo custo, portáteis, não requerem instrumentação sofisticada e são capazes de analisar um grande número de amostras simultaneamente. Entretanto, os imunoensaios não têm alcançado uma grande aceitação entre os químicos analíticos como um método alternativo ou complementar. Isto pode ser explicado pela falta de um rigoroso e compreensivo estudo de métodos de validação para alimentos.

Abad *et al* (1999) fizeram um estudo comparativo para determinação de carbaril, carbofuran e metiocarb (N-metilcarbamatos) em pepinos e morangos

baseados em anticorpos monoclonais. Foram utilizados três kits ELISA diferentes, com imunoreagentes específicos para cada composto estudado, os quais foram comparados com cromatografia líquida.

Os resultados comparativos entre ELISA e CLAE para os três pesticidas estudados mostraram ser muito similares. Os três testes ELISA se mostraram apropriados para análises quantitativas de carbaril, carbofuran e metiocarb em pepinos e morangos. Uma das principais vantagens do imunoensaio é a possibilidade da redução ou até mesmo a eliminação do pré-tratamento das amostras, sendo dependente do tipo de imunoensaio considerado e da complexidade da matriz da amostra, o que também foi avaliado neste trabalho. As amostras foram analisadas sem filtração e com partículas sólidas em suspensão. A comparação direta com os métodos de referência não foi possível devido ao fato da necessidade de extração antes da análise em CLAE. Entretanto, foi possível fazer uma comparação para o teste ELISA, de amostras purificadas e não purificadas, sendo que os resultados de recuperação e os desvios padrão para as amostras sem pré-tratamento foram apropriados.

A Tabela 4 apresenta algumas vantagens e desvantagens dos imunossensores.

**Tabela 4: Algumas vantagens e desvantagens na aplicação de imunossensores em química analítica.**

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boa especificidade, exatidão e precisão</li> <li>• Rápido, fácil de usar</li> <li>• Ampla aplicabilidade</li> <li>• Redução e até mesmo a eliminação do preparo de amostras (podendo ser aplicada no campo)</li> <li>• Análise simultânea de um grande número de amostras (redução do tempo de análise)</li> <li>• Redução no uso de solventes orgânicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntese de antígenos pode ser difícil</li> <li>• Desenvolvimento de alto custo</li> <li>• Kits tem tempo de equilíbrio lento</li> <li>• Kits não podem ser reutilizados</li> <li>• Não é apropriado para uma pequena quantidade de amostras</li> <li>• Determinações multi-resíduo</li> <li>• Pode ser vulnerável a interferências não específicas</li> <li>• Limitada disponibilidade de anticorpos</li> </ul>

## 1.5.2 Biossensores enzimáticos

Em um processo analítico, as enzimas são normalmente utilizadas para estimar substratos específicos e, dependendo do número de enzimas, este processo gera uma amplificação significativa na detecção de um substrato. Em análises de contaminantes de alimentos, a conversão catalítica do substrato e a dose de inibição de uma reação enzimática são determinantes importantes da concentração do contaminante. Biossensores enzimáticos utilizam enzimas específicas para a captura e geração catalítica do produto, o qual é então diretamente determinado usando vários tipos de transdutores (eletroquímico, óptico, fototérmico, amperométrico), conforme a Figura 19 (PATEL, 2002).

A grande variedade de reações em meios biológicos, associada à disponibilidade de vários transdutores, fornece grande variedade de opções frente ao desenvolvimento da química analítica. Assim deve-se fazer a escolha adequada do receptor biológico, do elemento transdutor e estabelecer as condições ótimas para a reação que se deseja estudar (RODRIGUES, 1998).

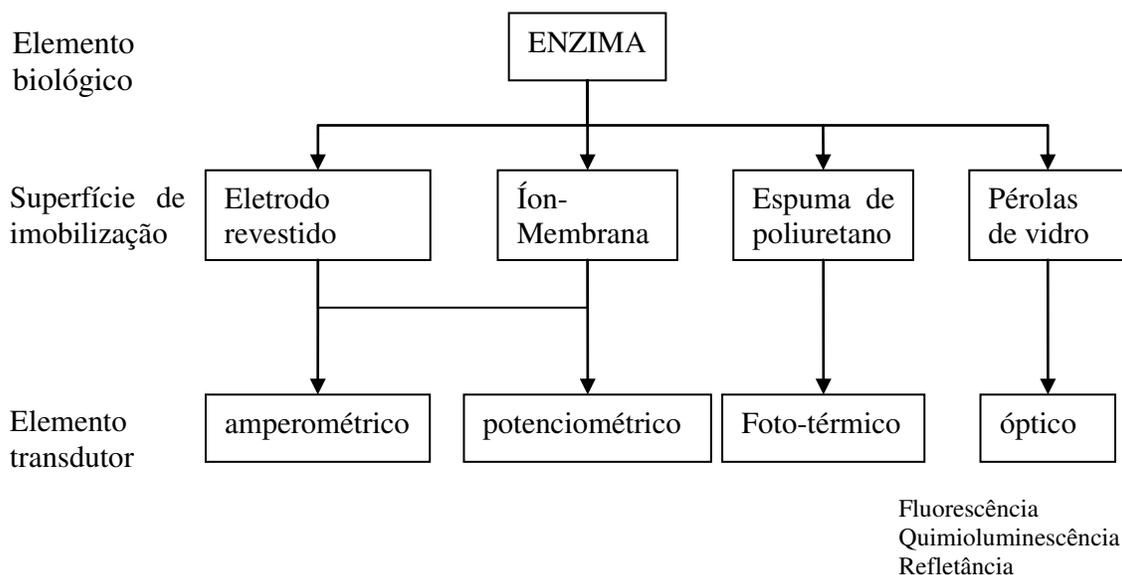


Figura 19: Aplicações de biossensores enzimáticos (PATEL, 2002)

Existe uma relativa variedade de trabalhos onde foram empregadas enzimas específicas para cada problema analítico. Como exemplo, no trabalho de Rosato *et al* (2001) foi feito um estudo para determinação de compostos fenólicos onde foram empregadas as enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase.

Devido à variedade e especificidade da aplicação de enzimas em análises químicas, nos restringiremos à discussão de enzimas para determinação de pesticidas de duas classes específicas, os organofosforados e carbamatos, pois o modo de ação dessas duas classes é baseado na inibição da colinesterase.

Dois tipos de colinesterases são conhecidas e tem sido usadas para a fabricação de biossensores: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). BuChE é uma molécula com estrutura similar à AChE mas é caracterizada por especificidade diferente do substrato: a AChE hidrolisa preferencialmente um acetil-éster como a acetilcolina, enquanto que a BuChE hidrolisa butirilcolina (HOSEA *et al*, 1995). Ivanov *et al* (2000) fez estudos comparativos entre biossensores eletroquímicos baseados em colinesterases (AChE e BuChE) para determinação de pesticidas. O baseado na AChE obteve menor limite de detecção. No presente trabalho, optamos por desenvolver um biossensor baseado na enzima acetilcolinesterase (AChE).

#### **1.5.2.1 Biossensores enzimáticos baseado na enzima acetilcolinesterase (AChE)**

Os pesticidas organofosforados e carbamatos são atualmente as classes de pesticidas mais empregados na agricultura, constituindo cerca de 57 % de todos os pesticidas usados no mundo.

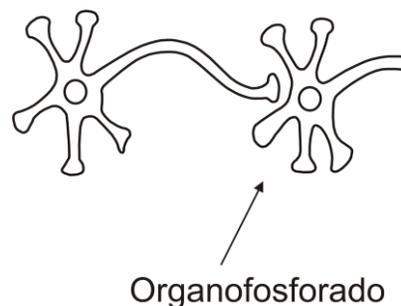
Os fosfatos orgânicos são também conhecidos como *anticolinesterases*, porque sua ação se deve ao bloqueio dos centros ativos da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma enzima comum a insetos e mamíferos, sendo altamente tóxicos ao homem (ALLINGER, *et al*, 1978).

Geralmente, os pesticidas não são substratos de enzimas, mas comportam-se como inibidores específicos. Conseqüentemente, sua detecção não é baseada

na catálise enzimática do pesticida, mas na sua capacidade específica de inibir a atividade da enzima. A enzima, alvo do pesticida, é usualmente bem conhecida, mas em muitos casos o uso analítico de enzimas é impossível ou impraticável.

A enzima AChE tem um importante papel fisiológico nos mecanismos de controle do sistema nervoso. No sistema nervoso, os impulsos nervosos são transmitidos através de células nervosas denominadas neurônios. O contato entre neurônios, assim como entre os neurônios e as células musculares ou células glandulares, são chamados de sinapse. Os impulsos nervosos se comunicam através da maioria das sinapses mediante transmissores químicos, que são pequenas moléculas difusíveis, como a acetilcolina (ACh) e a noradrenalina. A acetilcolina é também um transmissor nos terminais das placas motoras, que são uniões entre o nervo e o músculo estriado (STRYER, 1990; GUYTON, 1984).

A inibição da atividade da AChE na fenda sináptica, pelo emprego de substâncias inibidoras da enzima, pode levar ao bloqueio neuromuscular. Algumas substâncias, tais como a neostigmina e a fisotigmina, inativam a colinesterase de tal forma que ela, apesar de presente nas sinapses, não hidrolisa a acetilcolina liberada pela placa terminal. Como resultado, a quantidade de acetilcolina aumenta após impulsos nervosos sucessivos, de maneira que quantidades extremas podem atingir o músculo, causando uma despolarização maior e mais demorada na membrana sináptica. Tal fato pode provocar a morte devido a um espasmo da laringe capaz de asfixiar a pessoa. A Figura 20 mostra a região de ação de um dos compostos inibidores da acetilcolinesterase (GUYTON, 1984).



**Figura 20: Região de ação dos pesticidas organofosforados (adaptado de SANTOS, *et al*, 2007).**

Muitos inibidores assemelham-se ao substrato e ligam-se ao centro ativo da enzima, caracterizando a inibição enzimática que pode ser reversível ou irreversível, dependendo do tipo de complexo com a enzima.

Um inibidor reversível caracteriza-se por uma dissociação rápida do complexo enzima-inibidor, enquanto um inibidor irreversível caracteriza-se por dissociar-se muito lentamente da enzima. Os organofosforados são capazes de inibir irreversivelmente a AChE, bloqueando a serina do sítio ativo da enzima por um ataque nucleofílico, produzindo uma serina fosforilester, a qual é hidrolisada muito lentamente (RODRIGUES, 1998). A figura 21 apresenta esquema da inativação da enzima.

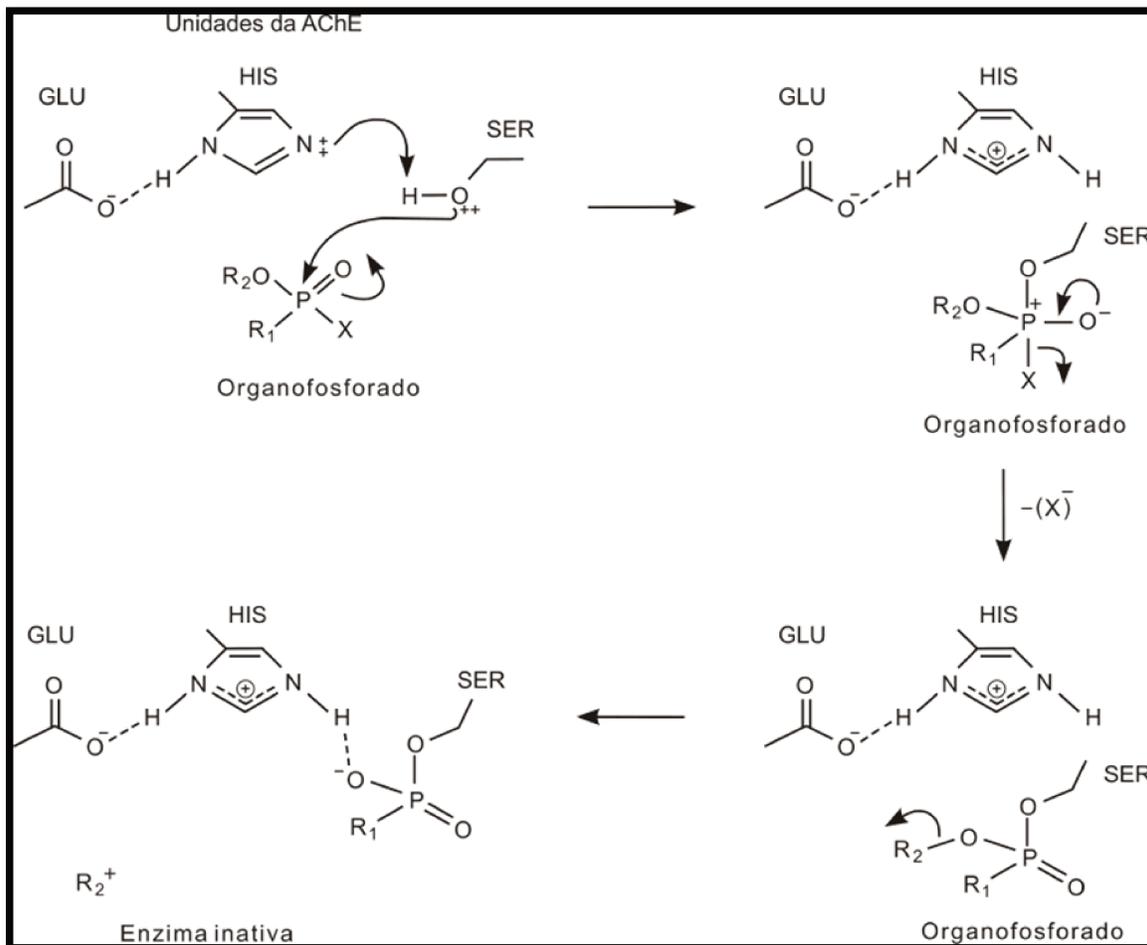


Figura 21. Esquema da inativação irreversível da enzima por organofosforado (SANTOS, *et al*, 2007)

Outra grande classe de pesticidas compreende os carbamatos, dos quais o carbaril é um exemplo (Figura 22). Sua síntese tem por base o  $\beta$ -naftol, que é condensado com fosgênio para formar o cloro-carbamato. O tratamento deste último com metil-amina produz o carbamato (ALLINGER, *et al*, 1978).

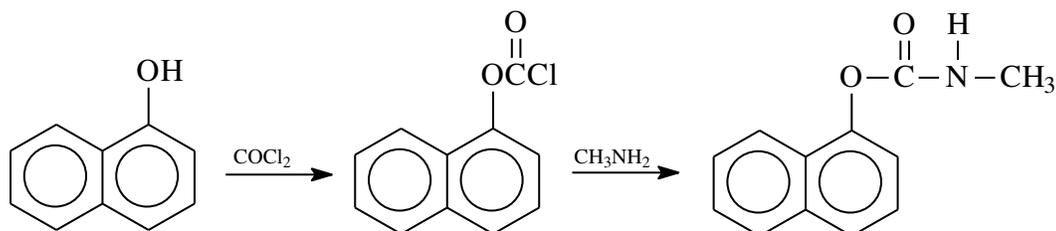


Figura 22. Síntese do carbaril.

O modo de ação dos inseticidas carbamatos é similar ao dos compostos organofosforados, exceto que, com estes compostos a AChE é carbanilada. A inibição produzida pelos carbamatos não costuma ser irreversível e normalmente é de duração curta (RODRIGUES, 1998). A Figura 23 apresenta um esquema da determinação da concentração de pesticidas.

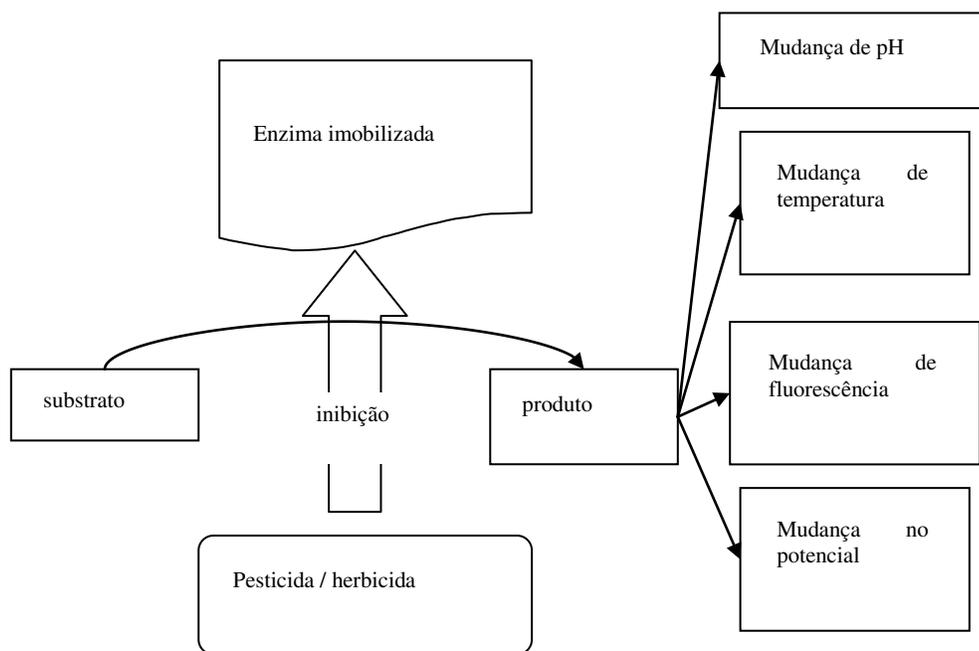
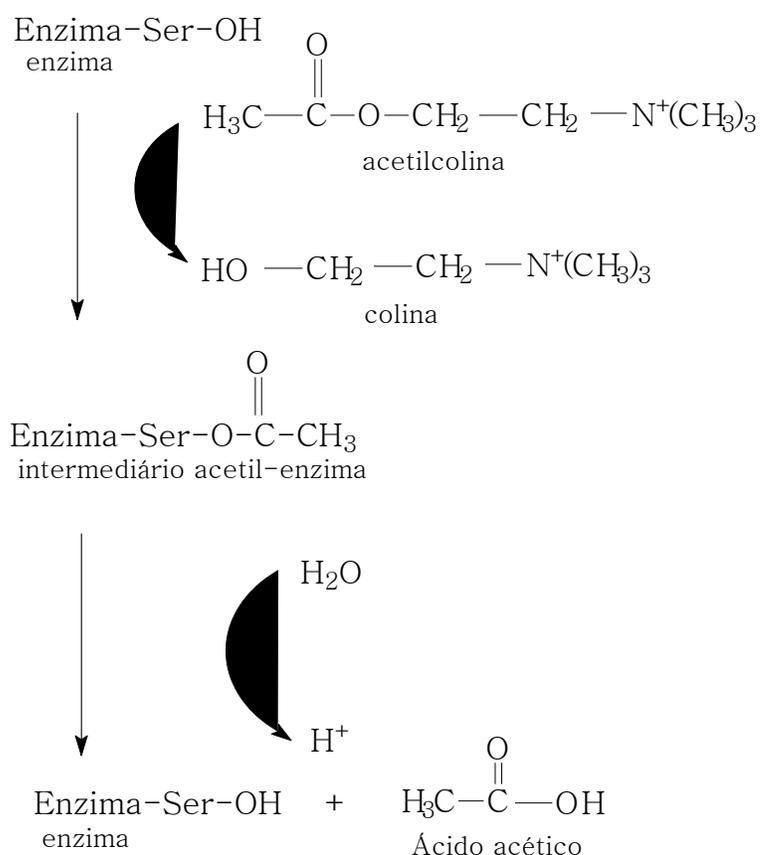


Figura 23. Diagrama esquemático da determinação de pesticidas (PATEL, 2002)

Quando a acetilcolinesterase (AChE) é usada como componente biológico, a hidrólise enzimática da acetilcolina (ACh) produz ácido acético e colina conforme a Figura 24. A acetilcolina reage com uma serina específica do centro ativo da AChE para formar um intermediário covalente acetil-enzima, ocorrendo assim, a liberação da colina. O intermediário acetil-enzima reage com água para formar acetato e regenerar a enzima livre o suficiente para iniciar uma onda de despolarização (STRYER, 1990). A atividade da enzima pode ser medida por detecção potenciométrica (ou por outro transdutor que seja capaz de medir esta variação) dos prótons formados pelo ácido acético produzido.



**Figura 24. Reação catalítica da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase (RODRIGUES, 1998)**

Em um biossensor, a AChE imobilizada é contactada com a superfície sensível a pH de um eletrodo (elemento transdutor). Depois de conectar a

“enzima-eletrodo” a um pHmetro, a reação enzimática pode ser monitorada. Um biossensor AChE é apropriado para varreduras de pesticidas em água potável pela detecção do efeito de inibição.

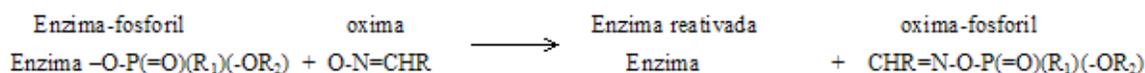
A inibição da AChE pelos pesticidas organofosforados ocorre pela ligação do grupo fosforil da molécula do pesticida ao radical serina no centro ativo da enzima (WONG *et al*, 2000).

Um dos grandes problemas para a aplicação prática da AChE é a inibição irreversível que ela sofre frente aos pesticidas organofosforados, limitando o reuso do biossensor.

Compostos organofosforados, incluindo os utilizados em envenenamento por gás neurotóxico, são absorvidos pelas vias epidérmica, digestiva e respiratória. No caso de intoxicação, o tratamento tem sido feito com drogas que são farmacologicamente antagônicas à acetilcolina. Como requisito terapêutico estas drogas devem reagir rapidamente com os gases neurotóxicos em determinados pH e temperaturas, reativando a enzima. Várias substâncias foram estudadas, e uma série de compostos reativadores da atividade da colinesterase foram indicadas para o tratamento quimioterapêutico nos casos de intoxicação por compostos organofosforados.

Dentre os compostos reativadores da atividade da colinesterase após a inibição enzimática por organofosforados estão algumas oximas, que são compostos nucleofílicos que removem o grupo fosforil ligado à serina do centro ativo da acetilcolinesterase (GULLA, *et al*, 2002). A Figura 25 apresenta um esquema de uma reativação.

A reativação da enzima inibida devido à formação do complexo covalente fosforil-enzima que é muito estável pelas oximas pode ser representado pelas equações da Figura 25.



**Figura 25: Reativação enzimática**

Alguns autores têm proposto a utilização de agentes nucleofílicos, tais como metiodeto de 2-piridinaldoxima ou (2-PAM) e [1,1'-trimetileno-bis (brometo de 4-formilpiridina) dioxima] ou (TMB-4).

Gulla *et al* (2002) fizeram um estudo da reativação da enzima AChE imobilizada em um biossensor amperométrico para determinação de pesticidas organofosforados. Foram utilizados dois compostos reativadores da enzima, [1,1'-trimetileno-bis (brometo de 4-formilpiridina) dioxima] (TMB-4) e metiliodeto de piridina 2-aldoxima (2-PAM), que são agentes nucleofílicos. No estudo, o agente TMB-4 apresentou ser mais eficiente, sendo que o mecanismo envolve fosforilação do reativado pela enzima fosforilada, liberando a enzima e permitindo assim um grande número de análises, uma vez que a enzima é reativada quase que instantaneamente e pode-se usar a mesma membrana com a enzima em muitas análises.

### **1.5.3 Imobilização enzimática**

O acoplamento do componente biológico ou bioquímico a um determinado material é conhecido como imobilização e pode ser feito de diferentes formas.

A imobilização de enzimas permitiu popularizar os métodos enzimáticos em química analítica, pois a reutilização das mesmas em muitas análises baixou o custo, possibilitou a monitoração contínua de processos químicos, permitiu o uso de vários transdutores, além de aumentar a repetibilidade e a reprodutibilidade do procedimento analítico (LIMA, *et al*, 1999).

A etapa de imobilização do material biológico na superfície sensora constitui uma das fases cruciais no desenvolvimento do biossensor, pois os sítios ativos da molécula devem ser preservados, a fim de não prejudicar a reação com a amostra de interesse.

A reação de imobilização fixa a enzima solúvel em água em uma matriz insolúvel em água. O resultado é uma diminuição artificial na mobilidade da enzima com a transição da catálise homogênea para heterogênea. Na escolha da

técnica de imobilização apropriada, é importante que a reação requerida para imobilização não diminua significativamente a atividade catalítica da enzima. A técnica de imobilização mais apropriada é aquela que tenha um produto estável, longa vida útil, seja rápida e utilize produtos baratos (ANDEESCU *et al*, 2002).

Além disso, a enzima imobilizada pode ser reutilizada e os procedimentos que as contêm podem ser operados continuamente e controlados eficientemente. A enzima imobilizada torna-se ainda menos susceptível à variação de temperatura, ao pH e à ação de ativadores e inibidores que atuam na enzima em solução.

Em relação à temperatura, as enzimas imobilizadas, de modo geral, apresentam incremento de sua termo estabilidade comparada com sua forma nativa. Este aumento é atribuído à rigidez da molécula protéica quando esta é imobilizada (FÁGÁIN, *et al*, 1991).

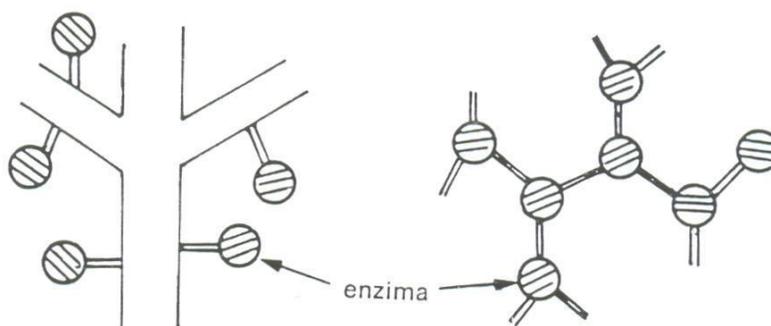
De modo geral, a imobilização promove um aumento do tempo de sobrevivência sobre condições denaturantes. As condições de pH e de temperatura necessárias à reação podem provocar a denaturação parcial ou total da molécula enzimática. Mas, uma vez realizada a imobilização, observa-se em muitos casos, que estas resistem melhor às variações de pH e temperatura (FÁGÁIN, *et al*, 1991)

Stein, *et al*, (1993) fez uma comparação entre métodos para o desenvolvimento de biossensores baseados na acetilcolinesterase. Os métodos de imobilização mais empregados na construção de biossensores têm sido adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada e inclusão, como segue na Tabela 5. A Figura 26 ilustra esses métodos.

**Tabela 5: Métodos de imobilização.**

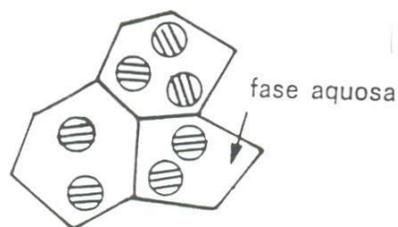
<b>Método</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
Adsorção em uma matriz insolúvel (forças de Van der Waals, ligação iônica)	Simples, condições Brandas	Algumas das enzimas são ligantes muito dependentes do pH, solvente e temperatura, insensibilidade
Ligação covalente em suporte ou matrizes insolúveis em água	Estabilidade do complexo suporte-enzima, uma vez que o material biológico é mantido em um ambiente semelhante ao que se encontra na natureza	Possibilidade de perda de atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais para a atividade biológica
Ligação covalente cruzada por um reagente bi ou multifuncional	Procedimento simples, fortes ligações químicas das biomoléculas	Dificuldade para controle da reação, requer grande quantidade de enzima, atividade da enzima relativamente baixa
Inclusão em gel (em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável)	Condições brandas	Perda da atividade da enzima por possibilidade de denaturação ou lixiviação devido aos poros dos polímeros

O processo de imobilização de uma enzima sobre um suporte pode influenciar ou até modificar as respostas do biossensor. Cada metodologia pode apresentar vantagens ou desvantagens, sendo que o melhor arranjo deve ser estudado e otimizado buscando um sensor que possa apresentar um sinal analítico expressivo, com reprodutibilidade e repetibilidade adequadas (MARQUES e YAMANAKA, 2008)

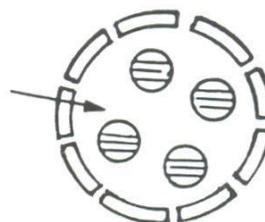


**Imobilização sobre suporte**  
**Adsorção ou Ligação covalente**

**Ligação covalente**  
**cruzada**



**Inclusão em matriz**



**Inclusão em microcápsula**

**Figura 26: Representação esquemática de formas de imobilização de enzimas (SCRIBAN, 1985)**

### **1.5.3.1 Aplicações de biossensores enzimáticos**

Vários trabalhos têm sido propostos utilizando biossensores enzimáticos com diferentes elementos transdutores, o que reflete a grande flexibilidade em se adequar a uma aplicação específica.

Os transdutores potenciométricos respondem gerando um sinal na superfície de um eletrodo devido a uma espécie produzida na reação entre o analito e o material biológico. A detecção eletroquímica é estudada pela medida da concentração de ácido acético formado, que é diretamente proporcional à concentração do pesticida presente. Andreescu *et al* (2002) fizeram a comparação entre três métodos de imobilização da enzima AChE em eletrodos para a determinação de pesticidas organofosforados, apresentando bons resultados quanto aos limites de detecção, reprodutibilidade e estabilidade, desde que estocados em condições apropriadas. Estes métodos foram de fácil operação e foi possível utilizar diferentes modos de imobilização. Uma das vantagens destes métodos é que os eletrodos podem ser facilmente miniaturizados e produzidos em larga escala, usando uma tecnologia relativamente barata.

Pogačnik *et al* (2001) fizeram um estudo da determinação de pesticidas organofosforados e carbamatos com FIA, baseado na inibição da enzima AChE de diferentes origens e da enzima BChE. A imobilização da enzima foi feita em pérolas de vidro de tamanho controlado. Foi feita a otimização do sistema testando várias condições com as diferentes enzimas, verificando-se que as variáveis inerentes ao sistema FIA, como por exemplo a vazão, influenciaram os limites de detecção. A observação mais importante, foi que, mantendo-se o mesmo pesticida e variando-se a enzima, obteve-se respostas diferentes com limites de detecção diferentes. Por outro lado, mantendo-se a mesma enzima e mudando os pesticidas os limites também foram afetados. A técnica apresenta-se como uma alternativa para a determinação destes pesticidas, porém é necessário otimizar várias variáveis que podem alterar o sinal analítico. Além disso, não foi feita uma avaliação em relação aos possíveis efeitos de matriz nos limites de detecção usando amostras reais, ou seja, matrizes um pouco mais complexas.

Na agricultura, os biossensores podem detectar e quantificar patógenos de plantas no campo, indicando posições geográficas, com o auxílio de sistema de posicionamento global (GPS) de modo que o produtor possa realizar aplicações de pesticidas nos pontos de maior necessidade, reduzindo e otimizando o uso de agroquímicos. Biossensores podem ser utilizados em diferentes etapas da cadeia

de produção de alimentos agrícolas, desde a detecção do patógeno no campo até o período de armazenamento de lotes de sementes (sob o risco de serem contaminados com fungos produtores de toxinas). Em vista desse potencial, os biossensores aplicados à agricultura têm sido estudados desde 1992 (SCOTTRUPP, *et al*, 2008).

Nunes *et al* (2004), fizeram um estudo comparativo entre diferentes metodologias de imobilização da enzima acetilcolinesterase em eletrodos de grafite, com ligação covalente cruzada e reagente bifuncional glutaraldeído na presença de soro albumina bovina e álcool polivinílico. As técnicas utilizadas para avaliação e detecção de pesticidas n-metil carbamatos foram a cromo-amperometria e a coulometria. A imobilização de AChe com glutaraldeído apresentou maior reprodutibilidade e robustez.

Guerrieri e Palmisano (2001) utilizaram um biossensor bi-enzimático como detector de um sistema cromatográfico, imobilizando acetilcolinesterase e colina oxidase em eletrodo de platina, por “crosslink” com glutaraldeído, constituindo uma nova alternativa aos detectores cromatográficos e possível aplicação destes sensores em cromatografia.

Pode-se concluir que os biossensores enzimáticos apresentam a vantagem de várias configurações, se adequando às várias necessidades. São compactos, têm custo relativo baixo, apresentam bom limite de detecção e boas repetibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, em grande parte dos trabalhos consultados não foi feito um estudo em matrizes complexas, não havendo portanto referência aos possíveis efeitos de matriz e possíveis modos de contornar esses problemas. Outra possível limitação é que a AChe pode ser inibida por outras neurotoxinas, dando falsos positivos.



## 2 Objetivos

O objetivo deste trabalho é propor um método de varredura que permita a determinação de pesticidas organofosforados, que são uma das classes mais utilizadas hoje em dia, por meio de um sistema com biossensor enzimático baseado na enzima acetilcolinesterase acoplado à técnica de análise por injeção em fluxo (FIA). Este é um método seletivo para esta classe de pesticidas com relativa simplicidade na instrumentação, havendo a possibilidade de automação do processo analítico, economia de reagentes e de amostras, não sendo necessário pré-tratamento laborioso. O procedimento é rápido e de baixo custo, se comparado às técnicas geralmente utilizadas, como a cromatografia.



## 3 Parte experimental

### 3.1 Equipamentos e reagentes

#### 3.1.1 Equipamentos

Espectrofotômetro Micronal B-328

Bomba peristáltica Gilson Minipuls-3

Registrador Linear Modelo LR92425

Tubos Tygon Ismatec

Balança analítica Shimadzu AX 200

Banho termostático Lauda RC6

Membrana de PTFE 470/83 DIN DVGW 81.01e133 0,10 mm

Válvula de introdução de amostra, construída nas oficinas do IQ

Célula de permeação, construída nas oficinas do IQ

#### 3.1.2 Reagentes

Cal sodada granulada (com indicador) Vetec

1,1'-trimethylene-bis(4-formyl-pyridinium bromide) dioxine – (TMB-4) Sigma

Enzima acetilcolinesterase *electrophorus eectricus* Fluka

Glutaraldeído 25% em água, Nuclear

Cloreto de acetilcolina 99%, Acros Organics

3-aminopropyl-triethoxysilane 99%, Acros Organics

Malathion 98%, Chem Service

Chlorpyrifos 98%, Chem Service

Methyl Paration 99,5%, Supelco

Dichlorvos 99,5%, Chem Service

Púrpura de bromocresol, Vetec

Acetona PA, Synth

Xileno PA, Carlo Erba

Álcool etílico absoluto PA, Synth

Ácido Sulfúrico, PA Synth

Ácido Nítrico PA, Synth

Fosfato de Sódio monohidratado, Nuclear

Fosfato de Potássio monobásico, Nuclear

Água de bromo, 20 mmol L<sup>-1</sup>

Pérolas de vidro com porosidade controlada (CPG), 240, 80-120 mesh, porosidade 22,6 mesh, Sigma Chemical

### **3.2 Preparação da solução tampão fosfato de Sörensen (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)**

A solução tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi preparada pesando-se 11,876 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que foi dissolvido em água deionizada, previamente fervida e resfriada, até completar o volume de 1 L em balão volumétrico. Outra solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foi preparada deixando-se o sal secar em estufa a 110<sup>0</sup>C – 115<sup>0</sup>C por 1 hora. Após resfriar em dessecador, pesou-se 9,078 g e dissolveu-se em água deionizada previamente fervida e resfriada, para eliminar todo o possível gás carbônico. Dissolveu-se em água e avolumou-se em balão volumétrico de 1 L. Para o pH de 7,50, a proporção das soluções (v / v) foi de 8,3 / 1,7 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. As duas soluções foram misturadas e o pH da solução final foi corrigido quando necessário (pHmetro – eletrodo de vidro conjugado), utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 % (m / v), gota a gota. Para evitar que na solução formassem fungos, armazenou-se a mesma em geladeira. Antes de ser usada era deixada em repouso para atingir o equilíbrio térmico com o ambiente.

### **3.3 Preparação da solução de cloreto de acetilcolina**

A solução  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em tampão fosfato de pH 7,00 pesando-se 0,0454 g, dissolvendo e completando-se o volume em balão volumétrico de 50 mL. Devido à hidrólise do cloreto de acetilcolina, uma nova solução era preparada a cada dia de trabalho.

### **3.4 Preparação da solução de TMB-4**

A solução de concentração  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pesando-se 0,0223 g e avolumando-se em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato pH 7,00 de concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Uma nova solução era prepara a cada dia de trabalho.

### **3.5 Preparação da solução de púrpura de bromocresol (PBC)**

Foi preparada uma solução de concentração  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Pesou-se 0,27 g de PBC e dissolveu-se em 10 mL de etanol. Avolumou-se em balão volumétrico de 500 mL com água destilada. Desta solução estoque de concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pipetou-se 25 mL e diluiu-se novamente em balão volumétrico de 500 mL com água destilada, sempre previamente fervida e resfriada para eliminar todo gás carbônico dissolvido. Esta solução apresentava coloração amarela que foi ajustada para o pH 7,00 com NaOH ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), gota a gota, tornado-se púrpura. Para evitar alteração na coloração da solução, foi utilizado um frasco de vidro transparente arrolhado e vedado para a sucção e respiro da mesma. Na rolha foi transpassado um tubo de vidro conectado a um filtro com cal sodada granulada com indicador, de modo a impedir a entrada de gás carbônico do ar (Figura 27).

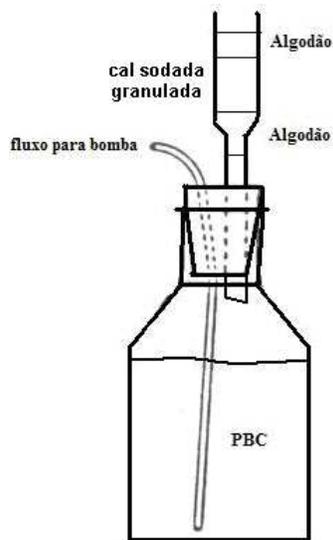


Figura 27. Frasco transparente para solução PBC com filtro.

### 3.6 Preparação das soluções dos pesticidas estudados

Soluções estoque – preparadas por dissolução de adequada quantidade dos padrões (ChemService, EUA, pureza > 98%) em certo volume de acetona, de modo a perfazer concentração final de  $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ;

Soluções de trabalho dos pesticidas – preparadas por diluição da solução estoque, em volumes variados com água deionizada, de modo a perfazer diferentes concentrações ( $10^{-3}$  a  $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Soluções de pesticidas oxidados – preparadas pela adição de 1 mL de água de bromo  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em balões volumétricos de 5 mL.

As amostras de suco de laranja foram preparadas por diluição da solução estoque, em volumes variados em suco de laranja *in natura*, de modo a perfazer diferentes concentrações. As amostras foram filtradas e fez-se a adição de 1 mL da água de bromo  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em balão volumétrico de 5 mL.

### 3.7 Imobilização da enzima

Existem vários métodos para obtenção do reator enzimático empregando materiais diferentes, mas com base na literatura e em trabalhos anteriores realizados no grupo, optou-se em utilizar pérolas de vidro com porosidade controlada (CPG).

A primeira etapa da silanização é o ancoramento de grupos funcionais (grupos amino) nas pérolas de vidro. O reagente empregado nesta etapa foi o 3-aminopropiltriétoxissilano. Na segunda etapa, a ativação, o reagente bifuncional glutaraldeído reage com os grupos amino formando as bases de "Schiff". A terceira etapa, imobilização da enzima acetilcolinesterase, compreende a reação entre os grupos amino da enzima com o grupo aldeído livre na sílica das pérolas de vidro. Há informações variadas na literatura sobre o procedimento de imobilização de enzimas em sílica nas pérolas de vidro de porosidade controlada. Um esquema das etapas envolvidas na imobilização pode ser visto na Figura 28.

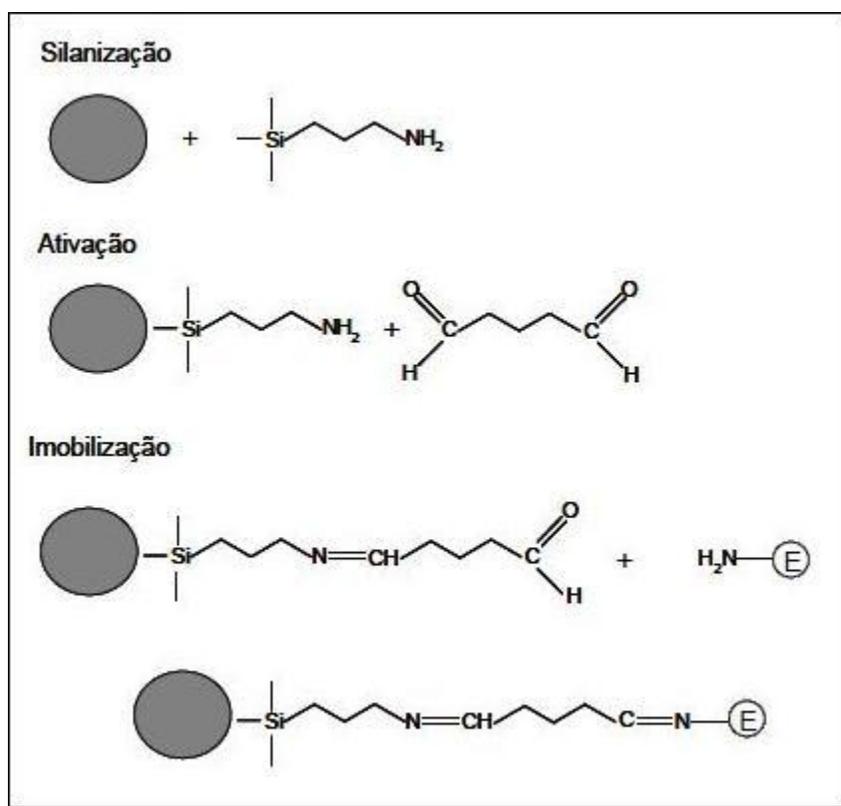


Figura 28. Etapas envolvidas na imobilização enzimática (LEITE, 2005)

### 3.7.1 Imobilização nas esferas de vidro em meio aquoso

A imobilização foi baseada no método apresentado por Leon-Gonzales e Townshend (Leon-Gonzales e Townshend, 1990).

Pesou-se 0,2 g das esferas de vidro e fez-se a limpeza com a adição de 10 mL de uma solução de ácido nítrico a 5 % (v/v) levando-se à fervura por 30 minutos, com cuidadosa e constante agitação, para não danificá-las. Filtrou-se em funil de vidro de placa porosa com bomba de vácuo e lavou-se três vezes com água destilada. Levou-se a estufa a 95<sup>o</sup> C por 1 hora para completa secagem.

Para a silanização das esferas de vidro, preparou-se uma solução de 1,0 mL de 3-aminopropiltrietoxisilano e 9,0 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 3,5 com ácido clorídrico 1,0 mol L<sup>-1</sup>, gota a gota. Nessa solução, foram adicionadas as esferas de vidro. Aqueceu-se a 75<sup>o</sup> C em banho maria por 2 horas e meia, com cuidadosa agitação manual a cada 15 minutos, para facilitar a reação de silanização das esferas. Após essa etapa, as esferas foram filtradas, lavadas e secas a temperatura ambiente.

Preparou-se uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v), pela adição de 2,5 mL de solução glutaraldeído 50 % em balão volumétrico de 50 mL e avolumou-se com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,00. Colocou-se, então, as esferas de vidro ativadas pela aminoalquilação para acoplamento com o glutaraldeído. A reação prosseguiu por 30 minutos à temperatura ambiente com constante e cuidadosa agitação manual. As esferas de vidro ativadas foram filtradas e lavadas com água deionizada. O desenvolvimento da cor salmão era sinal do sucesso da reação; contudo, em meio aquoso a reação muitas vezes ao final apresentava uma cor salmão clara, sendo necessário repetir todo o procedimento. Este problema nos levou a realizar a reação em solvente orgânico (xileno), o que se mostrou muito mais eficiente.

### **3.7.2 Imobilização nas esferas de vidro em meio orgânico**

A imobilização nas esferas de vidro em solvente orgânico foi baseada no método apresentado por Zaitsev, (1991), com algumas modificações. Pesou-se 0,2 g das esferas de vidro e fez-se a limpeza com ácido nítrico, como já descrito no item 3.7.1. Para a reação de silanização, foi preparada uma solução em balão volumétrico de 20 mL com a adição 1,0 mL de 3-aminopropiltriétoxissilano, avolumando-se com xileno. Essa solução foi adicionada sobre as esferas de vidro lavadas e secas. Aqueceu-se por 3 horas a 100 °C sob refluxo e com cuidadosa agitação. Na seqüência, lavaram-se as esferas de vidro com xileno, etanol e água deionizada, nesta ordem, empregando funil de vidro com placa porosa com auxílio de bomba de vácuo. Secou-se em temperatura ambiente. Em meio orgânico, sempre observou-se o desenvolvimento da cor salmão intenso como indicativo do sucesso de todas etapas da reação.

A segunda etapa, a ativação com o agente bifuncional glutaraldeído, não sofreu modificação e foi realizada como descrito no item 3.7.1.

### **3.7.3 Imobilização da enzima nas esferas de vidro**

Para a imobilização pesou-se 2,3 mg de acetilcolinesterase (1,0 mg – 425 U), obtendo-se 1000 U. Dissolveu-se em 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,00 resfriado a 4<sup>o</sup> C. Essa solução foi adicionada sobre as esferas de vidro e deixada em repouso por 12 horas, a 4<sup>o</sup>C. Posteriormente, lavou-se com tampão fosfato e água deionizada. A enzima foi estocada em tampão fosfato em geladeira a 4<sup>o</sup> C, para uso posterior.

### 3.8 Construção da coluna enzimática

A coluna enzimática foi construída pelo empacotamento em tubos de Tygon® de 10,0 mm de diâmetro externo por 3,0 mm diâmetro interno e comprimento de 1,0 cm das esferas de vidro contendo a enzima imobilizada. Nas extremidades colocou-se lã de vidro e tubos de diâmetros menores para impedir a saída da lã de vidro e das esferas (Figura 29).

A coluna montada foi estocada imersa em tampão fosfato pH 7,00 e mantida na geladeira a aproximadamente 4<sup>o</sup> C, para preservar a atividade enzimática da coluna.



Figura 29. Figura do reator enzimático empregado com a enzima imobilizada em esferas de vidro: 1- Tubo de tygon; 2- Lã de vidro; 3- Tubo de tygon com esferas de vidro com a enzima imobilizada.

### 3.9 Método

A capacidade dos pesticidas organofosforados para provocar a inibição da enzima acetilcolinesterase foi utilizada como aplicação analítica no sistema de injeção em fluxo (FIA), acoplado a um biossensor.

O método baseia-se na medida da concentração do ácido acético, formado pela passagem de solução de cloreto de acetilcolina (substrato), através de um reator enzimático contendo a enzima acetilcolinesterase imobilizada em esferas de vidro, antes e depois da passagem da solução dos pesticidas organofosforados estudados, que causam a inibição enzimática. Determina-se a diminuição da produção de ácido acético devido à inibição da enzima. O ácido acético formado permeia através de uma membrana de PTFE para uma solução aquosa de

púrpura de bromocresol (PBC;  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) provocando a mudança da cor do indicador de púrpura ( $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$ ) para amarelo ( $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ ). A variação de absorvância do indicador foi detectada espectrofotometricamente a 590 nm. O 1,1'-trimetileno-bis (4-brometo de formilpiridina) dioxima, TMB-4, foi usado como regenerador enzimático.

### 3.10 Sistema de análise por injeção em fluxo

O esquema do sistema de análise em fluxo que foi usado é mostrado na Figura 30. Foram utilizados bomba peristáltica, tubos de tygon, tubos de polietileno, espectrofotômetro e registrador potenciométrico. A válvula introdutora de amostra, construída em laboratório, foi previamente descrita por Tubino e Barros (TUBINO e BARROS, 1991).

A amostra de cloreto de acetilcolina (substrato) era introduzida no sistema por uma válvula de introdução da amostra (V) e conduzida por um carregador, tampão fosfato  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,5), pela linha ( $F_1$ ), utilizando-se uma bomba peristáltica (P) com vazão constante de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  (todas as vazões eram constantes e iguais,  $F_1 = F_2 = F_3$ ). Substrato passava através do reator enzimático (RE), um tubo de polietileno onde empacotou-se a enzima imobilizada nas esferas de vidro, e ocorria a reação da enzima com o substrato produzindo ácido acético. Na seqüência, a solução era misturada com uma solução de ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  que passava continuamente pela linha  $F_2$ , e sua função era provocar a liberação do ácido acético. A solução resultante passava por uma cela de permeação (CP) contendo uma membrana de PTFE, permeando apenas o ácido volátil. O ácido acético permeado entrava em contato com a solução de púrpura de bromocresol  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , que fluía no sistema pela linha  $F_3$ . Ocorria então a mudança na cor do indicador de púrpura para amarelo, sendo esta alteração detectada pelo espectrofotômetro (Spectro). Os pesticidas analisados e o regenerador, TMB-4 entravam na linha  $F_1$  ao serem injetados pela válvula de injeção (V).

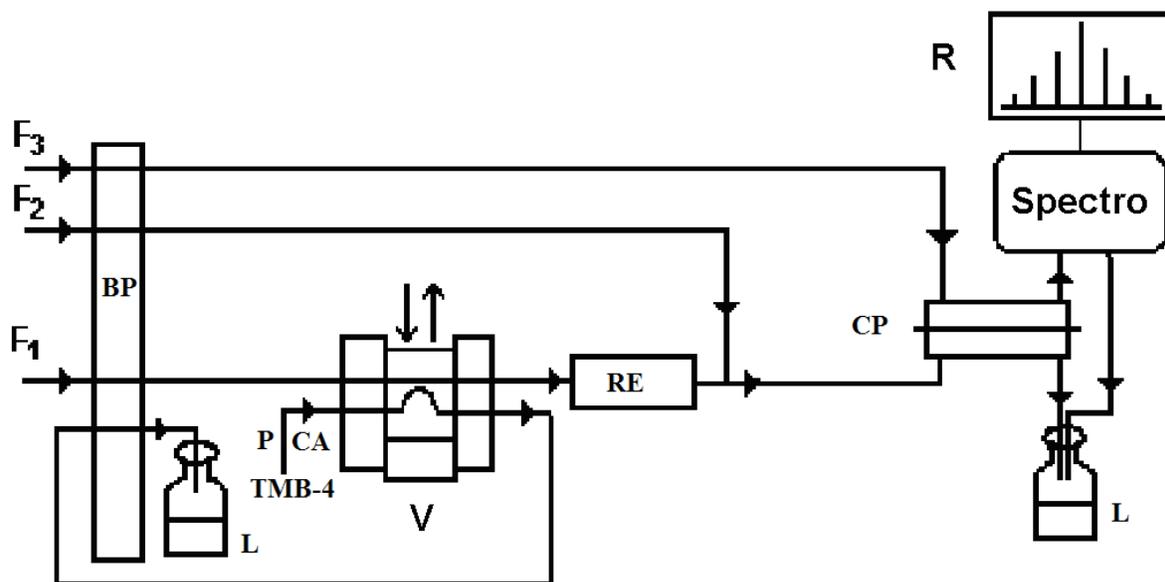
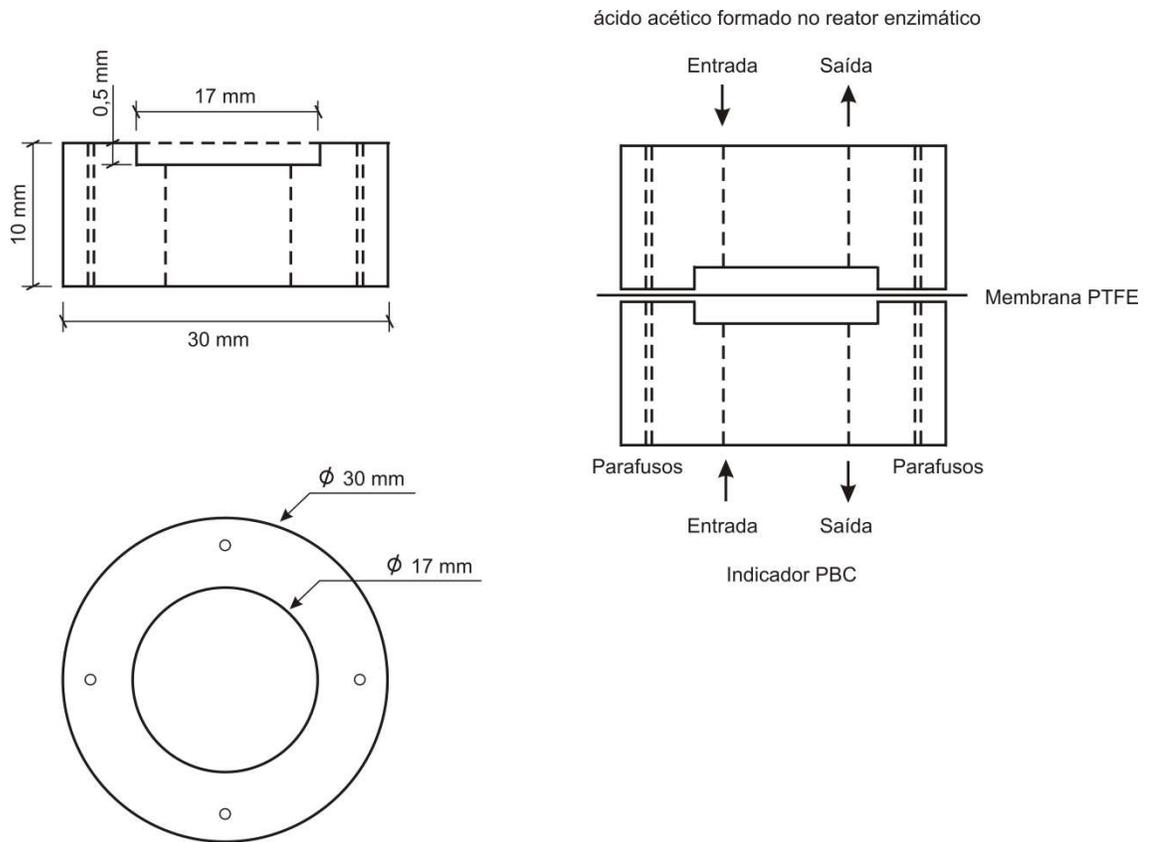


Figura 30. Diagrama esquemático do sistema FIA:  $F_1$  = Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH = 7,5;  $F_2$  = Ácido Sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $F_3$  = PBC  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pH = 7,00,  $F_1 = F_2 = F_3 = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; BP = bomba peristáltica; RE = reator enzimático; V = válvula de injeção; CP = cela de permeação; CA = cloreto de acetilcolina  $5,0 \times 10^{-3}$ ; TMB-4 = solução do regenerador enzimático =  $5,0 \times 10^{-3}$ ; P = soluções dos pesticidas estudados; L = lixo; Spectro = espectrofotômetro  $\lambda = 590 \text{ nm}$ ; R = registrador.

### 3.11 Células de permeação gasosa

Foram feitas duas células de acrílico, a primeira, mostrada na Figura 31, consistia de duas peças idênticas com formato cilíndrico de 30 mm de diâmetro e 10 mm de altura. Internamente elas têm uma cavidade de 17 mm de diâmetro e 0,5 mm de profundidade, sendo atravessadas por dois furos que permitiam o fluxo da solução. Essas peças encaixam-se e fixam-se por meio de parafusos. Uma membrana é colocada entre as duas peças de modo a permitir apenas a passagem da substância volátil, no caso o ácido acético, com volume de  $133,4 \text{ mm}^3$ . Esta cela de permeação foi construída de modo a permitir testes visuais. No entanto, como o limite de detecção não foi suficientemente baixo, a idéia foi posta de lado.



**Figura 31. Célula de permeação gasosa redonda, vista lateral e frontal e as duas peças encaixadas**

A segunda cela de permeação está esquematizada na Figura 32 por uma de suas metades. Ela consiste de duas peças em formato de paralelepípedo, que se encaixam com parafusos, sendo separadas pela membrana de PTFE. As duas peças são iguais, apresentando as seguintes dimensões: comprimento 140 mm, largura 10 mm e altura 15 mm. A cavidade interna tem comprimento de 110 mm, largura de 5 mm e altura de 0,5 mm, com volume interno de 275 mm<sup>3</sup>.

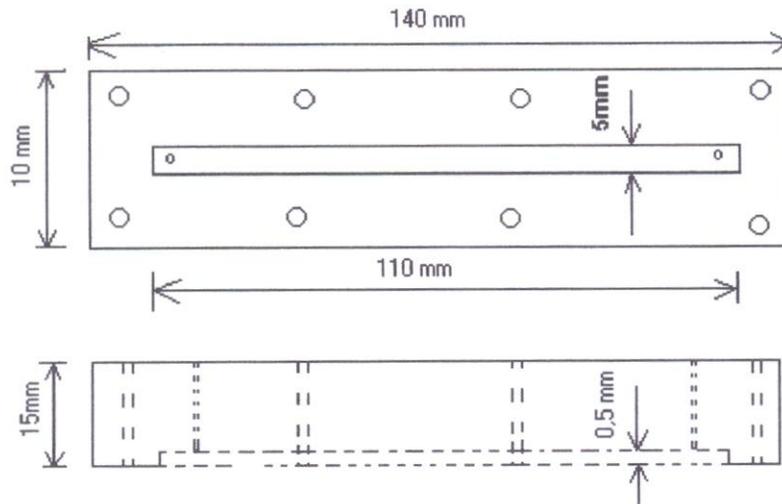


Figura 32. Cella de permeação retangular, vista frontal e lateral de uma das peças.

### 3.12 Método de preparação da membrana de silicona

A membrana foi preparada de acordo com a técnica apresentada por Windmoller (1991).

Dissolveu-se adesivo de silicone (comercial, Tigre) em tolueno na proporção em massa de 1,0: 1,4. Fez-se uma agitação mecânica para homogeneização seguida de centrifugação para remoção de bolhas gasosas. Essa solução foi colocada em uma placa de vidro recoberta com um filme plástico. Utilizou-se um fio de níquel-cromo de 0,4 mm como limitante de espessura e puxa-se a silicona depositada na placa de vidro com um bastão de vidro de modo a espalhar por toda superfície formando o filme. Após um período de 24 horas, retira-se o filme formado guardando-se entre duas folhas de papel seda. A membrana formada é então cortada no tamanho adequado da célula de permeação.

## 4 Resultados e discussões

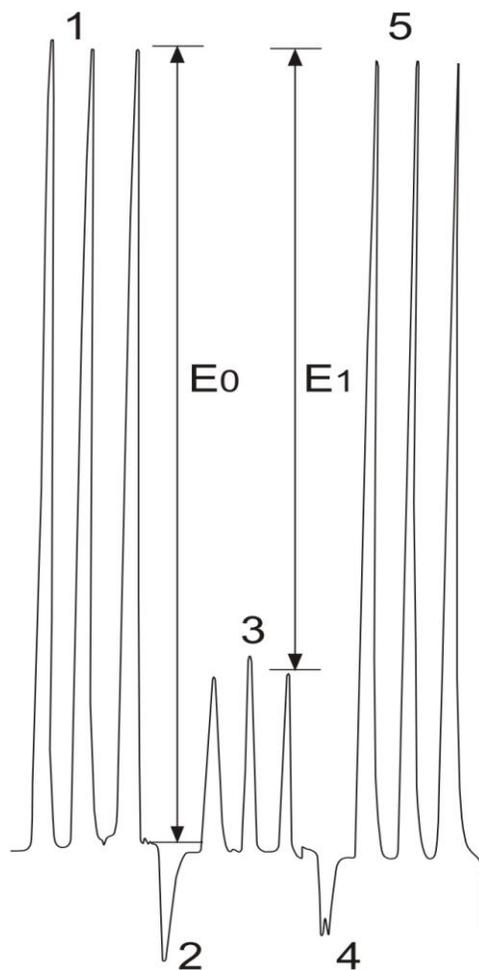
### 4.1 Introdução

O método para determinação dos pesticidas organofosforados clorpirifos, diclorvos, metil paration e malation é indireto. O método é baseado na reação enzimática, entre o substrato e a enzima acetilcolinesterase imobilizada em esferas de vidro, que gera ácido acético. O ácido acético formado, ao entrar em contato com a solução de ácido sulfúrico tem a sua difusão incrementada através da membrana de PTFE. Ao entrar em contato com o indicador ácido-base causa a sua protonação com conseqüente mudança da cor púrpura para amarelo. É necessário que o produto da reação enzimática seja acidificada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  para diminuir o pH do meio, permitindo dessa forma que todo o ácido acético esteja na forma não ionizada (molecular protonada) e não na forma de acetato. A confluência que mistura o tampão fosfato contendo o ácido acético formado com o ácido sulfúrico é colocado após a coluna enzimática, de forma que o ácido não passe pelo reator, pois causaria a imediata denaturação da enzima. A concentração da forma protonada do indicador é proporcional à concentração do ácido acético formado, e, de acordo com a quantidade que é permeada, temos o sinal analítico.

Fazendo-se a injeção do pesticida ocorre a inibição da enzima, cuja extensão depende do pesticida e da sua concentração. Em seguida, uma nova alíquota de substrato é introduzida no sistema e de acordo com o grau de inibição temos um novo sinal analítico. A diferença entre a altura de pico antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida para uma determinada concentração pode ser utilizada para determiná-lo quantitativamente. Na Figura 33 a seguir, temos o diagrama ilustrando o processo.

Para reutilização da coluna enzimática para a próxima determinação do pesticida, a enzima inibida é reativada com o reativador enzimático TMB-4 em solução aquosa. A reativação da enzima é rápida e completa dentro das condições experimentais usadas.

A reação enzimática deve ser realizada em meio tamponado ( $\text{pH} = 7,5$ ), pois é o pH em que a enzima possui a maior atividade.



**Figura 33:** Fiograma representando a determinação de um pesticida inibidor da enzima acetilcolinesterase: (1) sinais em triplicata do substrato na concentração de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (2) sinal da solução de um pesticida organofosforado; (3) sinais em triplicata do substrato após a inibição enzimática; (4) sinal do regenerador enzimático TMB-4; (5) sinais em triplicata do substrato após a regeneração enzimática.

Os picos 2 e 4 representam respectivamente o momento de introdução do pesticida organofosforado e do regenerador enzimático, que não são compostos voláteis e portanto não deveriam apresentar nenhum tipo de sinal. Neste caso, o sinal deve-se provavelmente a outras espécies que permearam pela membrana e que se encontravam dissolvidas na solução do indicador causando acréscimo do pH com conseqüente aumento da cor púrpura, como por exemplo o  $\text{CO}_2$ .

A porcentagem de inibição pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{inibição (\%)} = \frac{E_1}{E_0} \times 100$$

Onde  $E_1$  representa a diferença entre os picos referentes a enzima não inibida e inibidos.  $E_0$  representa o pico obtido com a enzima não inibida, como pode ser visto na Figura 33.

A primeira parte do trabalho consistiu em realizar ensaios para estabelecer as condições mais adequadas para o melhor desempenho do sistema, como: vazão do sistema, temperatura de trabalho da coluna enzimática, pH do meio, volume de injeção, concentração do ácido sulfúrico e concentração do substrato. Estas condições foram mantidas para todos os pesticidas estudados. Foi determinado também o tempo de vida da coluna enzimática.

Inicialmente, foram feitos testes para se estabelecer o limite de detecção dos pesticidas estudados com o objetivo de ser uma técnica semi-quantitativa para identificar amostras com resíduo de pesticidas. Nos primeiros testes, a faixa foi da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, dependendo do composto. Entretanto, fazendo a oxidação dos pesticidas com água de bromo a sensibilidade da técnica aumentou significativamente para todos os pesticidas estudados. Este fato está relacionado ao maior poder de inibição enzimática das espécies formadas, após a reação com água de bromo. Os metabólitos formados devido à oxidação são compostos que provavelmente apresentam maior toxicidade do que os compostos originais.

Foram feitos testes com outros compostos oxidantes como iodo (tintura de iodo) e cloro (hipoclorito de sódio). Nestes casos, também se observou diminuição nos níveis de detecção. Entretanto, a regeneração enzimática após a passagem dos pesticidas com os oxidantes estudados não foi satisfatória, indicando, pela perda da atividade, um certo grau de denaturação enzimática, fato que não ocorreu com a água de bromo.

O método foi testado com suco de laranja *in natura*, pela adição do pesticida obtendo-se diferentes concentrações e oxidando a amostra com água de bromo.

## 4.2 Imobilização enzimática

A imobilização eficiente da enzima sobre o suporte insolúvel com manutenção de sua integridade e estabilidade é fundamental para o perfeito desenrolar do processo biotecnológico envolvido no método analítico empregado (FÁGÁIN, *et al*, 1991).

Os biossensores preparados por imobilização do tipo ligação covalente e ligação covalente cruzada, geralmente, são os que possuem o maior tempo de vida (200 a 1.000 determinações) (FATIBELO FILHO e CAPELATO, 1992). Nestes casos, usam-se agentes silanizantes, onde a principal vantagem desta técnica é a redução da lixiviação do reagente pela solução, com maior durabilidade do sensor (WEETALL, 1993).

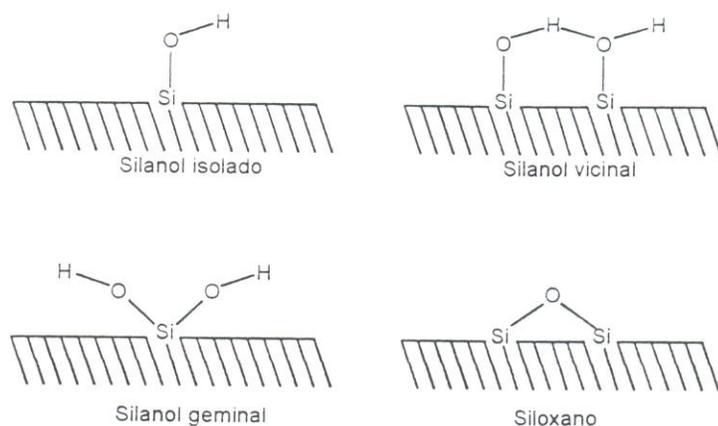
A reação de silanização desenvolvida em meio aquoso muitas vezes não se completava de maneira satisfatória, sendo necessário repetir o procedimento exaustivamente até o produto final da reação, no caso as esferas de vidro, apresentarem a cor salmão. Isso nos levou a adotar um método de imobilização com a etapa da silanização sendo realizada em meio orgânico, xileno, e que se mostrou muito mais eficiente e prático, como descrito na parte experimental.

A silanização é considerada parte crucial do processo de ligação da enzima ao suporte, sendo fundamental, não somente para a imobilização em si, mas também para a reprodutibilidade do processo (GORTON, *et al*, 1994).

A imobilização covalente através da silanização emprega agentes silanizantes, que apresentam moléculas caracterizadas por possuírem dois diferentes centros reativos, um deles sílico funcional e o outro orgânico funcional, ou seja, com afinidade pelo vidro e por molécula orgânica. O agente silanizante usado na técnica de imobilização empregada neste trabalho foi o amino-propil-trietoxilano, em virtude de permitir uma eficiente ligação entre os reagentes. O amino-silano, quando empregado para ativar a superfície de vidro, em condições anidras reage com os grupos hidroxila da superfície do vidro com uma estequiometria de 1:1 ou 1:2, produzindo neste uma mono camada. Além disso, os

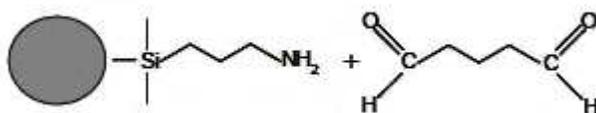
silanos não somente se acoplam às hidroxilas do suporte, como também se ligam entre si, formando um polímero na superfície. Isto talvez possa explicar a maior eficiência da silanização em meio orgânico, quando comparada à realizada em meio aquoso. Embora seja formada uma camada menos uniforme, ela apresenta uma capacidade de cobertura maior (WEETALL, 1993).

A etapa de limpeza das esferas de vidro deve ser feita de forma muito cuidadosa. É necessário que a superfície do vidro fique livre de gorduras e outras sujeiras e que a integridade das esferas seja preservada. Assim, os grupos silânicos (Si-OH) presentes na superfície do vidro podem reagir com o agente silanizante de modo uniforme. Os grupos silânicos capazes de reagir com o agente silanizante são os que se encontram na forma germinal ou isolada (CASS e LIGHER, 1998). A Figura 34 mostra diferentes grupos silânicos presentes na superfície do vidro.



**Figura 34. Grupos Silânicos.**

Posteriormente, tem-se a adição de glutaraldeído que permite a ligação entre o vidro ativado e a enzima, conforme a Figura 35.



**Figura 35. Ativação das pérolas de vidro com reagente bifuncional (adaptado de LEITE, 2005)**

O glutaraldeído forma uma ponte, Figura 36, com o grupamento aminado do suporte ativado e a enzima, o que permite separar o biocatalisador de seu suporte sólido, melhorando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima (SCRIBAN,1985).

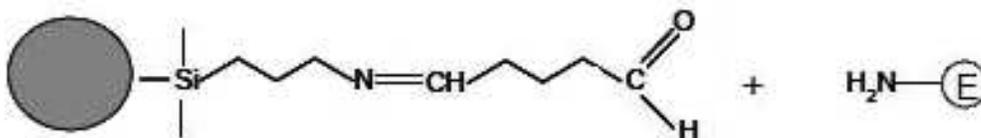


Figura 36. Bases de Schiff (adaptado de LEITE, 2005)

### 4.3 Células de permeação e membrana

Inicialmente a célula redonda foi feita para um sistema de análise visual '*in situ*' mas também foi usada no sistema FIA. No estudo comparativo entre as duas células de permeação apresentadas, a cela retangular apresentou melhores resultados. O seu melhor desempenho é devido ao maior caminho percorrido pelo ácido acético e indicador ao longo da membrana de PTFE, o que favorecia maior difusão gasosa do ácido acético.

Em relação à membrana de silicona, devido à maior espessura não apresentou boa difusão gasosa. Como alternativa passou-se a procurar uma membrana de PTFE que pudesse ser utilizada. Ocorreram problemas com relação à durabilidade da mesma, pois ocorria freqüentemente rompimento, sendo necessário parar o sistema para a substituição da mesma. Foram testadas várias marcas disponíveis no mercado. A que apresentou maior durabilidade foi importada da Alemanha. Ela apresentava maior uniformidade se comparada às marcas nacionais e foi utilizada até o final do trabalho.

## 4.4 Efeito da variação das condições do sistema FIA

Foram feitos estudos apresentados a seguir, para obter as condições ótimas dos parâmetros analíticos. Nem sempre a que apresentou o maior sinal foi adotado, pois além deste outros fatores foram levados em conta na escolha das condições de trabalho.

### 4.4.1 Efeito da variação de temperatura

Fez-se o estudo da influência da temperatura sobre o reator enzimático no intervalo de 20 °C a 40 °C e observou-se o sinal analítico. Para este estudo utilizou-se um banho termostatizado. A coluna enzimática foi mergulhada no banho e para cada temperatura estudada esperou-se atingir o equilíbrio térmico. Os resultados são apresentados na Figura 37.

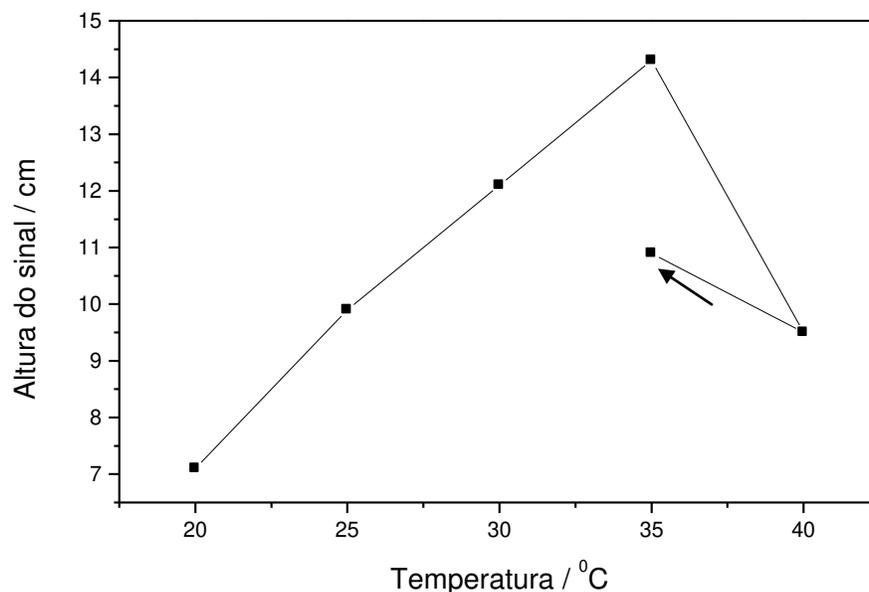


Figura 37. Gráfico do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática. [Cloreto de acetilcolina] =  $5,0 \times 10^{-3}$ ; tampão fosfato pH = 7,5 ; [ácido sulfúrico] =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão =  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $1 \text{ cm} = 0,025$  unidades de absorvância, alça de amostragem =  $150 \text{ }\mu\text{L}$ . A flecha indica a perda de parte da atividade enzimática devido a denaturação.

No gráfico pode-se notar a grande influência da temperatura sobre a atividade enzimática. A altura do sinal analítico aumenta continuamente até 35 °C, temperatura que apresenta maior atividade da enzima. Na temperatura de 40 °C observa-se um decréscimo acentuado no sinal indicando diminuição da atividade enzimática, devido à desnaturação protéica. Diminuiu-se a temperatura da enzima para 35 °C, temperatura esta que possuía a maior atividade. Conforme seta da Figura 37, a altura do sinal analítico e a atividade não foi totalmente recuperada devido ao processo de desnaturação.

Apesar da temperatura de maior atividade enzimática ser de 35 °C, optou-se trabalhar na temperatura ambiente (25°C), buscando sempre simplificar o sistema. Na temperatura de 25°C, o sinal analítico apresenta boa resposta, pois corresponde a 70% do maior sinal. Para cada temperatura, as medidas das alturas foram feitas em triplicata e o desvio padrão médio das medidas foi de  $\pm 0,06$  cm.

#### 4.4.2 Efeito da concentração do substrato

De acordo com a Figura 38, podemos observar um aumento da altura do sinal analítico com o aumento da concentração do substrato. Este aumento pode ser atribuído ao aumento do número de moléculas do substrato em contato com a enzima, com conseqüente aumento do produto da reação enzimática, no caso ácido acético. Conseqüentemente, maior quantidade de ácido pode se difundir através da membrana provocando aumento do sinal analítico. A concentração adotada para o trabalho foi de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> onde houve uma resposta analítica satisfatória, sem se aproximar muito da concentração de saturação da reação enzimática, já que o excesso de substrato também pode provocar inibição enzimática. A curva pode ser representada pela equação:

$$h = -0,61964 + 2,85893 C - 0,16012 C^2,$$

Com coeficiente de determinação  $r^2 = 0,99822$ . Nesta equação, h representa a altura do pico em cm e C a concentração de cloreto de acetilcolina (mol L<sup>-1</sup>).

As medidas das alturas dos picos para cada concentração foram feitas em triplicata e o desvio padrão médio das medidas foi de  $\pm 0,08$  cm.

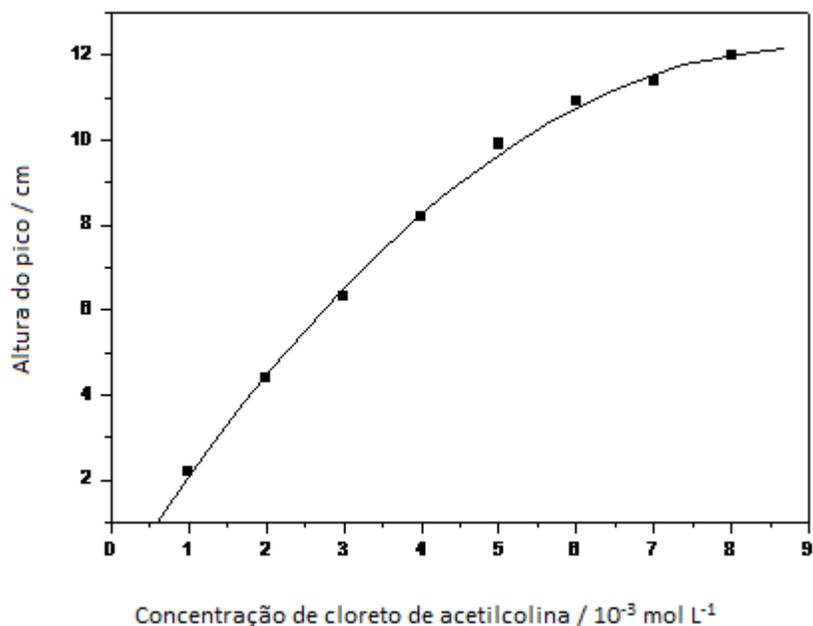


Figura 38. Gráfico representando o efeito da concentração do substrato sobre o sinal analítico; tampão fosfato pH = 7,5; [ácido sulfúrico]=0,5 mol L<sup>-1</sup>; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura: 25 °C; 1cm = 0,025 absorbância, alça de amostragem = 150 µL.

#### 4.4.3 Efeito da variação do volume de injeção

Estudou-se o efeito da variação do volume injetado na altura do pico, injetando-se volumes entre 50 e 250 µL, conforme Figura 39. Como esperado, o aumento do volume injetado foi acompanhado do aumento da altura do pico (sinal analítico). Buscando a melhora da frequência analítica, optou-se pelo volume de 150 µL, pois o aumento do pico para o volume de 200 µL não foi significativo

As medidas das alturas dos picos para cada volume foram feitas em triplicata e o desvio padrão médio das medidas foi de ± 0,07 cm.

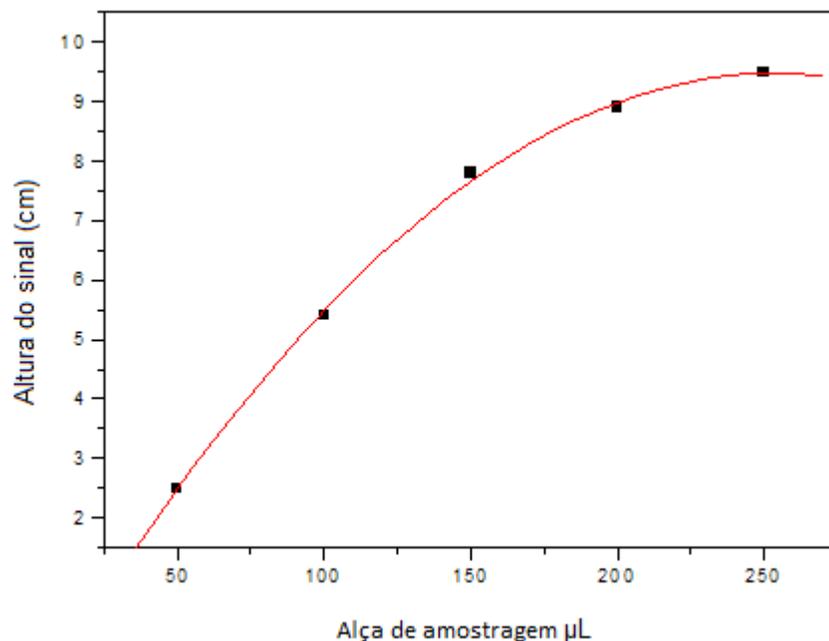


Figura 39. Gráfico do efeito do volume injetado sobre o sinal analítico; tampão fosfato pH = 7,5 ; [ácido sulfúrico]=0,5 mol L<sup>-1</sup>; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup>; [substrato] = 5,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; temperatura: 25 °C; 1cm = 0,025 absorbância.

#### 4.4.4 Efeito da variação da vazão

Foram realizadas medidas variando-se a vazão do sistema. Podemos observar na Figura 40 que a altura do pico variou sensivelmente com a variação da vazão, quanto menor a vazão, maior o sinal analítico. O fluxo dos reagentes deve ter um valor que permita a reação da enzima com o substrato. A Figura 40 mostra as medidas das alturas dos picos. Para cada variação de fluxo, foram feitas medidas em triplicata e o desvio padrão médio das medidas foi de ± 0,07 cm.

Estes aumentos estão relacionados ao aumento do tempo de contato entre a enzima e o substrato, permitindo uma maior quantidade de produto formado, no caso ácido acético. Além disso, na cela de permeação com um fluxo menor, existe maior possibilidade de difusão do ácido. Outro importante fator relacionado com a

diminuição da vazão é o aumento da inibição enzimática pelos pesticidas, pois o bloqueio dos sítios ativos da enzima é favorecido pelo aumento do tempo de interação dos pesticidas com a enzima.

A estimativa do desvio padrão das medidas para as alturas dos picos é de 0,07 cm, sendo que todas as medidas foram realizadas em triplicata. A vazão adotada foi de 1 mL min<sup>-1</sup>; essa vazão permitiu a realização de uma amostra a cada 5 minutos.

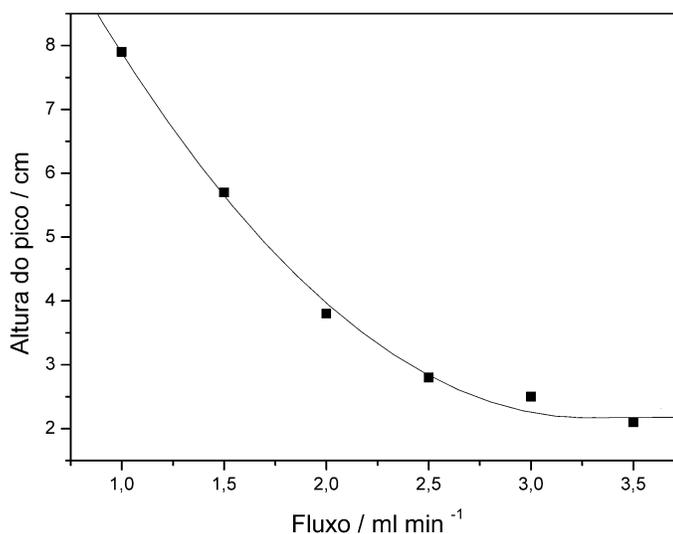


Figura 40. Gráfico do efeito da variação da vazão sobre o sinal analítico; tampão fosfato pH = 7,5 ; [ácido sulfúrico]=0,5 mol L<sup>-1</sup>; alça de amostragem = 150 µL ; [substrato] = 5,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; temperatura: 25 °C; 1cm = 0,025 absorbância.

#### 4.4.5 Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Para estudar o efeito da variação da concentração do ácido as medidas foram feitas em triplicata e o desvio padrão médio relativo foi de 0,06 cm. Apesar de o maior sinal ser em 1,0 mol L<sup>-1</sup>, a concentração escolhida para trabalhar foi de 0,5 mol L<sup>-1</sup>, onde houve uma resposta analítica satisfatória com uma menor concentração de ácido sulfúrico, conforme a Figura 41.

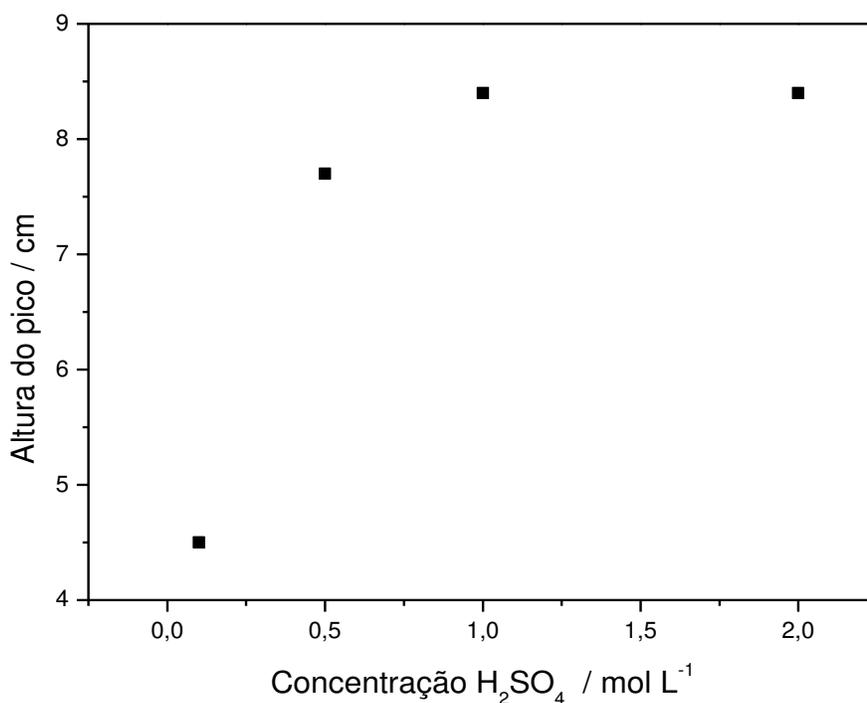


Figura 41. Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; tampão fosfato pH = 7,5; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup> ; alça de amostragem = 150 μL ; [substrato] = 5,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; temperatura: 25 °C; 1cm = 0,025 absorbância.

#### 4.4.6 Efeito da concentração de TMB-4

A porcentagem de regeneração da enzima inibida pelos pesticidas aumenta com o aumento da concentração do regenerador TMB-4 e a concentração que provocou a completa regeneração dos pesticidas estudados foi de  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Algumas vezes a regeneração não era completa numa só passagem do regenerador. Nestes casos, fez-se necessário a passagem do regenerador por duas vezes, o que era suficiente para completa regeneração, exceto quando a enzima já começava a apresentar perda da atividade.

#### 4.4.7 Efeito do pH

Avaliou-se a concentração hidrogeniônica sobre a catálise enzimática. A faixa estudada foi a de pH 6,0 a 8,5 (tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), uma vez que a maioria das enzimas trabalha numa região estreita de pH. Em geral as enzimas apresentam um pH ótimo de reação. Neste estudo o valor que se encontrou foi de 7,5. Em pH fora destes limites observa-se um decréscimo do sinal, conforme pode ser visto na Figura 42. Na literatura, as faixas de trabalho de pH variam de 6,00 a 8,00, região de maior estabilidade da enzima.

As medidas foram feitas em triplicata e o desvio padrão médio foi de  $\pm 0,08 \text{ cm}$ .

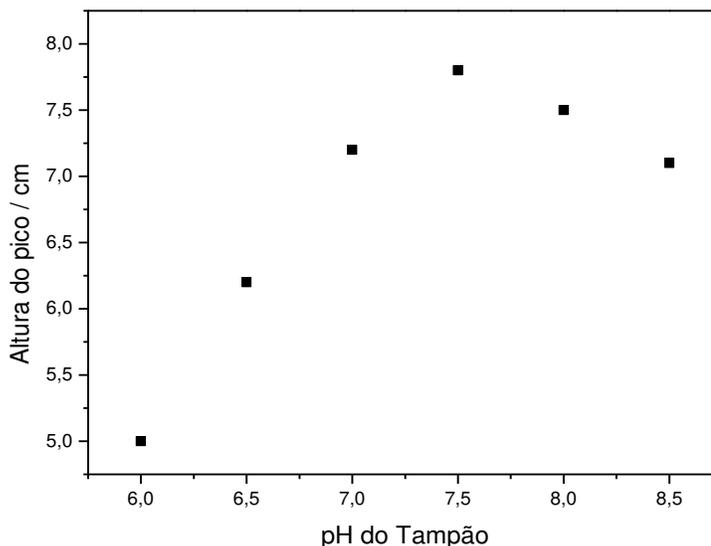


Figura 42. Efeito da variação do pH do tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão =  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; alça de amostragem =  $150 \mu\text{L}$ ;  $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{substrato}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; temperatura:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $1 \text{ cm} = 0,025 \text{ absorbância}$ .

A Tabela 6 apresenta o resumo das condições escolhidas para o sistema FIA.

**Tabela 6: Condições de trabalho para o sistema FIA**

<b>Parâmetros analíticos do sistema FIA</b>	
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25,0
Concentração do substrato ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$5 \times 10^{-3}$
Alça de injeção ( $\mu\text{L}$ )	150,0
Varição da vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1,0
Concentração do $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,5
pH do tampão fosfato	7,5
Concentração do TMB-4 ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$5 \times 10^{-5}$

#### **4.5 Determinação do pesticida metil paration**

Para a determinação do pesticida metil paration os sinais foram obtidos em triplicata, sendo calculadas as médias, a partir das quais foi feito o cálculo da porcentagem de inibição da enzima, que foi relacionada à concentração do pesticida, conforme os dados apresentados na Tabela 7. A partir desses dados, foram obtidas duas curvas conforme a Figura 43. Uma representa o pesticida não oxidado e a outra, o oxidado.

Considerando-se a inibição mínima de 10% para a menor concentração a ser quantificada (limite de quantificação - LQ) e 3 % para a menor quantidade a ser detectada (limite de detecção - LD), antes da oxidação, o limite de detecção estava na faixa de  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Neste trabalho a proposta foi utilização do sistema enzimático como uma técnica de varredura para a identificação de amostras positivas; portanto, o limite de detecção é o parâmetro mais importante.

MORITA, 1995 usou água de bromo para oxidar pesticidas organofosforados contendo o grupo  $\text{P}=\text{S}$  aos correspondentes  $\text{P}=\text{O}$  que são normalmente compostos com maior poder de inibição enzimática.

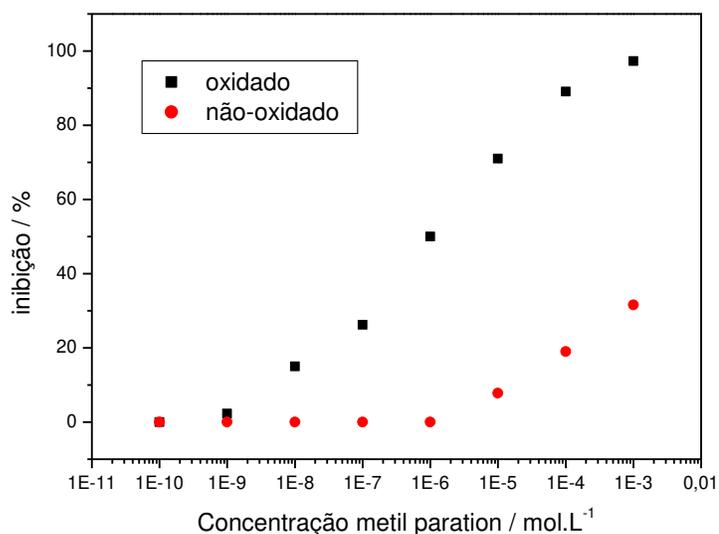
Após a oxidação usando água de bromo o limite de detecção melhorou sensivelmente passando para faixa de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. O único tratamento a que a amostra foi submetida foi adição da água de bromo, que provocou a oxidação do pesticida estudado, sem nenhum outro tipo de pré-tratamento.

A curva da % inibição *versus* concentração logarítmica de metil-paration oxidado Figura 43 ( ■ ) é descrita pela equação:  $S = 155,71 + 17,7 \log M$ , onde S representa a porcentagem de inibição e M a concentração. O coeficiente de correlação para esta curva é de 0,9917. O desvio padrão médio é de 4,8% (n = 6), para a faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>

Com essas condições, foi possível realizar cerca de 12 determinações por hora. A coluna enzimática pôde ser usada por aproximadamente 100 determinações sem perda significativa da atividade enzimática. Sempre após cada inibição, seja pelo pesticida original ou pelos produtos de degradação, a atividade era recuperada pelo agente regenerador TMB-4.

**Tabela 7: Relação entre a concentração (mol L<sup>-1</sup>) de metil paration oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.**

Concentração / mol L <sup>-1</sup>	Inibição antes oxidação / %	inibição após oxidação / %
$10^{-10}$	0,0	0,0
$10^{-9}$	0,0	2,3
$10^{-8}$	0,0	15,0
$10^{-7}$	0,0	26,2
$10^{-6}$	0,0	50,0
$10^{-5}$	7,8	71,0
$10^{-4}$	19,0	89,1
$10^{-3}$	31,6	97,3



**Figura 43. Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase: ( ♦ ) antes da oxidação e ( ■ ) após oxidação com água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu$ L; concentração de ácido sulfúrico = 0,5 mol L<sup>-1</sup>; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup>.**

No teste do método usando-se suco de laranja, fez-se a adição de modo que as concentrações estudadas foram de  $1,0 \times 10^{-8}$  e  $1,0 \times 10^{-6}$ . As porcentagens de inibição foram respectivamente de 13,5 e 47,4%.

DZYADEVYCH, *et al*, 2002 relataram que entre muitos compostos químicos, os pesticidas têm sido usados para melhorar a produção agrícola, mas por outro lado tem causado grande contaminação ambiental. Em adição, esses compostos podem sofrer transformações químicas como as fotoquímicas ou biológicas, conduzindo a novos produtos que podem ser mais tóxicos que os originais. Entre os diferentes processos de tratamento de água contaminada, métodos de oxidação têm sido considerados como uma das mais promissoras técnicas. Estes são capazes de converter os pesticidas em derivados inofensivos ao meio ambiente, mas às vezes os produtos de degradação são mais tóxicos.

A análise desses compostos em matrizes ambientais como a identificação e quantificação podem ser feitas por técnicas analíticas clássicas como a cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Estas técnicas, porém, são demoradas, pois necessitam de preparação como extração e pré-concentração da amostra não podendo ser feitas fora do laboratório, além de serem relativamente caras. Em adição, essa técnica não é capaz de identificar os compostos mais tóxicos, como por exemplo, os resultantes de processos de degradação dos pesticidas (DZYADEVYCH, *et al*, 2002).

Usando o fato de que em muitos processos de degradação são gerados compostos mais tóxicos, foi possível, neste trabalho, aumentar significativamente os limites de detecção do metil paration. Após a oxidação com água de bromo foram gerados um ou mais compostos que apresentaram ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase muito mais intensa

A seguir, na Figura 44, um esquema de possíveis produtos da degradação de metil paration proposto por Dzyadevych, *et al* 2002.

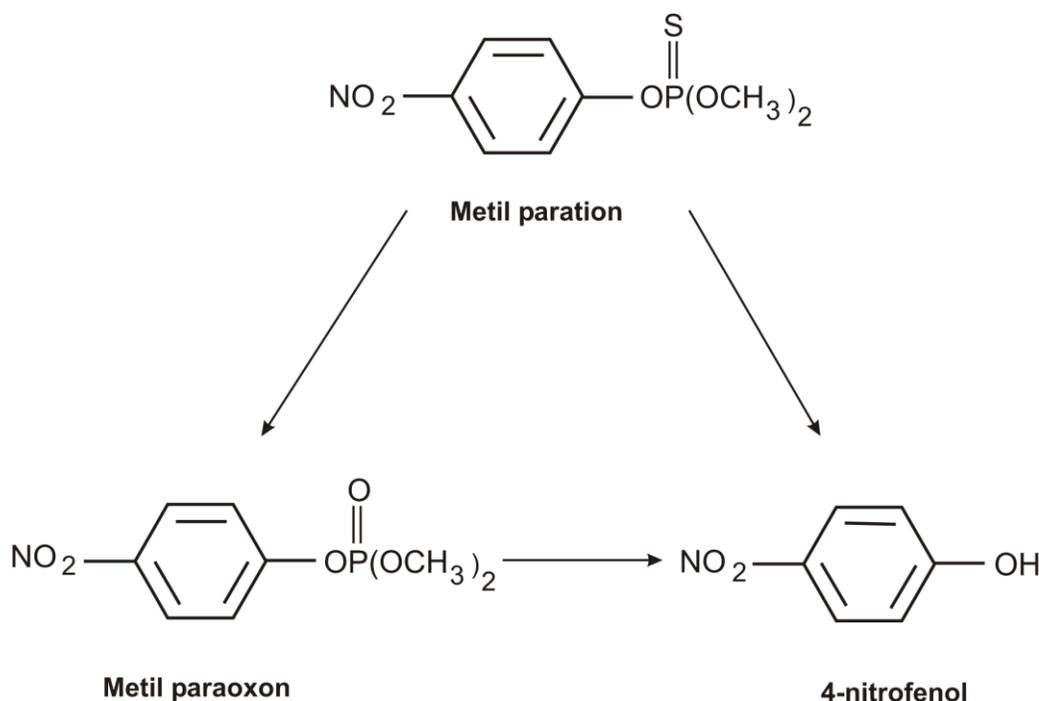


Figura 44. Produtos de degradação do metil paration

Nas análises dos compostos formados após a oxidação com água de bromo, utilizou-se o CG-MS com a seguinte configuração: GCT Premier Micromass Waters coluna HP 5-MS (30m × 0,25 mm × 0,25µm), fluxo constante 1 mL min<sup>-1</sup>,

split 1:100, temperatura inicial 40<sup>0</sup>C, tempo inicial 4 minutos, taxa de aquecimento 10<sup>0</sup>C / min, temperatura final 280<sup>0</sup>C, tempo final 15 minutos, temperatura do injetor 250<sup>0</sup>C e temperatura da interface 250<sup>0</sup>C. Foram encontrados dois compostos com tempos de retenção diferentes, conforme a Figura 45, que apresenta o cromatograma. Comparando os espectros de massas pelo NIST (National Institute of Standards and Technology) e com a biblioteca do aparelho, foi possível identificar os mesmos. Aquele com tempo de retenção de 11,3 minutos é o pesticida metil paration e o composto com tempo de retenção 7,1 minuto é o 4 nitrofenol. De acordo com a literatura, (FARRAN, *et al*, 1988, DZYADEVYCH, *et al*, 2002) este composto é um dos produtos de degradação do metil paration. A Figura 46 apresenta os espectros de massa.

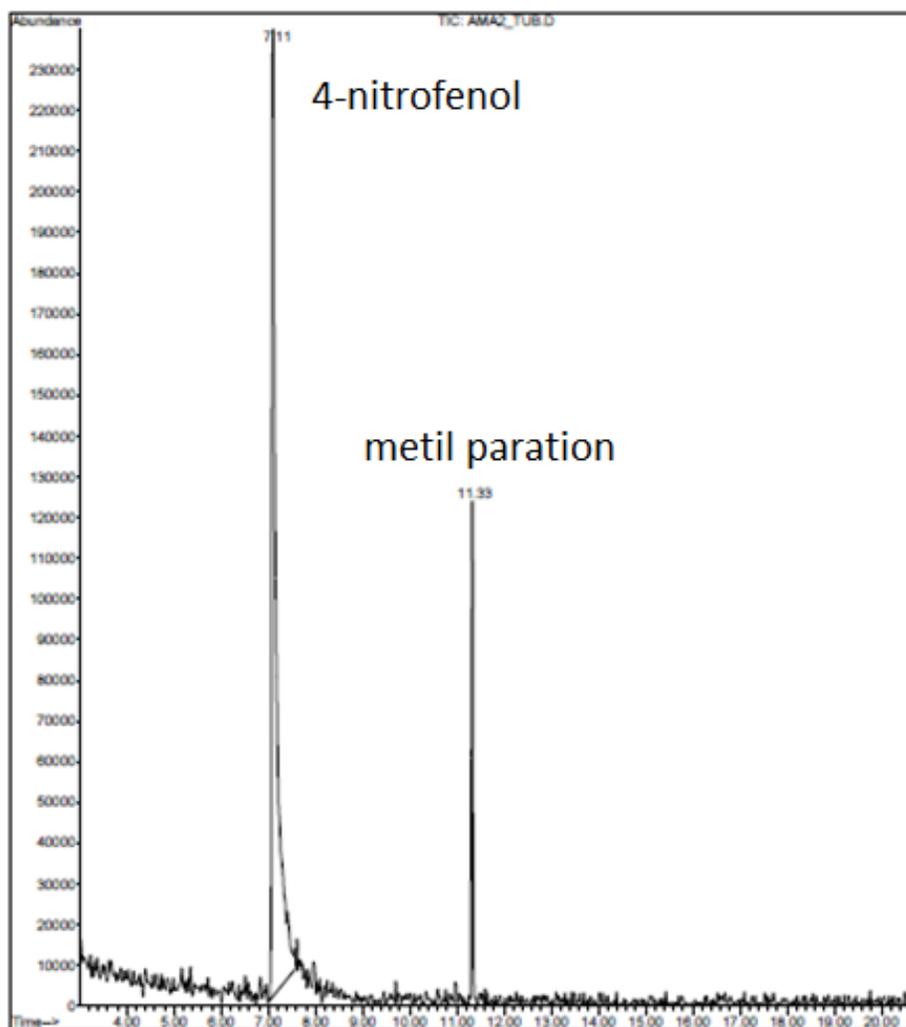
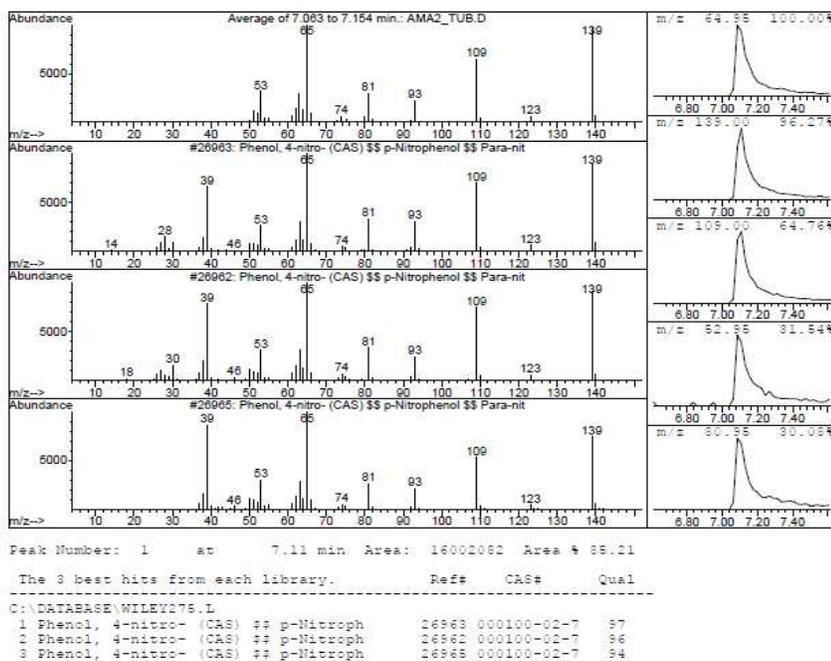


Figura 45: Cromatograma do pesticida metil paration após oxidação.

A)



B)

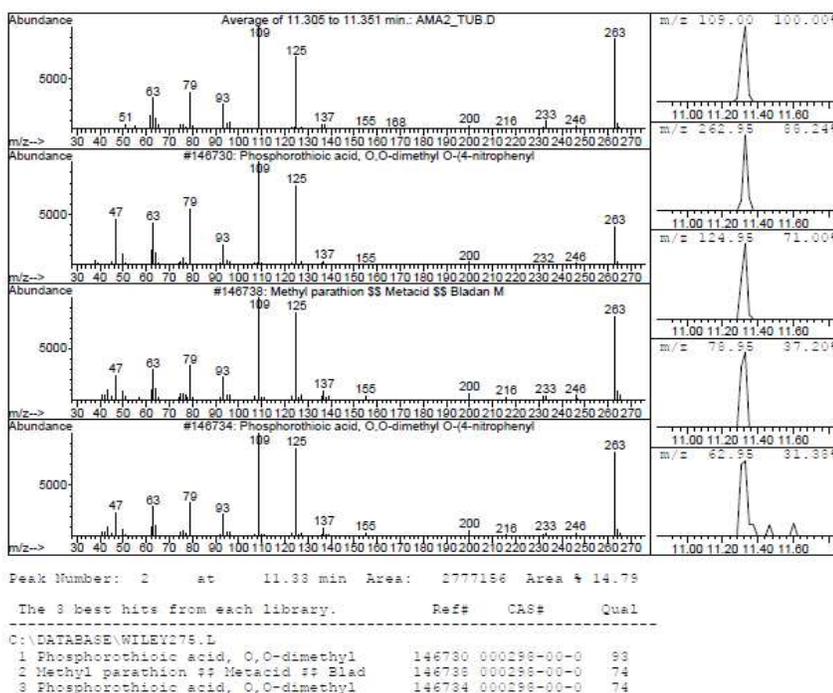


Figura 46: Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS: A) 4 nitrofenol e B) metil paration.

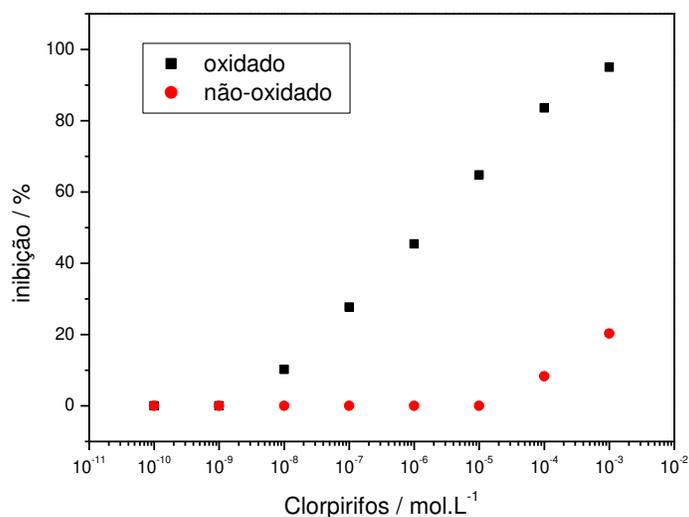
## 4.6 Determinação do pesticida clorpirifos

Para a determinação do pesticida clorpirifos os sinais foram obtidos em triplicata, sendo calculadas as médias, a partir das quais foi feito o cálculo da porcentagem de inibição da enzima, que foi relacionada à concentração do pesticida, conforme os dados apresentados na Tabela 8. A partir desses dados, foram obtidas duas curvas conforme a Figura 47. Uma curva representa o pesticida não oxidado e a outra o oxidado, considerando a inibição mínima de 3% para a menor concentração a ser determinada; antes da oxidação, o limite de detecção era cerca de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Após a oxidação usando água de bromo o limite de detecção melhorou sensivelmente passando para cerca de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. O único tratamento a que a amostra foi submetida foi a adição da água de bromo, que provocou a oxidação do pesticida estudado, sem nenhum outro tipo de pré-tratamento.

**Tabela 8: Relação entre a concentração (mol L<sup>-1</sup>) de clorpirifos oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.**

<b>Concentração / mol L<sup>-1</sup></b>	<b>Inibição antes oxidação / %</b>	<b>Inibição após oxidação / %</b>
$10^{-10}$	0,0	0,0
$10^{-9}$	0,0	0,0
$10^{-8}$	0,0	10,2
$10^{-7}$	0,0	27,7
$10^{-6}$	0,0	45,4
$10^{-5}$	0,0	64,8
$10^{-4}$	8,3	83,6
$10^{-3}$	20,3	95,0



**Figura 47. Relação entre a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase: ( ♦ ) antes da oxidação e ( ■ ) após oxidação com água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu\text{L}$ ; concentração de ácido sulfúrico =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão =  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .**

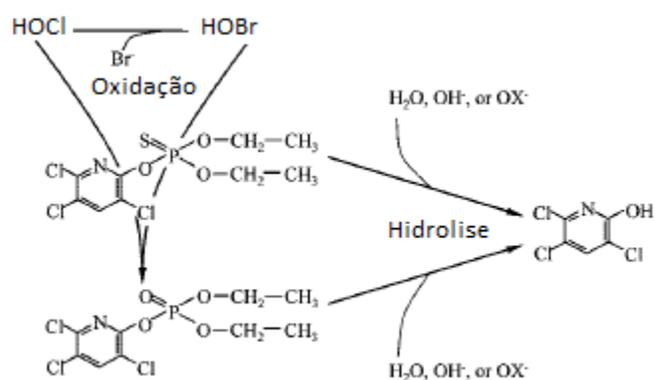
A curva da % inibição da enzima *versus* o logaritmo da concentração do clorpirifos oxidado, Figura 47 ( ■ ) é descrita pela equação:  $S = 150,48 + 17,46 \log M$ . O coeficiente de correlação para esta curva é de 0,9979. O desvio padrão médio é 2,3% (n = 6), para a faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

DUIRK *et al.*, (2008) alertam para os poucos estudos feitos sobre os efeitos dos agentes químicos usados no tratamento da água para abastecimento, especialmente agentes desinfetantes como o cloro, pois este é um composto que pode reagir com pesticidas organofosforados, o que pode resultar em compostos mais tóxicos. Quando o cloro reage com o subgrupo fosforotioato dos pesticidas organofosforados, o grupo funcional tiofosfato (P=S) pode ser oxidado ao seu correspondente oxon (P=O). Como resultado, os pesticidas que apresentam esse grupo oxon são normalmente inibidores mais potentes da acetilcolinesterase.

DUIRK *et al.* (2008) elucidaram a destruição do clorpirifos na presença de solução aquosa de hipoclorito na faixa de pH de 6,3 a 11. Eles observaram a rápida oxidação do clorpirifos (CP) por  $\text{OCl}^-$ , resultando em um composto mais tóxico, clorpirifos-oxon (CPO). Verificaram também a hidrólise do CP e CPO para

3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP); a Figura 48 apresenta um esquema dos produtos de degradação encontrados. Entretanto, naturalmente existem outros constituintes em solução aquosa como íons brometo e matéria orgânica que podem afetar as transformações dos pesticidas organofosforados durante o processo de tratamento de água. Fica claro a importância de identificar produtos de degradação dos pesticidas organofosforados.

Foi feito teste do método usando suco de laranja, de modo que a concentração adicionada foi de  $1,0 \times 10^{-8}$  e  $1,0 \times 10^{-6}$ . Na concentração mais baixa, a porcentagem de inibição foi de 8,3% e na mais alta foi de 42,5 %.



**Figura 48. Figura esquemática dos caminhos dos produtos de degradação do pesticida clorpirifos na presença de cloro e bromo (DUIRK, 2008)**

A Figura 49 representa o cromatograma do pesticida clorpirifos oxidado onde verifica-se a separação de 4 compostos diferentes. Pelos espectros de massas apresentados na Figura 50 e pela comparação com o banco de dados NIST, o composto com tempo de retenção de 12,24 minutos refere-se ao metabolito do pesticida, clorpirifos-oxon e o composto com tempo de retenção de 12,37 minutos refere-se ao pesticida clorpirifos.

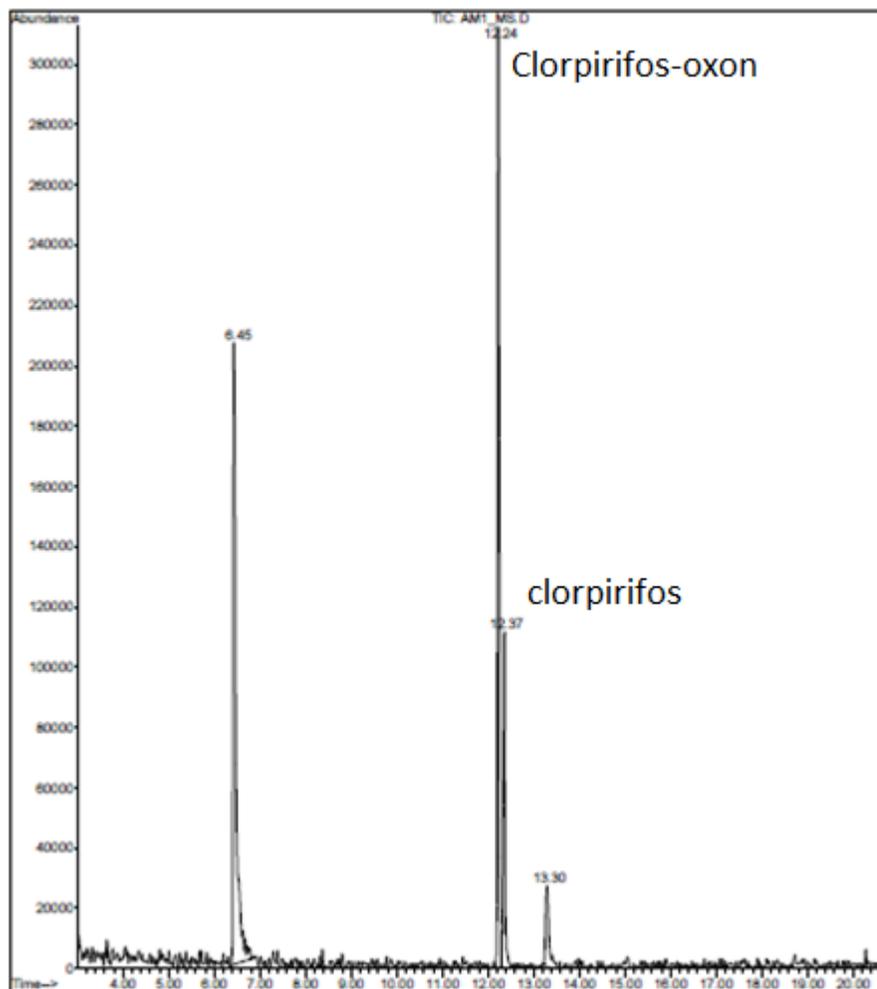
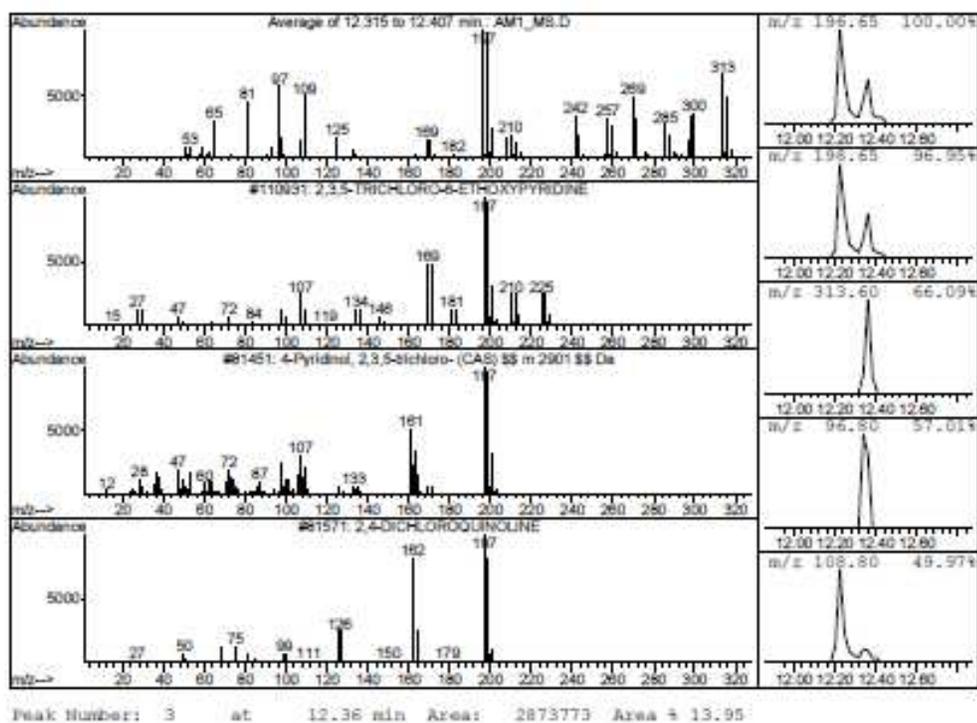


Figura 49: Cromatograma do pesticida clorpirifos após oxidação.

KRALJ, *et al*, 2007 em um estudo de produtos de degradação de pesticidas organofosforados relata que, para o pesticida clorpirifos, um dos produtos encontrado foi o análogo clorpirifos-oxon. DUIRK, *et al*, 2008, também relata que um dos produtos de degradação do clorpirifos é o clorpirifos-oxon.

A)



B)

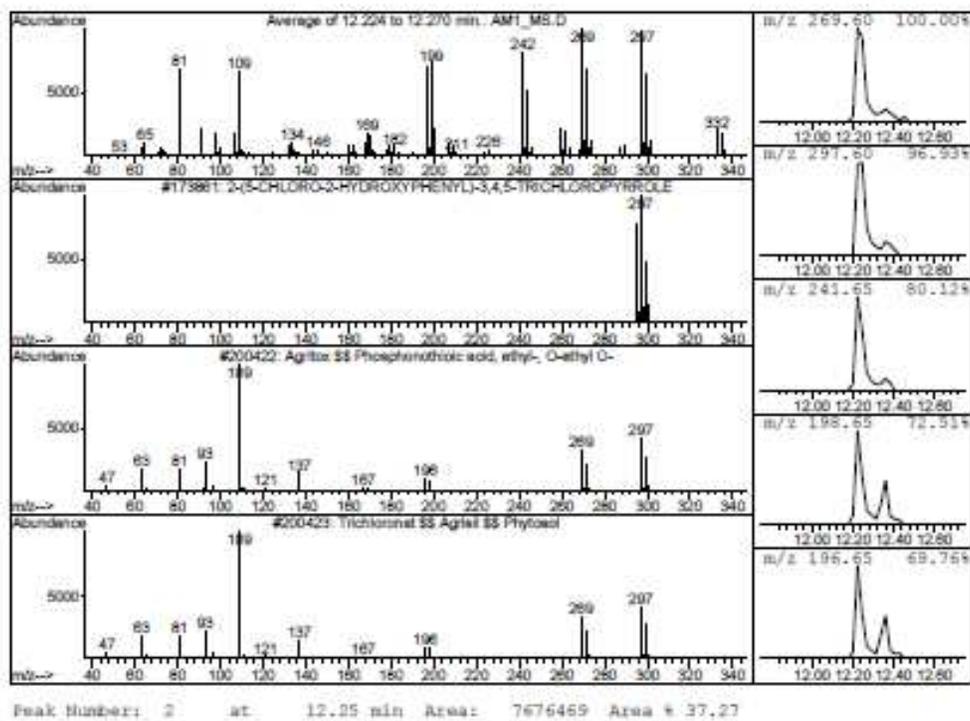


Figura 50: Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS: A) Pesticida clorpirifos; B) Clorpirifos-oxon.

## 4.7 Determinação do pesticida malation

Para a determinação do pesticida malation os sinais foram obtidos em triplicata, e a partir destes foram feitos os cálculos das porcentagens de inibição da enzima e relacionados às concentrações dos pesticidas, conforme os dados apresentados na Tabela 9. A partir desses dados, foram obtidas duas curvas (Figura 51). Uma curva representa o pesticida não oxidado e a outra, o oxidado. Considerando a inibição mínima de 3 % para a menor concentração a ser determinada, antes da inibição, o limite de detecção estava na faixa de  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

Após a oxidação usando água de bromo o limite de detecção melhorou sensivelmente passando para faixa de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação para faixa de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. O único tratamento que a amostra foi submetida foi a adição da água de bromo que provocou a oxidação do pesticida estudado, sem nenhum outro tipo de pré-tratamento.

**Tabela 9. Relação entre a concentração (mol L<sup>-1</sup>) de malation oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.**

<b>Concentração / mol L<sup>-1</sup></b>	<b>Inibição antes oxidação / %</b>	<b>inibição após oxidação / %</b>
$10^{-10}$	0,0	0,0
$10^{-9}$	0,0	0,0
$10^{-8}$	0,0	0,0
$10^{-7}$	0,0	3,2
$10^{-6}$	0,0	8,4
$10^{-5}$	0,0	16,3
$10^{-4}$	0,0	52,8
$10^{-3}$	4,3	75,0

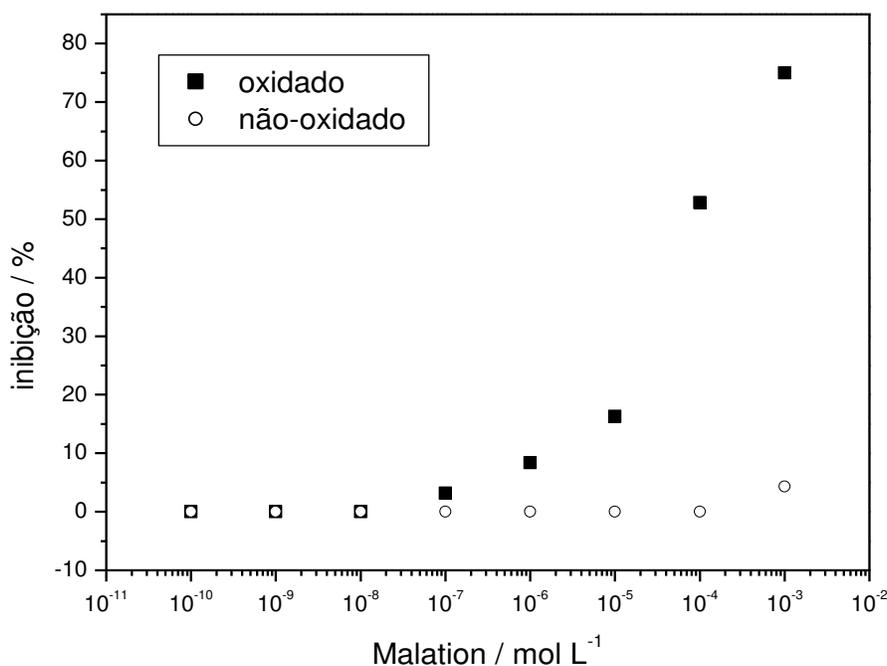
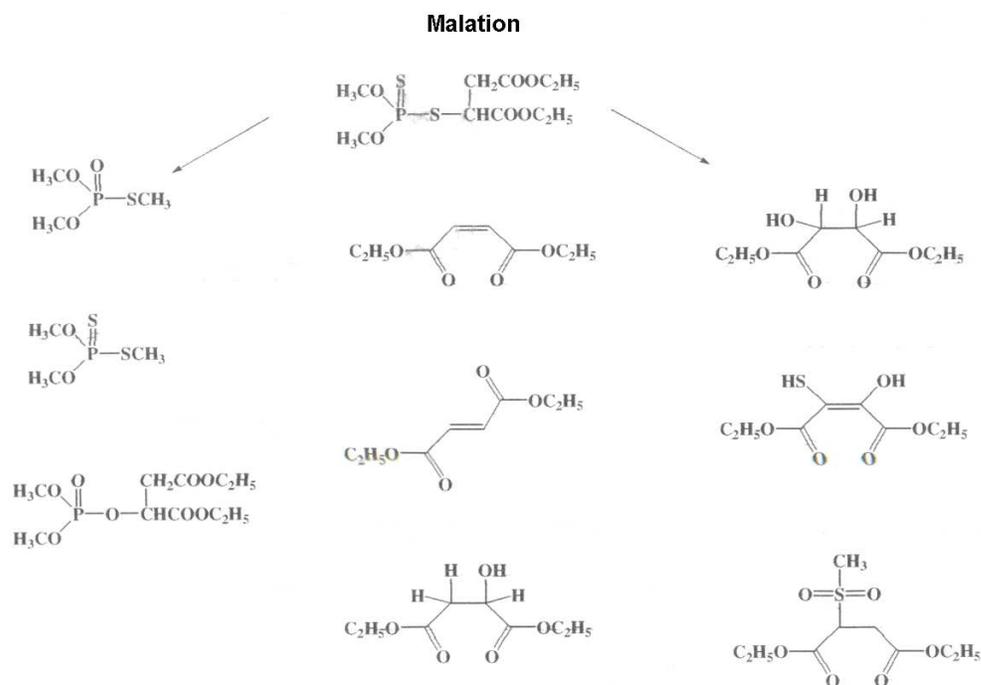


Figura 51. Relação entre a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase: (o) antes da oxidação e (■) após oxidação com água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu\text{L}$ ; concentração de ácido sulfúrico =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão =  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

A curva da % inibição da enzima *versus* o logaritmo da concentração do malation oxidado, Figura 51 (■), é descrita pela equação:  $S = 165,43 + 29,35 \log M$ . O coeficiente de correlação para esta curva é de 0,9902. O desvio padrão médio é de 5,8% ( $n = 3$ ), para a faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

KRALJ et al. (2007) fez um estudo da degradação de pesticidas organofosforados entre eles o malation e identificou alguns produtos, a maioria deles pertenciam do butano dietil ester. Outros três produtos encontrados pertenciam à família de compostos tóxicos, todos membros do grupo ésteres fosfatos, conforme a Figura 52.



**Figura 52** Esquemas dos produtos de degradação do malation (KRALJ, *et al*, 2007)

Em suco de laranja, as concentrações adicionadas foram de  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-4}$ , as respectivas porcentagens de inibição encontradas foram 7,2 e 49,9 %.

Na Figura 53 tem-se o cromatograma dos compostos após a oxidação com água de bromo, onde tem-se três compostos diferentes. Na Figura 54, os espectros de massas, por comparação com o banco de dados NIST, identificou o malation e malaoxon, que são metabólitos do malation.

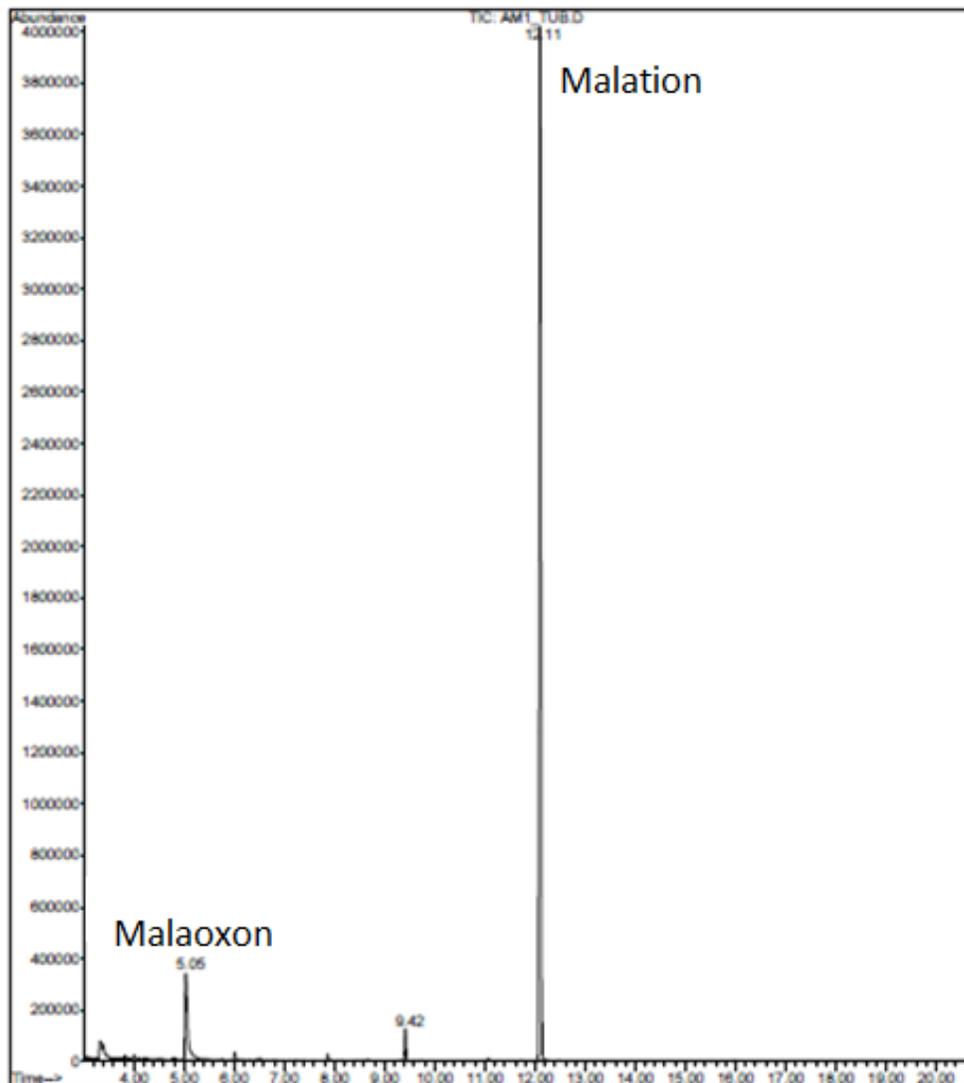
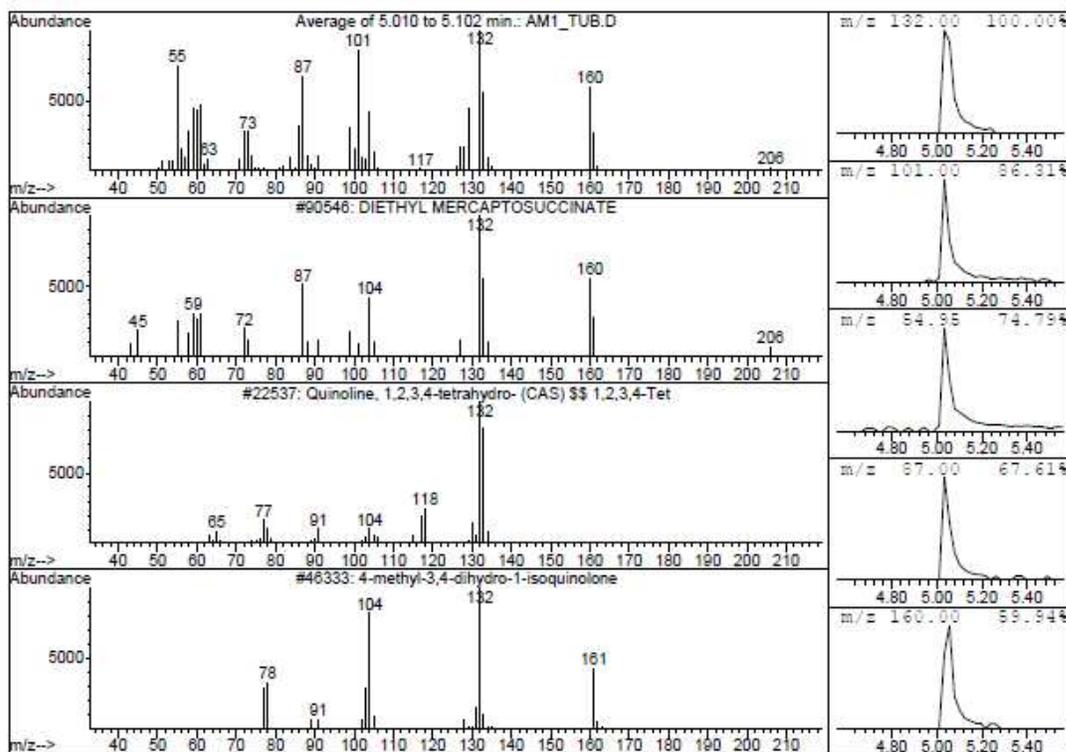
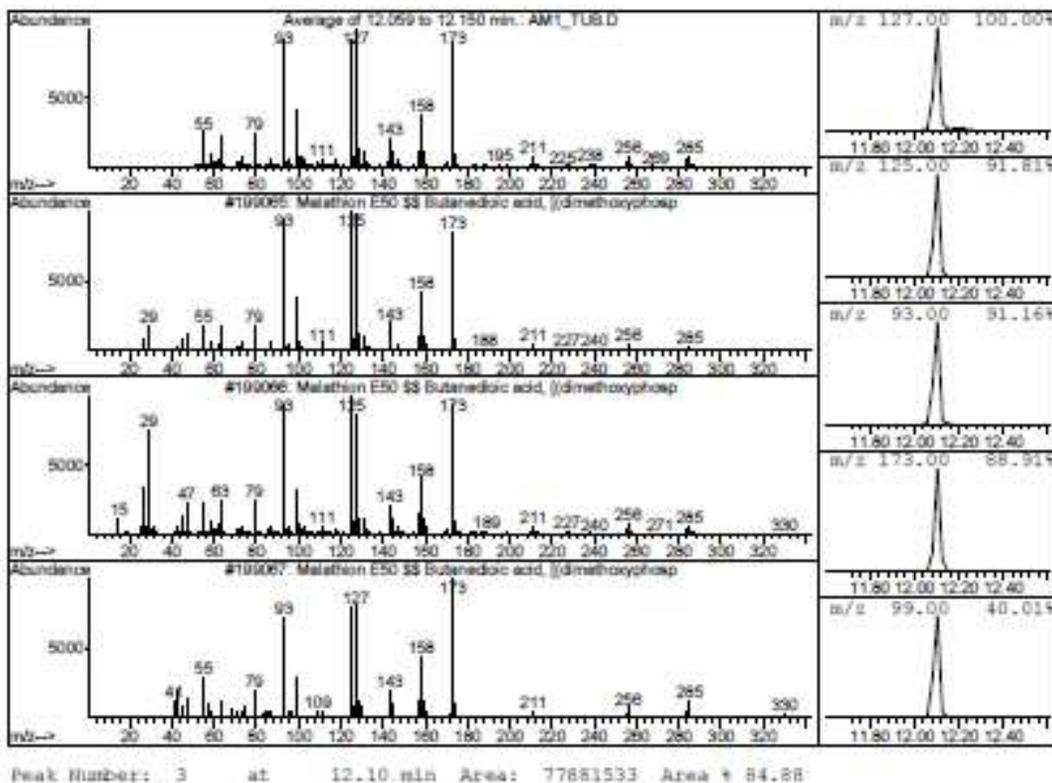


Figura 53: Cromatograma do pesticida malation após oxidação.

A)



B)



54: Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS: A) Malaoxon; B) Malation.

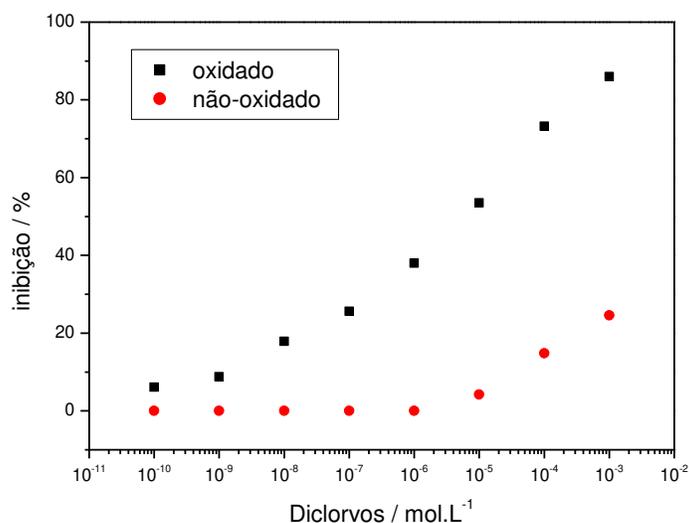
## 4.8 Determinação do pesticida diclorvos

Para a determinação do pesticida diclorvos os sinais foram obtidos em triplicata, e a partir destes foram feitos os cálculos das porcentagens de inibição da enzima e que foram relacionados às concentrações do pesticida conforme os dados da Tabela 10. A partir desses dados, foram obtidas duas curvas apresentadas na Figura 55. Uma curva representa o pesticida não oxidado e a outra, o oxidado. Considerando a inibição mínima de 3 % para a menor concentração a ser determinada, antes da inibição o limite de detecção estava em cerca de  $10^{-5}$ .

Após a oxidação usando água de bromo, o limite de detecção melhorou sensivelmente passando para faixa de  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação para faixa de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. O único tratamento que a amostra foi submetida foi a adição da água de bromo que provocou a oxidação do pesticida estudado, sem nenhum outro tipo de pré-tratamento.

**Tabela 10. Relação entre a concentração (mol L<sup>-1</sup>) do diclorvos oxidado e não oxidado e a porcentagem de inibição da enzima.**

Concentração / mol L <sup>-1</sup>	Inibição antes oxidação / %	inibição após oxidação / %
$10^{-10}$	0,0	6,1
$10^{-9}$	0,0	8,8
$10^{-8}$	0,0	17,9
$10^{-7}$	0,0	25,6
$10^{-6}$	0,0	38,0
$10^{-5}$	4,2	53,5
$10^{-4}$	14,8	73,2
$10^{-3}$	24,6	86,0



**Figura 55.** Relação entre a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase: (o) antes da oxidação e (■) após oxidação com água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu\text{L}$ ; concentração de ácido sulfúrico = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ ; vazão = 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

A curva da % inibição da enzima versus o logaritmo da concentração do diclorvos oxidado, Figura 55 (■), é descrita pela equação:  $S = 127,41 + 14,25 \log M$ . O coeficiente de correlação para esta curva é de 0,9921. O desvio padrão médio é 3,8% ( $n = 6$ ), para a faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Na análise do pesticida em suco de laranja, estudaram-se as concentrações de  $1,0 \times 10^{-9}$  e  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e as respectivas porcentagens de inibição foram de 7,2 e 52,1%.

No estudo dos compostos formados após a oxidação com água de bromo, foi feita a análise por CG-MS, podendo-se observar a presença de 3 picos no cromatograma apresentado na Figura 56, confirmando a existência de diferentes compostos. Pela comparação com a biblioteca dos espectros de massas do instrumento, foi possível identificar o pesticida diclorvos e o metabólito dimetil 1,2-dibromo- 2,2 dichloroetil, conforme espectros de massa apresentados. A figura 56 e 57.

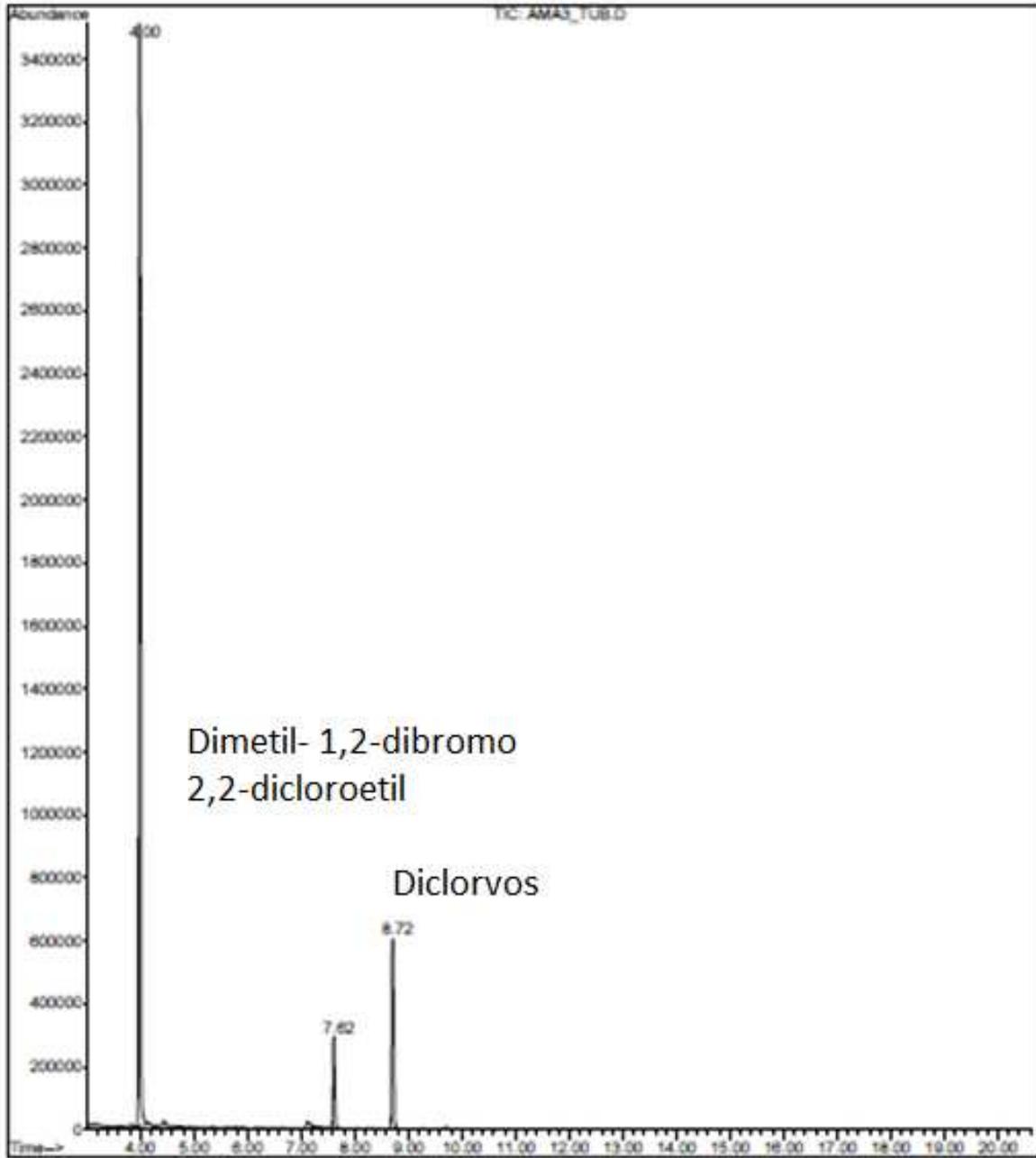
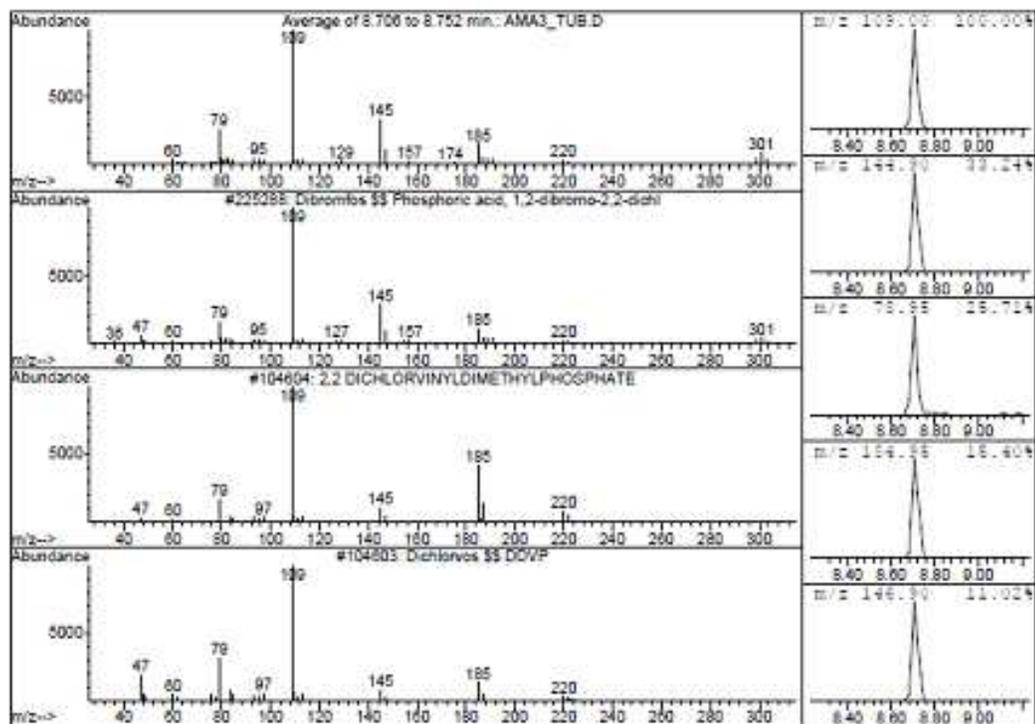


Figura 56: Cromatograma do pesticida diclorvos.

A)



B)

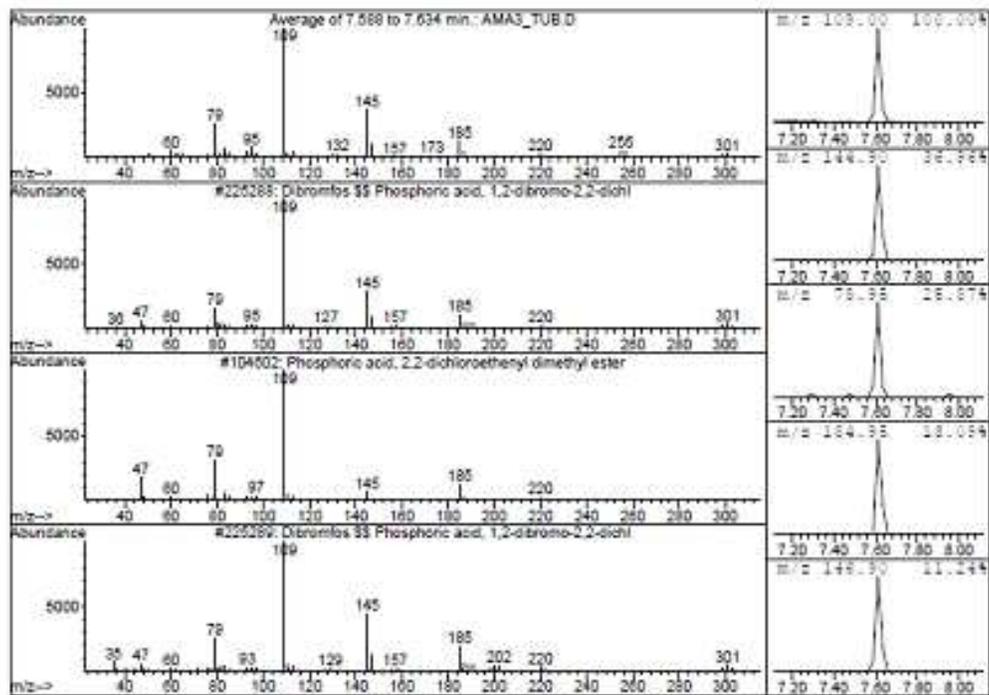


Figura 57: Espectros de massa dos compostos separados por CG-MS: A) Diclorvos; B) Dimetil-1,2-dibromo-2,2dichloroetil.

## 4.9 Comparativo todos pesticidas

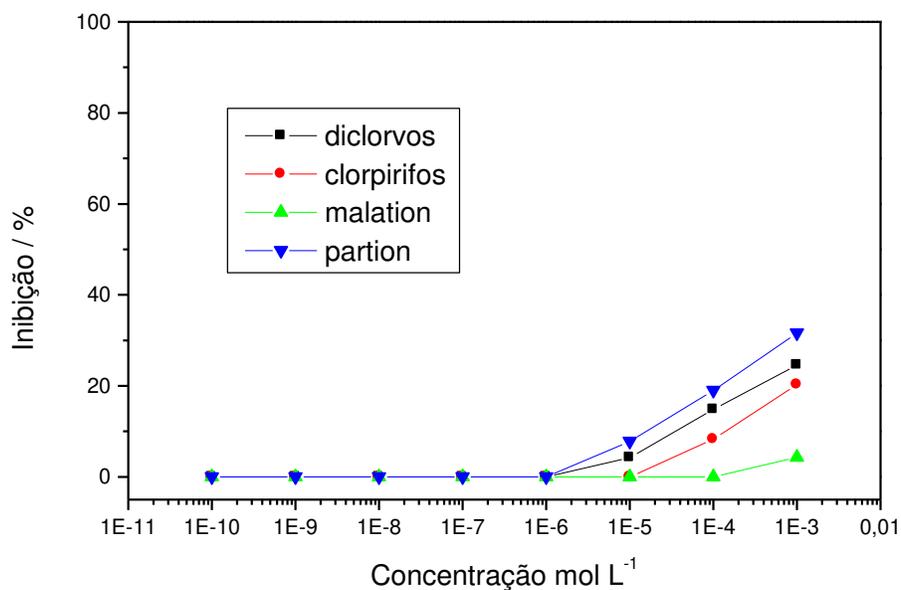


Figura 58. Relação entre porcentagem de inibição da acetilcolinesterase para os pesticidas estudados antes da adição da água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu$ L; concentração de ácido sulfúrico = 0,5 mol L<sup>-1</sup>; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

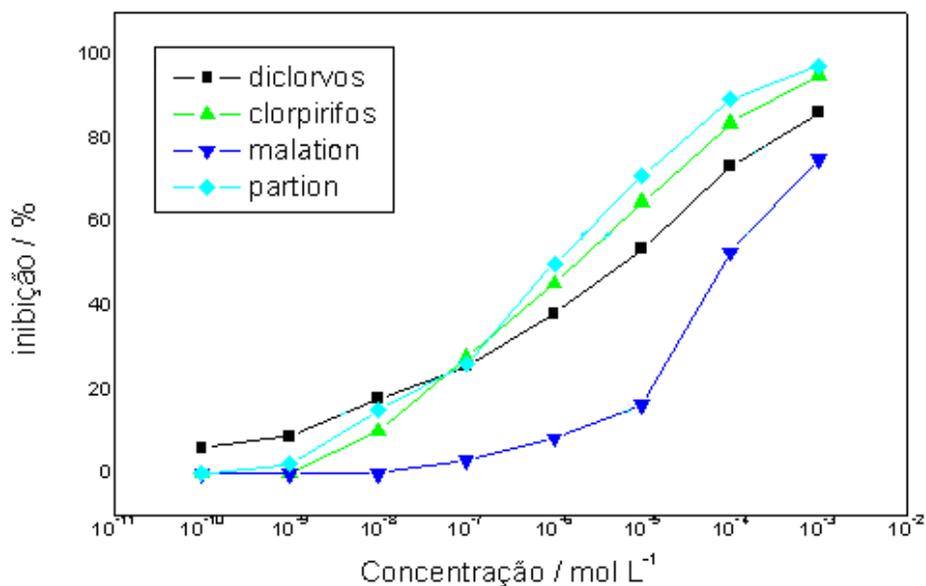


Figura 59: Relação entre a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase para os pesticidas estudados após da adição da água de bromo. Concentração de acetilcolinesterase =  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; tampão fosfato pH = 7,5; volume de injeção = 150  $\mu$ L; concentração de ácido sulfúrico = 0,5 mol L<sup>-1</sup>; vazão = 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

Pelos resultados obtidos após a adição da água de bromo, tivemos um aumento significativo nos limites de detecção dos compostos estudados, fato que está relacionado ao aumento do poder de inibição da enzima acetilcolinesterase em função dos produtos formados após a oxidação. Os compostos estudados têm em comum o grupo (P=S) mas, após a adição de água de bromo, sofrem uma reação de oxidação com a formação de grupos oxons correspondentes (P=O), como no caso do clorpirifos e malation, que em geral potencializam a inibição da enzima acetilcolinesterase. Além do grupo oxon, houve a formação de outros compostos com toxicidade elevada contribuindo para o aumento do poder inibitório.

Essa técnica permite identificar compostos com alta toxicidade, o que pode ser importante do ponto de vista ambiental, uma vez que permite rápida triagem em campo. Entretanto, ressalta-se que só pode ser utilizada para identificação de compostos inibidores de enzima acetilcolinesterase, como os pesticidas organofosforados e carbamatos.



## 5 Conclusões

Para a determinação dos pesticidas clorpirifos, metil paration, diclorvos e malation, a técnica FIA associada ao biossensor enzimático mostrou-se como uma interessante ferramenta analítica para determinação destes compostos. Contudo, para a diminuição dos limites de detecção foi necessário realizar a oxidação dos pesticidas com bromo, de modo a obter compostos com maior poder inibitório da enzima acetilcolinesterase.

O sistema FIA usado é relativamente simples. Como carregador usou-se uma solução tampão evitando assim o uso de solventes orgânicos, além dos volumes das substâncias tóxicas que eram introduzidas no sistema serem pequenos, podendo ser separados para um tratamento adequado. O custo de construção e execução é relativamente baixo, o que torna o custo por análise também baixo, sendo portanto possível aumentar a quantidade de amostras analisadas dentro de um mesmo orçamento.

De acordo com as condições experimentais estabelecidas, foi possível realizar 12 determinações por hora.

Com a utilização do regenerador enzimático a coluna pode ser recuperada e o tempo de vida da coluna foi de aproximadamente 100 determinações sem perda significativa da atividade enzimática.

O uso da enzima colinesterase, de modo análogo ao feito neste trabalho, oferece a possibilidade de miniaturização, construção de equipamentos simples e portáteis para monitoramento *on site*, rápido para aplicação na área ambiental.

Essa técnica pode ser usada como varredura para a identificação de amostras positivas em regiões onde o uso de pesticidas organofosforados é intensa, sendo estas posteriormente encaminhadas para análises qualitativas e quantitativas com técnicas já consagradas como as cromatográficas.



## 6 Referências

- ABAD, A.; MORENO, M. J.; PELEGRÍ, R.; MARTÍNEZ, M. I.; SÁEZ, A.; GAMÓN, M.; MONTOYA, A. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection an analytical comparison. **Journal of Chromatography A**, v.833, p.3-12, 1999.
- ADDOR, R.W. **Agrochemical from Natural Products**; Godfrey, C. R. A., ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1994.
- AGA, D. S.; THURMAN, E. M.; POMES, M. L. Determination of Alachor and Its Sulfonic Acid Metabolite in water by solid-phase extraction and enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytical Chemistry**, v.66, p.1495-1499, 1994
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P., JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**, 2<sup>o</sup>Ed, p.881-882, 1978.
- AMARANTE, J. O. P.; DOS SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, L. M.; **Química. Nova**, v.25, p. 589-597, 2002.
- ANDREA, M. M. Contaminação do solo por pesticidas. **O Biológico**, v.60, n.2, p.63-65, 1998.
- ANDREESCU, S.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J. L. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. **Analytical Chimica Acta**, v.464, p.171-180, 2002.
- BAPTISTA, G.C ; GARP-Associação grupo de analistas de resíduos de pesticidas- **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos** pág. 6-11, 1999.
- BASANTA, R.; NUNEZ, A.; LOPEZ, E.; FERNANDEZ, M.; DIAZ-FIERROS, **International. Journal of. Environmental. Studies**, v.48, p. 211-219, 1995.
- BURCHENAL, J. H.; BURCHENAL, J. R.; **Chemistry**, v.50, p.6-13, 1977.
- CASS, T; LIGHER, F. S. **Immobilized biomolecules in analysis: A practical approach**. London, Oxford University Press, 127p, 1998.

- CATATAYUD, J. M . **Flow injection analysis of pharmaceuticals – automation in the laboratory**. New York, Taylor & Francis, 394 p, 1996.
- CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L.; Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity . *Toxicology*. v.105, n.2-3, p.291-304. 1995.
- CHAMBERS, J. E.; CHAMBERS, H. W. J.; Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat-brain and liver **Journal of Biochemical Toxicology**. v.4. n.3, p.201-203, 1989.
- CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of The New York Academy of Sciences** . v. 102, n.1, p. 29-45, 1962.
- COLLINS, C.H; BRAGA, G.L; BONATO, P. S. **Introdução à métodos cromatográficos**. 5. Ed. Campinas. Editora Unicamp, 1997. 280p.
- CORBETT, J. R.; WRIGHT, K.; BAILLE, A. C.; **The Biochemical Mode of Action of Pesticides**, 2nd ed., Academic Press: New York, 1984.
- DANKWART, A.; HOCK, B.; SIMON, R.; FREITAG. D.; KETRUPP, A.  
Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: Investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids.  
**Environmental Science and Technology**, v.30, p.3493-3500, 1996.
- DUIRK, S. E.; TARR, J. C.; COLLETTE, T. W;. Chlorpyrifos transformation by aqueous chlorine in the presence of bromide and natural organic matter.  
**Journal of Agricultural and Food Chemistry**. N. 56, p. 1328-1335, 2008
- DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; CHOVELON, J-M. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. **Analytica Chimica Acta**. V.459, p.33-41, 2002
- DE LA GUARDIA, M. Biochemical sensors: the state of the art. **Mikrochimica Acta**, v. 120, p. 243-255, 1995.
- FÁGÁIN, C.; O'KENNEDY, R. Functionally-stabilized protins. A review.  
**Biotechnology Advances**. n.9, p. 351-409, 1991.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p.28-39, 1992.

<http://www.fiocruz.br/sinitox>, Acesso em 10/10/2009.

FOURNIER, D. E.; MUTERO, A.; Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology. v. 108, n.1, p. 19-31, 1994.

FÜHR, F. Agricultural pesticide residues. In: ANNUNZIATA, M.L.; LEGG, J., eds. **Isotopes and radiation in agricultural science**. London, Academic Press, v.2. p.239-270, 1984.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. **Aplicação de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Embrapa: agroindústria tropical, 2008

GALASSI, S.; PROVINI, A. ; MANGIAPAN, S. ; BENFENATI, E. Alachlor and its metabolites in surface water. **Chemosphere**, v.32, n.2, p.229-237, 1996

GALLO, M. A.; LAWRYK, N. J. **The Handbook of Pesticide Toxicology**; W. J. Jr.; Laws, E. R. Jr., eds.; Academic Press: San Diego, CA, p. 920, 1990.

GIL, S. E.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química nova**, v.22, n.6, p.874-880, 1999.

GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.; DOMÍNGUEZ, E.; EMNÉUS, J. Immobilized enzyme reactors: developmental, practical and theoretical considerations In: **Analytical applications of immobilized enzyme reactors**. 1<sup>o</sup> ed. London Blackie Academic and Professional, p. 1-19, 1994

GUERRIERI, A.; PALMISNO, F. An Acetylcholinesterase/Choline Oxidase-Based Amperometric Biosensor as a Liquid Chromatography Detector for Acetylcholine and Choline Determination in Brain Tissue Homogenates. **Analytical Chemistry**, v.73, n.13, p. 2875-2882, 2001.

GUILBAULT, G. G.; SULEIMAN, A. A.; FATIBELLO-FILHO, O & NABI RAHNI, M. A. "Immobilized Bioelectrochemical Sensors" IN: **Bioinstrumentation and Biosensor**, WISE, D. L. (Ed). New York, Marcel Dekker, p.659, 1991.

- GULLA, K. C.; GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G. Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.133-139, 2002.
- GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Interamericana Ltda, Rio de Janeiro p.475, 1984.
- HASSET, P.T; LEE, F.G. Modeling of pesticides in aqueous environment. In: HAQUE. R; FREED, W. H., eds. **Environmental Dynamics of Pesticide**. New York, Plenum Press. p.173-184, 1975.
- HATRIK, S.; TEKEL, J. Extration methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v.733, p. 217-233, 1996
- HOLLINGWORTH, R. M. **Insecticides biochemistry and physiology**; Wilkinson, C. F., ed.; New York: Plenum, p. 431, 1976.
- HOSEA, N. A.; BERMAN, H. A.; TAYLOR, P. Specificity and orientation of trigonal carboxi esters and tetrahedral alkilphosphonyl esters in cholinesterases. **Biochemistry**, v. 34, p. 11528-11536, 1995
- IVANOV, A. N.; EVTUGYN, G. A.; GYURCSANYI, R. E.; TÓTH, K.; BUDNIKOV, H. C. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. **Analytica Chimica Acta**, v.404. p. 55-65, 2000.
- JAMAL, A. G.; HANSEN, S.; JULU, P. O. O.; Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity **Toxicology**. v.181-182, p.23-33, 2002.
- JAN, R. M.; SHAH, J.; KHAN, H. Investigation of new indirect spectrophotometric method for the determination of carbofuran in carbamate pesticides. **Chemosphere**, v.52, n.9, p.1623-1626, 2003.
- JOKANOVIC M.; Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, p.139-160, 2001.
- KARUBE, I., NOMURA, Y.; ARIKAMA, Y.; Biosensors for environmental-control. **Trends in Analytica Chemistry**, v.14, n.7, p.295-299, 1995

- KARCZMAR, A.; Anticholinesterases : dramatic aspect of their use and misuse. **Neurochemistry International**, v. 32, p.401-414,. 1998.
- KEY, B. P.; FUTON, H. M.; **Pesticide. Biochemistry. Physiology**, v.72, p. 186, 2002.
- KINGSTON, H. M. & KINGSTON, M. L. "Nomenclature in laboratory robotics and automation". The **Journal of Automatic. Chemistry.**, v.16, n.2, p. 43-57, 1994.
- KLOCHER, J. A.; HU, M. Y.; CHIU, S. F.; KUBO, I.; **Phytochemistry** v.30, p.1800. 1991.
- KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LINHART, S. M. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. **The Science Total Environment**, v.224, p.115-122, 2000.
- KOSOLAPOFF, G. M.; Maier, L.; **Organic Phosphorus Compounds**, Wiley-Interscience: New York, 1972-1974.
- KOVACS, M.F. Regulatory aspects of bound residues (chemistry). **Residue Review.**, v.97, p.1-17, 1986.
- KRALJ, M. B.; FRANKO, M.; TREBSE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides – Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. **Chemosphere**. v. 67, p. 99-107, 2007.
- KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; VIEIRA, J. A; BLANCO, T. & GERVASIO, A. P.G. Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p 372-379, 1997.
- KUBÁN, V.; DASGUPTA, P. Comparison of photometry and conductometry for the determination of total carbonate by gas permeation flow injection analysis. **Talanta**, v. 40, n.6, p. 831-840, 1993
- LAM, S.; MALIKIN, G. **Analytical Applications of Immobilized Enzyme Reactors**, Blackie Academic & Professional, 276p, 1994.
- LARA,W.H.;BATISTA,G.C. Pesticidas. **Química nova**, v.15, n.2 , p.161-166, 1992

- LÁZARO, F.; CASTRO, M. D. L. Gás diffusion flow injection analysis: applications and trends. **Analisis**, v. 16, n.4, p. 216-220, 1988
- LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**. 2a ed. São Paulo, Savier, 839p, 1995.
- LEITE, O.D. Tese de Doutorado apresentado junto programa de pós-graduação em Química DQ-UFSCar, com o Título: **Desenvolvimento e aplicação de procedimentos envolvendo reações quimiluminescente em fluxo para a determinação de analitos de interesse alimentício, farmacêutico e bioquímico**. São Carlos, 135p, 2005.
- LEON-GONZALEZ, M.E; TOWNSHEND, A. Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, n.2, p.267-272, 1990.
- LICHTENSTEIN, E.P. Bound residues in soils and transfer of soil residues in crops. **Residue Review**,v.76, p.147-153, 1980.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**. V.22, n.2, p.229-243, 1999.
- LUCHINI,L.C. **Degradação do inseticida paration etílico em diversas matrizes ambientais por meio de radiação ionizante gama do Cobalto-60**. São Carlos, 1995. 124 p. Tese (Doutorado) IQSC-USP
- MARICONI, F. A. M.; **Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas**, 5ª ed., Nobel: São Paulo. 1981.
- MARKO-VARGA G.; EMNÉUS, J.; GORTON. L.; RUZGAS, T. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic-compounds. **Trends in Analytica Chemistry**, v.14, p.319, 1995.
- MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**. V. 31, n.7, p. 1791-1799, 2008.
- MERK & Co. Whitehouse Station, NJ, USA, 1997
- MORGAN, C.L.; NEWMAN, D.J.; PRINCE, C.P., Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine **Clinical Chemistry**, v.42, p.193-198, 1996

- MORITA, M.; KUMARAN, S. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. **Talanta**. v. 42, n.4. p.649-655, 1995.
- NARDI, N. B.; ONSTEN, T.G.H.; **Ciência Hoje**, v.41, p.48-51, 1988.
- NATH, B. S.; KUMAR, R. P. S.; **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, p.157-163. 1999.
- NISTOR, C.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v.38, p.309-326, 1999.
- NUNES, S. N.; JEANTY, G.; MARTY, J-L.; Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p.107-115, 2004.
- NUNES, G. S.; TOSCANO, I. A.; BARCELÓ. D.; Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. **Trends in Analytical Chemistry**. v.17, p.79-84, 1998.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE(OPAS).; **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1997, 69p.
- OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO, S. A. S. Quantificação do pesticida diclorvos por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. **Química Nova**. V. 27, n.6, p. 911-915, 2004
- PADILHA, S.; WILSON, V. Z.; BUSHNELL, P. J.; **Toxicology**, v.92, p.11-23. 1994.
- PATEL, P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 21, p.96-114, 2002
- POGAČNIK, L.; FRANKO, M. Optimisation of FIA system for detection of organophosphorus and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition. **Talanta**, v.54, p.631-641, 2001.
- RAO, P.S.C; MANSELL, R.S.; BALDWIN, L.B; LAURENT, M.F. Pesticides and their behaviour in soil and water. **Soil Science Fact Sheet**, 40, 1983

- REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M.; A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**. V. 12, n. 1, p. 82-91, 1989
- REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**. V. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.
- RICCARDI, S. C.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v.25, n.2, p.316-320, 2002
- RICHARDSON, M.; Pesticides – Friend or foe?. **Water Science and Technology** v.37, n.8, p.19-25, 1998.
- RODRIGUES, T. R. Tese de Doutorado apresentado junto IQ-UNICAMP, com o título: **Desenvolvimento de métodos enzimáticos em fluxo para a determinação quantitativa de acetilcolina e de paraoxon**. Campinas, 125p, 1998
- 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, n.1, p.77-86, 2001.
- RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. “Flow injection analysis. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis”. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- SAID, S.; PIETRO, R., C. L. R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**, Livraria e Editora Eventos, Rio de Janeiro, 121, 2002.
- SAKKAS, V. A.; LAMBROPOULOU, D. A.; SAKELLARIDES, T. M.; ALBANIS, T. A.; **Analytica Chimica Acta**, v.467, p.233, 2002.
- SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, n.1, p.159-170, 2007.
- SCRIBAN, R. **Biotecnologia**, São Paulo, ed. Manole, 489p, 1985.
- <http://www.sindag.com.br> Acesso em 23/05/2009

- SKLÁDAL, P.; KALAB, T. Disposable multichannel immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using acetylcholinesterase as an enzyme label. **Electroanalysis**. v.9, n.4, p.293-297, 1997.
- SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 . ed. Porto Alegre, Editora Bookman, 2002. 836p.
- SKOTTRUPA, P. D.; NICOLAISENB, M.; JUSTESEN, A. F. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 339-348, 2008.
- STEIN, K.; SCHWEDT, G. Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, p. 73-81, 1993
- STRYER, L., **Bioquímica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 976p, 1990.
- SVITEL, J.; MIERTUS, S.; Development of tyrosinase based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. **Environmental Science Technology**. v.32, n.6, p.828-832, 1998.
- THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensor: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, p. 121-131, 2001.
- THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S.; **Pure Applied Chemistry**, v.71, p.2333-2342, 1999.
- TOSCANO, I. A. S.; NUNES, G. S.; SKALÁDAL, P.; YAMANAKA, H.; BARCELÓ, D. Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based and chromatographic techniques. **Analytical Chimica Acta**, v.362, p.59-68, 1998.
- TOSCANO, I. A. S.; RIBEIRO, M. L.; ROCHA, J. C.; NUNES, G. S.; BARCELÓ, D. Determinação de carbaril utilizando testes ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e CLAE com detecção por arranjo de diodos. **Química Nova**, v.23, n.4, p.466-471, 2000.

- TRYZELL, R.; KARLBERG, B. Efficiency and response studies on gás diffusion manifolds in flow-injection systems. **Analytical Chimica Acta**, v.308, p.206-213, 1995
- TSUJI. A.; MAEDA, M.; ARAKAWA, H.; **Analitycal Science**, v.5, p.497-506, 1989.
- TUBINO, M.; BARROS, F. G. Uma válvula introdutora de amostra para análise por injeção em fluxo. **Química Nova**. V.14, n. 1, p. 49-51, 1991.
- U. S. EPA, **Summary of the ricks and uses of Organophosphate Methyl Parathion**, <http://www.epa.gov/pesticides/op/methylparathion> Acesso em 23/02/2006.
- VANIN, J. A.; ALCANTARA, M. R. Armas Químicas. **Química Nova**. v.15, n.1, p. 62-72, 1992.
- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P.; Gosman, G.; De Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; 1ª ed.; UFSC e UFRGS: Florianópolis/Porto Alegre, 1999.
- VOET, D.; VOET, J. D.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre. Artmed Editora, 931p, 2000.
- WATSON, J. T. **Introduction to mass spectrometry**. Philadelphia, lippincott-Raven, 1997.
- WEETALL, H. Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. n. 41, p.157-188, 1993
- WINDMOLLER, D. **Pervaporção pressurizada**. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- WOLFBEIS, O. S. Fiber optic chemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**,v.72, n.12, p.81R-89R, 2000
- WONG, L.; RADIE, Z.; BRUGGERMANN, R. J. M.; HOSEA, N.; BERMAN, H. A.; TAYLOR, P.; **Biochemistry**, v.39, p.5750-5757, 2000

- ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. Classificação e definição dos métodos de análise de fluxo (recomendações – IUPAC 1994). **Química Nova**. V.22, n. 1, p. 143-146, 1999.
- ZAITSEV, V. N; COLOMIETS, L. I; ELSKKAYA, A. Y; SKOPENKO, V. V; EVANS, J. Covalent immobilization of immoglobulin on a water surface for immunosensor bioselective matrix construction. **Analytical Chimica Acta**, v.252, p.1-6, 1991.
- ZAMBRONE, F.A.D. **Ciência hoje**. Revista SBPC , v.4, n.22, p.44-56, 1986
- ZHANG.S.; WRIGHT.G.; YANG .Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v.15, n.5-6, p.273-282, 2000.