



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDRESSA ROSE CASTRO COSTA

DETECÇÃO DE PESTICIDAS NA ATMOSFERA DA PRÉ-AMAZÔNIA  
MARANHENSE: Uso de biossensores acoplados a drones

São Luís

2021

ANDRESSA ROSE CASTRO COSTA

DETECÇÃO DE PESTICIDAS NA ATMOSFERA DA PRÉ-AMAZÔNIA  
MARANHENSE: Uso de biossensores acoplados a drones

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Maranhão, para  
obtenção do título de mestre em Química.

São Luís

2021

**ANDRESSA ROSE CASTRO COSTA**

**DETECÇÃO DE PESTICIDAS NA ATMOSFERA DA PRÉ-AMAZÔNIA  
MARANHENSE: USO DE BIOSSENSORES ACOPLADOS A DRONES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 19/03/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gilvanda Silva Nunes (Orientador-UFMA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Quintino da Rocha (UFMA)  
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Talita da Silva Espósito (UFMA)  
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Costa, Andressa Rose Castro.

DETECÇÃO DE PESTICIDAS NA ATMOSFERA DA PRÉ-AMAZÔNIA  
MARANHENSE: Uso de biossensores acoplados a drones /  
Andressa Rose Castro Costa. - 2021.

81 p.

Orientador(a): Gilvanda Silva Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,  
2021.

1. Acetilcolinesterase. 2. Biossensores enzimáticos.  
3. Monitoramento. 4. Resíduos de organofosforados. I.  
Nunes, Gilvanda Silva. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por sua infinita Graça e misericórdia, por estar comigo em todos os momentos, e por me direcionar sempre ao caminho de luz, através de Sua Palavra;

À Universidade Federal do Maranhão, mediante o Programa de Pós-Graduação em Química, que me deu a oportunidade de crescer acadêmica e cientificamente;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de mestrado concedida, e à Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA, pelo auxílio concedido (Projeto Fapema-Universal – Processo 756/19), fundamentais à execução desse trabalho;

À professora Dr<sup>a</sup> Gilvanda Nunes, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por todo o aprendizado concedido;

Ao professor Dr. Paulo Brasil Marques, pela disponibilidade e cooperação;

À Maria da Graça, por ser meu maior exemplo de coragem e superação;

Aos queridos Gildene, Erasmo, Emanuela, aos meus familiares e a Raylson, pelo incentivo e apoio incondicional em qualquer circunstância. Eu os amo infinitamente;

À Jhuliana, Lucas, Fernando, Amanda, Apoena, e aos demais amigos, pelo companheirismo e apoio. Faltam palavras que descrevam minha gratidão pela vida de cada um;

Gratidão também aos companheiros do NARP, em especial Eliane, Danilo, Djanira e Débora, pela convivência diária e cooperativismo;

Às mulheres e garotas do Projeto Meninas nas Ciências Exatas e Engenharias, pelo convívio durante o desenvolvimento do projeto e toda partilha de conhecimento;

À Suzana pela colaboração;

Aos meus companheiros do curso Elenilse, Mesaque, William, Jhonilson, e Letícia, pelo companheirismo e momentos agradáveis;

Enfim, minha gratidão a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho. Utilizo as palavras de Saint-Exupéry que marcaram minha infância: *“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*.

**Obrigada!**

## RESUMO

Pesticidas organofosforados (OFs) são capazes de combater pragas no cultivo de alimentos, pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A enzima catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor que atua no sistema nervoso autônomo de insetos e mamíferos. O presente trabalho teve como objetivo otimizar biossensores amperométricos e acoplá-los a drone, a fim de detectar resíduos de pesticidas organofosforados (OF's) na atmosfera, em região de cultivo de hortaliças na Pré-Amazônia Maranhense. Biossensores à base de AChE foram preparados em sensor serigrafado à base de grafite, com mediadores eletroquímicos incorporados ao eletrodo de trabalho, como ftalocianina de cobalto (CoPC), azul de meldola combinado com sal de Reinecke serigrafado com 1 camada (MBRS 1X) e duas camadas (MBRS 2X). Foi definido o mediador MBRS 2X com potencial de trabalho fixo em 0,1V versus Ag/AgCl. Os limites de detecção (LD) foram baseados em 10% de inibição relativa (IR) da enzima em curva analítica. Foram determinados OF's clorpirifós, fenitrothion, malation e temefós, cujos valores de LD foram de  $2,4 \times 10^{-2} \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $3,75 \times 10^{-3} \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $9,4 \times 10^{-3} \text{ nmol L}^{-1}$  e  $1,71 \times 10^{-2} \text{ nmol L}^{-1}$ , respectivamente. A repetibilidade na produção dos biossensores e estabilidade foram avaliadas através de estatística por cartas de controle. As medidas para biossensores produzidos em diferentes dias sob mesmas condições, apresentaram-se de acordo com o controle estatístico. Com biossensores acoplados a drone, foi detectado resíduos de OF's em ~ 50m de altitude por tempo de 5 minutos de sobrevoo, do período de novembro/2020 a fevereiro/2021 em dois pontos de produção agrícola. Os valores determinados de IR variaram de  $6,98 \pm 0,98\%$  a  $57 \pm 0,48\%$ , em relação ao período de amostragem. A aplicação de biossensores para monitoramento de resíduos de OFs através de acoplamento ao drone é uma estratégia inovadora. Estes resíduos podem ser transportados por correntes atmosféricas e contribuem para o declínio de populações de insetos não-alvo, incluindo abelhas polinizadoras.

**Palavras- chave:** Acetilcolinesterase, Biossensores enzimáticos, Monitoramento, Resíduos de organofosforados.

## ABSTRACT

Organophosphate pesticides (OFs) are able to fight pests in food cultivation, by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The enzyme catalyzes the hydrolysis of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter that acts on the autonomic nervous system of insects and mammals. The present work had to monitor the presence of OF's pesticides in the atmosphere, in a vegetable growing region in the Pre-Amazon region of Maranhão. For this, previously tested amperometric biosensors were coupled to a drone. Enzymatic biosensors were prepared using a graphite-based screen printed electrode, with electrochemical mediators such as cobalt phthalocyanine (CoPC), meldonia blue combined with Reinecke salt screen-printed with 1 layer (MBRS 1X) and two layers (MBRS2X) incorporated into the working electrode. Electrochemical characterization was performed, with the MBRS 2X mediator being defined with a fixed potential of 0.1V versus Ag / AgCl. The detection limits, based on the inhibition curves and considering 10% relative inhibition were:  $2.4 \times 10^{-2}$  nmol L<sup>-1</sup>,  $3.75 \times 10^{-3}$  nmol L<sup>-1</sup>,  $9.4 \times 10^{-3}$  nmol L<sup>-1</sup> and  $1.71 \times 10^{-2}$  nmol L<sup>-1</sup>, for chlorpyrifos, fenitrothion, malathion and temephos, respectively. The biosensors showed stability and high repeatability in production, through control chart statistics. With biosensors coupled to a drone, OF's residues were detected at ~50m altitude for a 5 min flyover period, from November/2020 to February/2021 at two points of agricultural production. The determined values of relative inhibition ranged from 6,98±0,98% to 57±0,48%, in relation to the sampling period. The application of biosensors to monitor OFs residues is an innovative strategy. These residues can be transported by atmospheric currents and contribute to the decline of non-target insect populations, including pollinating bees.

**Keywords:** Acetylcholinesterase, Enzymatic biosensors, Monitoring, Organophosphate residues.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos pesticidas.....	20
<b>Tabela 2.</b> Reagentes e proporções obtidas para preparo da pasta enzimática utilizada no preparo do biossensor.....	32
<b>Tabela 3</b> Valores obtidos pelo método de Ellman para atividade enzimática da AChE.....	37
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros cinéticos para a reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE).....	39
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros cinéticos obtidos durante a hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE), na ausência e na presença dos inibidores.....	41
<b>Tabela 6.</b> Linearidade e sensibilidade do biossensor otimizado, frente aos pesticidas organofosforados selecionados.....	53
<b>Tabela 7.</b> Comparativo entre o sistema biossensor otimizado no presente trabalho e outros registrados na literatura.....	55
<b>Tabela 8.</b> Correlação linear e sensibilidade do biossensor, considerando a detecção mediante inibição em atmosfera artificial.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Registro de princípios ativos concedidos no Brasil de 2005-2020.....	18
<b>Figura 2.</b> Pesticidas organofosforados selecionados para o presente estudo.....	20
<b>Figura 3.</b> Componentes do eletrodo serigrafado e interação de mediador eletroquímico.....	24
<b>Figura 4.</b> Reações para (A) síntese e (B) hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh).....	26
<b>Figura 5.</b> Gráfico de (A) Michaelis- Menten e (B) Lineweaver-Burk.....	27
<b>Figura 6.</b> Esquema para reação proposta pelo método de Ellman et al., (1961) .....	29
<b>Figura 7.</b> Esquema de simulação da aplicação de pesticida em atmosfera controlada.....	35
<b>Figura 8.</b> Cinética da reação de hidrólise de acetiltiocolina (ATCh), catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE).....	38
<b>Figura 9.</b> Representação de Lineweaver-Burk para a hidrólise de acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE).....	39
<b>Figura 10.</b> Representação de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE), em presença dos inibidores (inseticidas organofosforados) .....	40
<b>Figura 11.</b> Representação de Lineweaver-Burk para a hidrólise de ATCh pela enzima acetilcolinesterase em presença de inibidores.....	42
<b>Figura 12.</b> Voltamogramas cíclicos referentes aos sensores (A) e biossensores (B) com os respectivos mediadores eletroquímicos. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; velocidade de varredura: 50mVs <sup>-1</sup> ; número de scans: 10; faixa de potencial de -0,8 a 0,8 V.....	43
<b>Figura 13.</b> Voltamogramas cíclicos dos biossensores sem mediador (A) e com os mediadores CoPC (B), azul de Meldola-sal de Reinecken com 1 camada (C) e 2 camadas (D), em meio reacional contendo o substrato ATCh 2 mmol L <sup>-1</sup> . Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; velocidade de varredura: 50 mVs <sup>-1</sup> ; número de scans: 10; pH 7,2 (tamponado com PBS) .....	45
<b>Figura 14.</b> Voltamogramas de pulso diferencial dos biossensores contendo o mediador azul de Meldola-sal de Reinecken 1 camada (MBRS 1X) e 2 camadas (MBRS 2X em meio reacional contendo o substrato ATCh 2 mmol L <sup>-1</sup> . Condições operacionais: tempo de estabilização: 5 s;	

amplitude de modulação: 50 mVs <sup>-1</sup> ; tempo de modulação: 0,015s; pH 7,2 (tamponado com PBS) .....	47
<b>Figura 15.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para o sensor de grafite modificado com azul de Meldola-sal de Reinecken, serigrafado em duas camadas (MBRS 2X), com e sem a enzima AChE, obtidos em presença do par redox ferri/ferrocianeto de potássio a 5 mmol L <sup>-1</sup> .....	48
<b>Figura 16.</b> Curva analítica para concentração de substrato. Inserido: Voltamograma de pulso diferencial do biossensor Grafite/MBRS 2X/ AChE em função da variação na concentração de substrato ATCh. Condições operacionais: tempo de estabilização: 5 s; amplitude de modulação: 50mVs <sup>-1</sup> ; tempo de modulação: 0,015s.....	49
<b>Figura 17.</b> Esquema de inibição “chave-fechadura” da enzima AChE, mediante monitoramento cronoamperométrico da corrente gerada, antes e após incubação do biossensor na solução contendo o pesticida (inibidor).....	51
<b>Figura 18.</b> Amperogramas que deram origem às curvas analíticas para os inseticidas organofosfoados clorpirifós (A), fenitrothion (B), malation (C) e temefós (D). E destaque, a região linear de cada curva.....	52
<b>Figura 19.</b> Curvas de inibição para os pesticidas organofosforados, obtidas em atmosfera artificialmente produzida.....	57
<b>Figura 20.</b> Mapa da área de plantio, localizada na Pré-Amazônia Maranhense, na qual foram estabelecidos os dois pontos de amostragem atmosférica.....	60
<b>Figura 21.</b> Detecção de pesticidas inibidores da enzima acetilcolinesterase no ambiente atmosférico de regiões agrícolas da Pré-Amazônia Maranhense, mediante uso de biossensores acoplados a drones. Período: novembro/2020 a fevereiro/2021. IR = inibição relativa (n=2) .....	61
<b>Figura 22.</b> Carta de controle para avaliação da repetibilidade na produção de 10 biossensores preparados sob mesmas condições em diferentes dias (n=3) .....	64
<b>Figura 23.</b> Carta de controle para avaliar estabilidade de único biossensor para medidas em diferentes dias. (n=3) .....	65

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

AChE - Acetilcolinesterase

ATCh - Acetilcolina

BSA- soroalbumina bovina

CA – Cronoamperometria

CG – Cromatografia gasosa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CoPC – ftalocianina de cobalto

DTNB - 5,5-ditiobis(2-ácidonitrobenzólico)

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Glu – Glutaraldeído

HEC - Hidroetilcelulose

IR – Inibição relativa

K<sub>i</sub> - Constante de inibição

K<sub>M</sub> - Constante de Michaelis- Menten

MBRS 1x - Azul de Meldola combinado com sal Reinecken 1 camada

MBRS 2x - Azul de Meldola combinado com sal Reinecken 2 camadas

OFs - Organofosforados

PBS – Tampão fosfato

TCh – Tiocolina

VC - Voltametria cíclica

VPD – Voltametria de pulso diferencial

V<sub>máx</sub> - Velocidade máxima da reação

UAVs - Veículos Aéreos não tripulados

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Geral</b> .....	16
<b>2.2 Específicos</b> .....	16
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
<b>3.1 Pesticidas</b> .....	17
3.1.1. Breve histórico.....	17
3.1.2. Legislação e classificação de pesticidas .....	19
<b>3.2 Métodos de Detecção de Pesticidas</b> .....	21
3.2.1 Métodos cromatográficos .....	21
3.2.2 Métodos Bioanalíticos .....	22
3.2.2.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	22
3.2.2.2 Biossensores enzimáticos .....	23
<b>3.3 Acetilcolinesterase</b> .....	25
3.3.1 Cinética enzimática.....	26
3.3.2 Inibição enzimática.....	27
3.3.3 Método de Ellman .....	28
<b>3.4 Os Polos de Produção Agrícola da Ilha do Maranhão e o Monitoramento de Pesticidas por Drones</b> .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 Reagentes e Soluções</b> .....	31
<b>4.2 Equipamentos e Acessórios</b> .....	31
<b>4.3 Preparo do Biossensor</b> .....	31
4.3.1 Preparo do Sensor base.....	31
4.3.2 Imobilização enzimática.....	32
<b>4.4 Cinética Enzimática na Ausência e Presença de Inibidor</b> .....	33

<b>4.5 Medidas Eletroquímicas.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6 Ensaio de Inibição Eletroquímica com os Pesticidas OFs .....</b>	<b>34</b>
4.6.1 Construção das curvas de inibição .....	34
4.6.2 Ensaio de inibição em ambiente atmosférico artificial.....	35
4.6.3 Repetibilidade das medidas: estabilidade dos biossensores.....	35
<b>4.7 Monitoramento de Resíduos de Pesticidas nas Atmosferas de Regiões Agrícolas....</b>	<b>36</b>
<b>4.8 Tratamento de Dados.....</b>	<b>36</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Cinética Enzimática.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2 Potencial Inibidor Dos Inseticidas Ofs Seleccionados.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Caracterização Do Biossensor .....</b>	<b>42</b>
5.3.1 Comportamento eletroquímico dos mediadores .....	42
5.3.2 Comportamento eletroquímico em presença de substrato ATCh.....	488
<b>5.4 Ensaios Cronoamperométricos de Inibição pelos OFs.....</b>	<b>50</b>
5.4.1 Curvas analíticas em meio aquoso.....	50
5.4.2 Curva analítica para determinação de pesticidas em ambiente controlado.....	56
<b>5.5 Determinação de Resíduos de Inibidores da AChE em Atmosfera Natural da Pré- Amazônia Maranhense .....</b>	<b>59</b>
<b>5.6 Estabilidade dos Biossensores.....</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas agrícolas, com o advento da síntese e aplicação de inseticidas, torna possível a potencialização de produção de alimentos com perdas mínimas; porém, trouxe algumas consequências desastrosas ao ambiente, e por consequência, à saúde humana (SHABAN; ABDU; HASSAN, 2016).

Existem alguns agravantes que contribuem para a poluição atmosférica através de resíduos de pesticidas, dos quais Silva e colaboradores (2016) destacam como: dificuldade no acesso à informação especificamente sobre o manuseio dessas substâncias e condições climáticas na região de aplicação. Estes são fatores que contribuem para a dispersão excessiva e arraste de gotículas durante a pulverização de pesticidas nas lavouras, perpassando as correntes de ar. Isso acarreta a mortalidade de insetos não-alvo, com enfoque no declínio da população de abelhas, responsáveis pela polinização na agricultura (PIRES et al., 2016).

O Brasil é considerado um dos países com maior produção de alimentos do mundo, e consequentemente, destaca-se pela utilização de agrotóxicos, que, de acordo com o Boletim de Vendas de Agrotóxicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, registrou aumento de cerca de 12,97% nas vendas dos ingredientes ativos em 2019 em relação a 2018, sente este o relatório mais atual publicado. Acerca de tais vendas, esse percentual correspondendo aproximadamente 621 mil toneladas, dos quais destacam-se os ingredientes ativos: Glifosato, Acefato, Atrazina, Malation, Clorpirifós, etc. (IBAMA, 2021).

Dentre os princípios ativos, tem-se os organofosforados (OFs), cujos riscos causados devido aos efeitos tóxicos nos seres vivos e persistência no ambiente, são amplamente reportados na literatura, visto que essas substâncias possuem tempo de meia vida de décadas, e são facilmente transportados através da chuva e vento (SGOBBI, 2016). Deve-se ressaltar que sobre os efeitos tóxicos que esses inseticidas provocam, se dão através dos distúrbios ao sistema nervoso central, por meio da inibição de atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que atua diretamente em funções cerebrais (LI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2011).

A detecção de resíduos de pesticidas tem sido realizada por técnicas cromatográficas tanto nos alimentos quanto em amostras ambientais, devido a sua alta precisão analítica. Resíduos de pesticidas de diferentes classes, como organoclorados e organofosforados, foram determinados em amostras oriundas atmosfera, a fim de avaliar a qualidade do ar (OLIVERO-VERBEL, et al. 2021; YU et al, 2020; KIM; LEE; KIM, 2019).

Embora tais métodos para análises sejam eficazes, apresentam alto custo e envolvem laboriosos procedimentos de preparo de amostra, além da inviabilidade da detecção *in situ* em caso de suspeita de contaminação por OFs (SGOBBI, 2016). Nesse contexto, a aplicação de biossensores eletroquímicos tem sido uma alternativa promissora no monitoramento de processos bioquímicos, como por exemplo pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), na detecção de OFs em água (SILVA, 2016; NUNES et al., 2014; GRIZA, 2008), alimentos (CAMARGO, 2017; DRAGUNSKI, 2007), entre outros.

Algumas características como portabilidade, seletividade, facilidade de automação, bem como menor custo de construção e estocagem, vêm atestando a eficiência aos biossensores, como mencionado por Pundir e Chauhan, (2012). Embora haja determinação de resíduos de OFs em amostras de solo, alimentos, água etc., por biossensores, não há registro de monitoramento desses poluentes na atmosfera.

Dessa forma, foi realizado o monitoramento de resíduos de pesticidas OFs em pontos agrícolas na região da Pré-Amazônia Maranhense. Para tanto, foram desenvolvidos biossensores sensíveis e seletivos baseados na inibição de AChE em presença de tais substâncias. A detecção ocorreu através do acoplamento deste dispositivo a um drone (veículo aéreo não tripulado - UAV), possibilitando a análise assistida e em tempo real.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Otimizar biossensores amperométricos e acoplá-los a drone, a fim de detectar resíduos de pesticidas organofosforados na atmosfera de áreas agrícolas da Pré-Amazônia Maranhense.

### **2.2 Específicos**

- ✓ Realizar estudos cinéticos de inibição da enzima AChE por inseticidas OFs selecionados;
- ✓ Otimizar biossensores amperométricos específicos para a detecção/quantificação dos resíduos de pesticidas organofosforados;
- ✓ Caracterizar os biossensores, mediante escolha do melhor mediador eletroquímico;
- ✓ Determinar algumas figuras de mérito dos biossensores, tais como sensibilidade, exatidão e repetibilidade;
- ✓ Efetuar simulações dos resíduos de pesticidas em ambiente atmosférico artificial, com tomadas de dados em tempo real;
- ✓ Realizar medidas de inibição da AChE por pesticidas OFs, na atmosfera, em áreas agrícolas previamente selecionadas da Pré-Amazônia maranhense.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Pesticidas

##### 3.1.1. Breve histórico

A ação prejudicial de pragas na agricultura tem mobilizado os homens a buscarem alternativas que amenizem os efeitos nocivos, tanto na diminuição da produção alimentícia durante as colheitas, quanto na proliferação de doenças. Esta incidência levou as comunidades agrícolas a utilizarem compostos sulfurados, derivados de arsênio, cloreto de mercúrio e sais de cobre, em meados dos séculos XI à XIX (NUNES; RIBEIRO, 1999).

Com o advento do processo de industrialização, e conseqüente avanço tecnológico e científico, diversas substâncias foram sintetizadas com a finalidade de abater pragas em ambiente agrícola. Então, na década de 1930 o DDT, diclorodifenil-tricloroetano, apresentou maior eficiência inseticida, e abriu precedentes para desenvolvimento de demais compostos à base de cloro (NUNES; RIBEIRO, 1999). O emprego desses compostos gerou aumento na produtividade, garantindo o aumento da demanda alimentícia (RÊGO, 2015).

Entretanto, é considerado como marco para o ambientalismo contemporâneo a publicação do livro *Primavera silenciosa*, de autoria da norte-americana Rachel Carson, em 1962. Neste, a autora aborda a conscientização sobre os riscos de pesticidas para a biodiversidade, através da mortalidade não somente dos insetos-alvo, como também de demais espécies, incluindo a humana (RÊGO, 2015; CARVALHO et al., 2017). Desde então, as pesquisas têm alertado quanto ao uso indiscriminado de pesticidas, garantindo a proibição de substâncias exigentes em detrimento de novas, cujos efeitos são menos nocivos (CARVALHO et al., 2017).

No Brasil, o aumento da produtividade ficou conhecido por “modernização agrícola”, dando início por volta das décadas de 1960 e 1970, viabilizando a mecanização do campo, o agronegócio de exportação e consumo das substâncias (CALDAS, et al. 2011). No Brasil há aproximadamente mais de duas mil formulações comercializadas, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2009). Entretanto, tem ocorrido liberação demasiada de princípios ativos, resultando em maior número de formulações comercializadas. A Figura 1 demonstra o drástico acréscimo de princípios ativos liberados recentemente no Brasil.



**Figura 1.** Registro de princípios ativos concedidos no Brasil de 2005-2020. Fonte: BRASIL (2021).

Notoriamente, o aumento significativo na quantidade de registros concedidos, embora o uso desses produtos químicos tenha funcionalidade, é evidente que a persistência no ambiente tem gerado efeitos irreparáveis em diversas esferas. Resíduos de defensivos agrícolas podem ser transportados por correntes atmosféricas, bem como meios aquáticos, atingido aquíferos, lagos e rios (BASTOS, et al. 2012; SOUZA, et al. 2017).

### 3.1.2. Legislação e classificação de pesticidas

Decretada em 1989, a lei conhecida como Lei dos Agrotóxicos nº 7.802 (BRASIL, 1989, art. 5º), regulamentada através do Decreto nº 98.916, possibilitou maior rigor em relação à concessão de registros aos agrotóxicos novos ou já existentes, permitindo a proibição de substâncias mediante a comprobabilidade de efeitos nocivos. A nova estrutura atribuiu responsabilidade pela avaliação dos produtos quanto sua a eficácia agrônômica ao Ministério da Agricultura. Já em relação aos riscos à saúde cabe a avaliação à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, ligada ao Ministério da Saúde. Enquanto para risco ao ambiente cabe ao IBAMA a avaliação. Foi proposto que o termo “agrotóxico”, pela lei nº 4.074 de 2002 (BRASIL, 2002), fosse substituído por ‘defensivo fitossanitário e produtos de controle ambiental’ devido ao termo antecessor ser considerado depreciativo (SILVA, 2019).

Com o passar dos anos, houve a tendência em desregulamentar a Lei dos Agrotóxicos, haja vista que foi criada a Comissão Especial com objetivo de reformulá-la (PL 3200/2015), flexibilizando as normas para fiscalização e continuidade no uso dos produtos ainda que os malefícios deste sejam conhecidos, causando vários desacordos entre entidades envolvidas. Com a ‘prerrogativa’ de aumento na produção nacional de agrotóxicos, aplicação preventiva em meios de cultura, houve atribuição unilateral do Ministério da Agricultura quanto à utilização de agrotóxicos, como consequente ‘desburocratização’, pois, a autorização de um novo produto antes perpassa por órgãos regulamentadores a partir dos padrões da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) (ALMEIDA, et al. 2017; SILVA, 2019).

A classificação dos agrotóxicos dá-se de acordo com os seus efeitos agudos, devendo constar em rótulos o seu grau de periculosidade, como consta na Tabela 1 (RÊGO, 2015 *apud* THUSWOHL, 2013). A dose letal (DL<sub>50</sub>) é a medida utilizada para averiguar a exposição de certa população de animais em relação a algum agente tóxico, causando a morte de 50% do

grupo, sendo expressa pela massa do agente tóxico inoculado, em miligramas, dividida pela massa corporal do indivíduo, em kg.

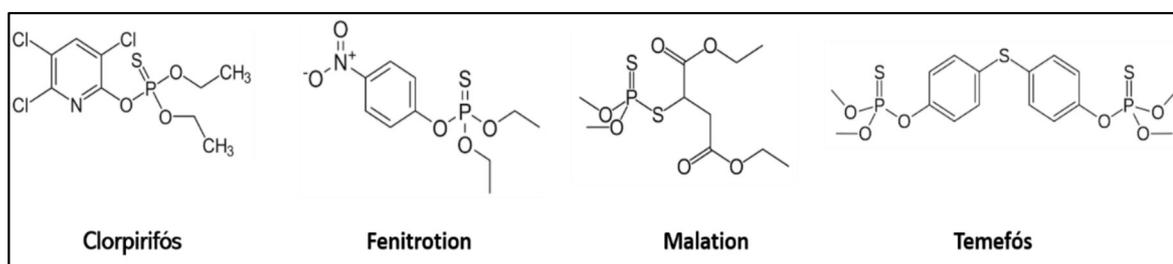
**Tabela 1.** Classificação dos pesticidas

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL <sub>50</sub>	Faixa Colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 50 mg kg <sup>-1</sup>	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg kg <sup>-1</sup>	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg kg <sup>-1</sup>	Azul
IV	Pouco tóxico Muito pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg kg <sup>-1</sup> Acima de 5000 mg kg <sup>-1</sup>	Verde

Fonte: Rêgo (2015) *apud* Thuswohl (2013).

Os pesticidas podem ser também classificados de acordo com suas estruturas químicas e grupos funcionais específicos. Assim, tem-se os pesticidas organoclorados (OCs), organofosforados (OFs), carbamatos (CBMs), triazinas (TRIs) e piretróides (PIRs), entre outros (BASTOS, et al. 2011).

As classificações químicas são provenientes dos grupos de átomos ligados entre si. Demais características físico-químicas como polaridade, volatilização, pressão de vapor etc., referentes à composição dessas substâncias, viabilizam a funcionalidade desses compostos no combate de pragas. (SOUZA, 2017). Desse modo, a Figura 2 demonstra a estrutura molecular de quatro pesticidas organofosforados.



**Figura 2.** Pesticidas organofosforados selecionados para o presente estudo.

Fonte: Autor (2021).

Na fabricação das formulações comercializadas, componentes químicos ativos são combinados com água, solventes e emulsificantes, além de outros constituintes, de forma a

repelir, matar e controlar pragas nos diversos ambientes, tais como agrícolas, jardins, empresas, hospitais e domicílios (KIM et al., 2017; BOLZONELLA et al., 2019).

Cavalcante e colaboradores (2016) comprovam que a exposição à inseticidas via inalação ou ingestão atualmente somam cerca de três milhões de casos no mundo, dos quais 250.000 resultam em morte, principalmente na sociedade agrária pelo manuseio agrícola. Neste sentido, ressalta-se a importância da detecção desses compostos, seja em amostras ambientais ou alimentícias.

### **3.2 Métodos de Detecção de Pesticidas**

#### **3.2.1 Métodos cromatográficos**

As técnicas cromatográficas são as mais empregadas para análises de pesticidas em matrizes como amostras ambientais, água, solos residuais, e alimentos em geral; essas técnicas são padrão para órgãos regulamentadores, devido à detecção sensível e seletiva na separação desses compostos (RÊGO, 2015).

Métodos convencionais para detecção de pesticidas são baseados em cromatografia a gás (CG), e líquida de alta eficiência (CLAE), acoplados a diversos tipos de detectores (HUANG et al., 2018). A CLAE tem sido a técnica mais utilizada na determinação de várias classes de pesticidas, incluindo organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros (SGOBBI, 2012).

Duas principais etapas configuram as análises de resíduos de pesticidas: a primeira consiste na extração dos analitos-alvo a partir da matriz em análise, podendo ou não ser seguida de uma etapa de purificação para retirar interferentes; a segunda, baseia-se na determinação de compostos a partir de detector específico acoplado ao cromatógrafo (SGOBBI, 2012).

Recentemente, Alves et al. (2020) analisaram possíveis traços de clorpirifós em amostras de alfaces comercializados em feiras no município de Seropédica- RJ, a partir de CLAE com detector por arranjo de diodos (DAD). Em que foi detectado valores elevados em algumas amostras, quando confrontado com a ANVISA.

Coleone et al. (2017), detectaram malation em amostras de solo e água, devido a pulverização deste em ultrabaixo volume (UBV) no combate do inseto *Aedes aegypti*, vetor de diversas doenças. Para tanto foi utilizada CLAE acoplada a detector UV-Vis, cujos limites de detecção foram de  $0,017 \mu\text{g mL}^{-1}$  e quantificação  $0,051 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

YU et al. (2019) realizaram estudo acerca da qualidade do ar e o risco de câncer em sete pontos do litoral da China, através de análise por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa para determinação de pesticidas organoclorados (OCs) na região.

### 3.2.2 Métodos bioanalíticos

Apesar dos baixos limites de detecção (LOD), boa seletividade e elevada precisão na determinação de pesticidas, mediante técnicas cromatográfica, há maior complexidade nas análises, o que exige elevado grau de tratamento (BIN et al., 2018). Por exigirem reagentes com alta pureza, pré-tratamento de amostra, equipamentos com alto custo de operação e inviabilidade de análises *in loco*, novas ferramentas vêm sendo desenvolvidas, com intuito de promoverem limites de detecção adequados com menor custo de operação (LANG et al., 2016). A alternativa viável tem sido, portanto, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos. Assim, destacam-se métodos ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), luminescência eletroquímica, eletroforese capilar, além de sensores e biossensores (JIANG et al., 2018).

#### 3.2.2.1 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

A técnica de ensaio imunoenzimático foi desenvolvida em 1971 (TOH et al., 2015), e consiste em detectar uma molécula-alvo através da interação que ocorre a partir de um antígeno imobilizado em uma superfície, geralmente de placa de microtitulação de 96 cavidades. Tal antígeno forma um complexo por ligação com seu anticorpo específico, que depois também é capaz de interagir com o anticorpo de detecção ligado a uma enzima. Dessa forma, haverá interação da enzima com o respectivo substrato, e a intensidade da cor oriunda da reação é medida espectrofotometricamente, permitindo a quantificação do anticorpo (GAN; PATEL, 2013; TOSCANO et al., 2000).

Com efeito, todo imunoensaio é proposto para detectar um único analito com alta especificidade, sendo considerado eficiente devido à praticidade na determinação, principalmente por permitir análise simultânea de várias amostras com economia de reagentes e consequente diminuição na produção de resíduos (TELES, 2015).

Nas últimas décadas, kits de ELISA têm sido elaborados e comercializados objetivando a determinação de atividade da AChE em diversas matrizes, mas principalmente com foco na avaliação da intoxicação de indivíduos por OFs. O princípio do método colorimétrico baseia-se na reação através do método de Ellman, que será abordado posteriormente (MAFTOUH et

al, 2020). Empresas como Elabscience, Leaclab, entre outras, têm comercializado os kits ELISA para esse fim.

### 3.2.2.2 Biossensores enzimáticos

O princípio dos biossensores está no reconhecimento biológico por meio de receptores-transdutores que fornecerem um sinal analítico (ASTURIAS-ARRIBAS et al., 2013). O desenvolvimento de um biossensor depende do direcionamento biológico, das especificidades de detecção de substâncias e suas interações, de modo que podem ser empregados, na superfície desses transdutores, anticorpos, DNA, enzimas, organelas, entre outros elementos de biorreconhecimento (GRIEP, 2018).

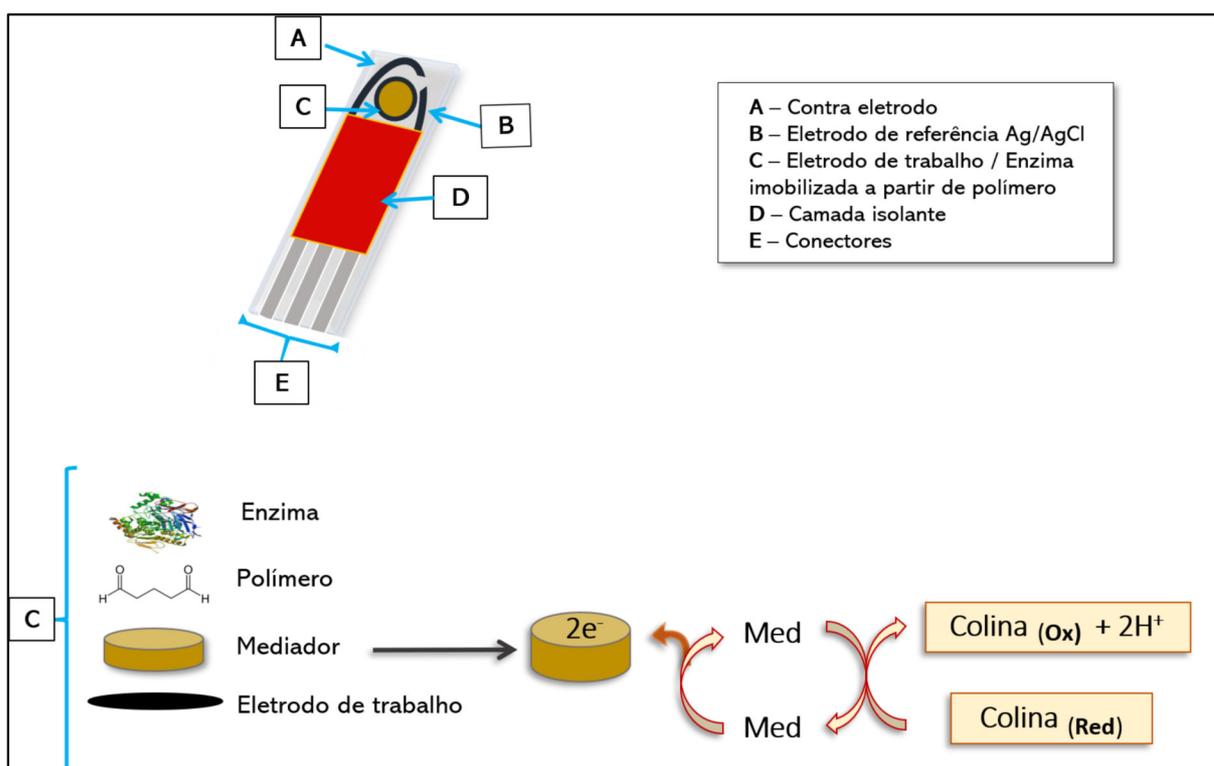
As enzimas, como proteínas responsáveis pela catálise das mais variadas reações biológicas, são mencionadas por Araújo et al. (2016) como biomoléculas mais notáveis no que se refere à sensibilidade para detecção de substâncias poluentes. Grande enfoque tem sido dado aos biossensores voltados para a inibição da enzima AChE, devido à sua especificidade e poder catalítico, sendo material biológico promissor na montagem desses dispositivos. Muitos biossensores à base de AChE são propostos para detecção de inseticidas OFs com alta sensibilidade e rapidez analítica (KUMAR et al., 2019; BIN et al., 2018; SOUTO, 2016; SILVA, 2016).

O processo de funcionamento dos biossensores eletroquímicos à base de AChE dá-se pelo monitoramento da atividade catalítica da enzima, ao hidrolisar seu substrato, a acetilcolina (ACh), que produz um pico equivalente à oxidação da tiocolina (TCh). Assim, em contato com inseticidas, dependendo da concentração destes e do tempo de incubação, ocorrerá a inibição irreversível da enzima, resultando na diminuição de resposta da produção de TCh. O pico de oxidação torna-se, assim, um marcador eletroanalítico para tal detecção, e pode ser monitorado através de técnicas eletroquímicas como Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) ou Cronoamperometria (CA) (CHAE, et al., 2018; JIANG et al., 2018; SOUTO, 2016; SILVA, 2016; NUNES, 2014).

Para garantir melhores condições de funcionamento dos biossensores e maior sensibilidade, há certa variedade quanto ao método de imobilização da AChE na superfície do eletrodo de trabalho (BIN et al., 2018). A incorporação de mediadores eletroquímicos facilita também a transferência de elétrons para o transdutor, modificando de forma crucial a resposta do biossensor (IVANOV et al., 2019). O uso de mediadores eletroquímicos tem garantido o

melhoramento significativo na versatilidade de construção dos sistemas biossensores (RUEDA, 2016). Entre os mediadores eletroquímicos mais usados, destacam-se ftalocianina de cobalto (CoPC), tetracianoquinodimetano (TCNQ), Azul de Meldola (MB), entre outros. Com adição destes e a enzima incorporada ao eletrodo de trabalho, o potencial de trabalho passou então a ser em função deste mediador e não mais dos substratos empregados ou dos reagentes gerados no meio reacional (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014).

Conforme Rueda et al. (2016), os mediadores participam do processo de geração de corrente elétrica, uma vez que, no decorrer da hidrólise enzimática do substrato, o produto da reação (a colina ou tiocolina) é reduzido, enquanto o mediador é oxidado, gerando corrente elétrica, que é transportada e detectada através do potenciostato. A Figura 3 mostra um tipo de sensor fabricado a partir do processo de serigrafia, no qual se pode ver os três eletrodos e a presença do mediador eletroquímico no eletrodo de trabalho. Esse tipo de sensor será empregado no presente estudo.



**Figura 3.** Componentes do eletrodo serigrafado e interação de mediador eletroquímico  
 Fonte: Autor (2021).

Diversos mecanismos de imobilização da enzima têm sido explorados na produção de biossensores eletroquímicos, desde os mais antigos, como a sua fixação em membranas de nylon (KAREY; SIRBASKU, 1989) e os processos adsortivos, (MOYO; OKONKWO; AGYEI, 2012); como os mais atuais, baseados em ligação cruzada com glutaraldeído (SOUTO, 2016; SILVA, 2016); fotopolimerização em rede polimérica, como as formadas de grupamentos polivinílicos (EL-MOGHAZY et al., 2016; BÉCKER, 2019), entre outros.

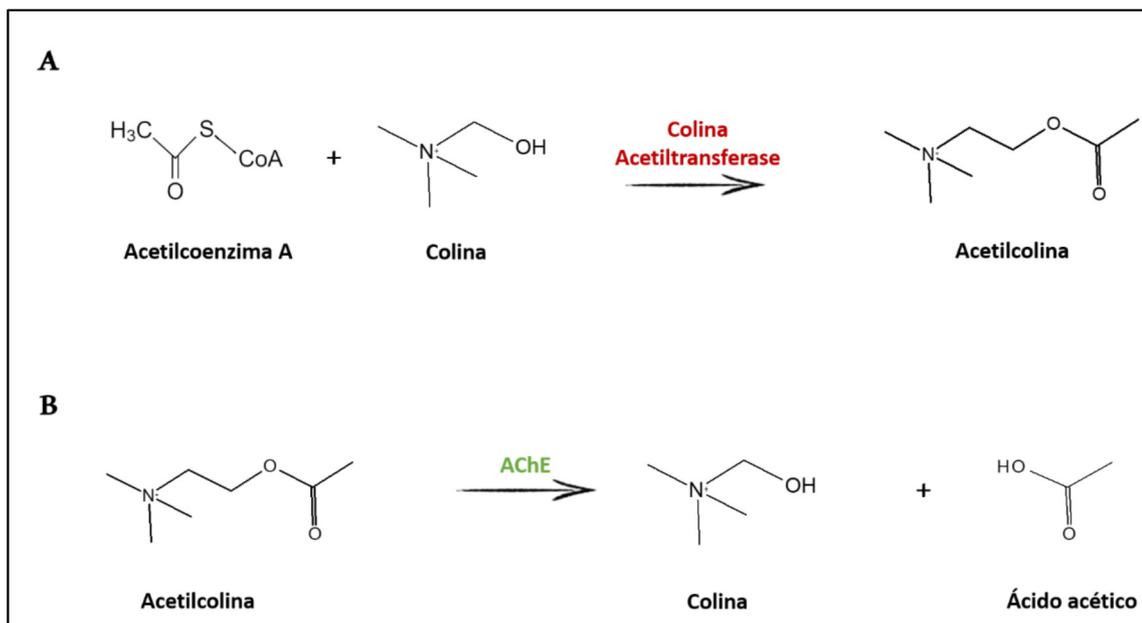
A aplicação de biossensores eletroquímicos têm sido ainda uma alternativa promissora na detecção de OFs pela inibição da AChE, em amostras de água (PEREIRA, 2013; SOUTO, 2016) e alimentos (DRAGUNSKI, 2007; PEREIRA, 2013; CAMARGO, 2017).

### **3.3 A Enzima Acetilcolinesterase**

Classificada como serina hidrolase, a glicoproteína acetilcolinesterase (AChE) é pertencente à família das colinesterases e está presente em hemácias e músculos estriados, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Através deste neurotransmissor, ocorre a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos, bem como a regulação da taxa de batimentos cardíacos. Além disso, a AChE também está relacionado às sinapses ligadas ao controle motor, à memória e à cognição (VIEIRA, 2010; SANTOS, 2017; SAKATA, 2018).

A alteração anormal da atividade da AChE, como a ação inibitória por um anticolinesterásico, como por exemplo um pesticida OF, pode levar ao acúmulo de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, resultando em distúrbios na neurotransmissão, que está relacionada às patologias neurodegenerativa (JIANG et al., 2018; IVANOV et al., 2019).

De acordo com Santos (2017), a enzima AChE é o mais importante neurotransmissor dos insetos, o que possibilita a interrupção imediata na atividade biológica quando em contato com os inibidores. A reação de catálise enzimática do neurotransmissor acetilcolina (ACh) pela enzima AChE, bem como a síntese de ACh através da enzima colina acetiltransferase, são elucidados através da Figura 4. A interrupção na atividade da AChE com consequente acúmulo do neurotransmissor, provoca as reações no organismo, como tremores e até o coma, que caracteriza a intoxicação. (ARAÚJO et al., 2016).



**Figura 4.** Reações para síntese (A) e (B) hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh)  
 Fonte: Autor (2021), adaptado de Rodrigues (2018).

### 3.3.1 Cinética enzimática

O mecanismo da atividade de uma enzima é compreendido pela velocidade de reação; assim, a resposta expressa pela enzima quando ocorrem modificações em parâmetros experimentais, pode ser estudada pelo postulado estabelecido por Michaelis- Menten, baseado na interferência causada pela concentração de substrato durante a reação (SGOBBI, 2012).

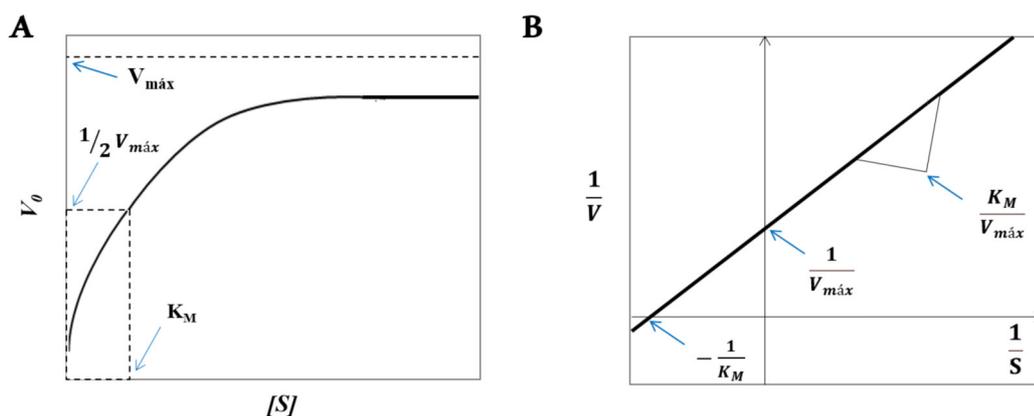
Por definição, há uma relação entre a taxa de reação e a concentração de substrato, quando é fixada uma determinada a concentração de enzima. Conforme a equação 1,  $V_0$  é a velocidade inicial em que é processada a reação; quando todos os sítios ativos da enzima são preenchidos pelo substrato, tem-se a velocidade máxima da reação ( $V_{m\acute{a}x}$ );  $[S]$  corresponde à concentração de substrato e  $K_M$  refere-se à constante de Michaelis-Menten, definida como a concentração na qual a velocidade da reação corresponde à metade de  $V_{m\acute{a}x}$ . (NELSON; COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 1})$$

O comportamento gráfico da reação tem perfil exponencial, haja visto que em baixas concentrações de substrato a taxa de reação, medida em velocidade, tende a ter acréscimo linear.

Mediante o aumento da concentração ocorre a saturação de sítios ativos, e nesse ponto, há a estabilidade na velocidade de reação, como mostra Figura 5A, bem como a Figura 5B mostra uma representação gráfica de duplo recíproco (NELSON; COX 2014). Uma representação  $1/V$  versus  $1/S$ , simplifica a equação de Michaelis-Menten, conhecida como equação de Lineweaver-Burk (Equação 2), ajuda a entender o processo de inibição enzimática e calcular constante de inibição ( $K_i$ ). Algebricamente, o gráfico de Lineweaver-Burk possui perfil linear como observado na Figura 5B, cuja inclinação da reta corresponde a  $\frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}}$  no eixo  $\frac{1}{V_0}$  e interseção de  $-\frac{1}{K_M}$  no eixo  $\frac{1}{[S]}$ .

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} + [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equação 2})$$



**Figura 5.** Gráfico de Michaelis- Menten (A) e (B) Lineweaver-Burk  
Fonte: Autor (2021).

### 3.3.2 Inibição enzimática

Como apresentado anteriormente, algumas substâncias são capazes de inibir parcial ou totalmente a atividade das enzimas. A inibição enzimática pode ser mensurada por alguns fatores decorrentes do equilíbrio de reação entre a enzima e o inibidor. Nesse sentido, existe a inibição reversível, mista e irreversível. A inibição reversível pode ser classificada ainda como competitiva, incompetitiva e não competitiva. A inibição irreversível é assim denominada devido à interação que os inibidores são capazes de fornecer ao sítio ativo da enzima; em alguns casos há ligação covalente, comprometendo por completo a atividade catalítica. Tal inibição

também é considerada progressiva, pois tende a potencializar o nível de inibição com o decorrer do tempo de reação (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

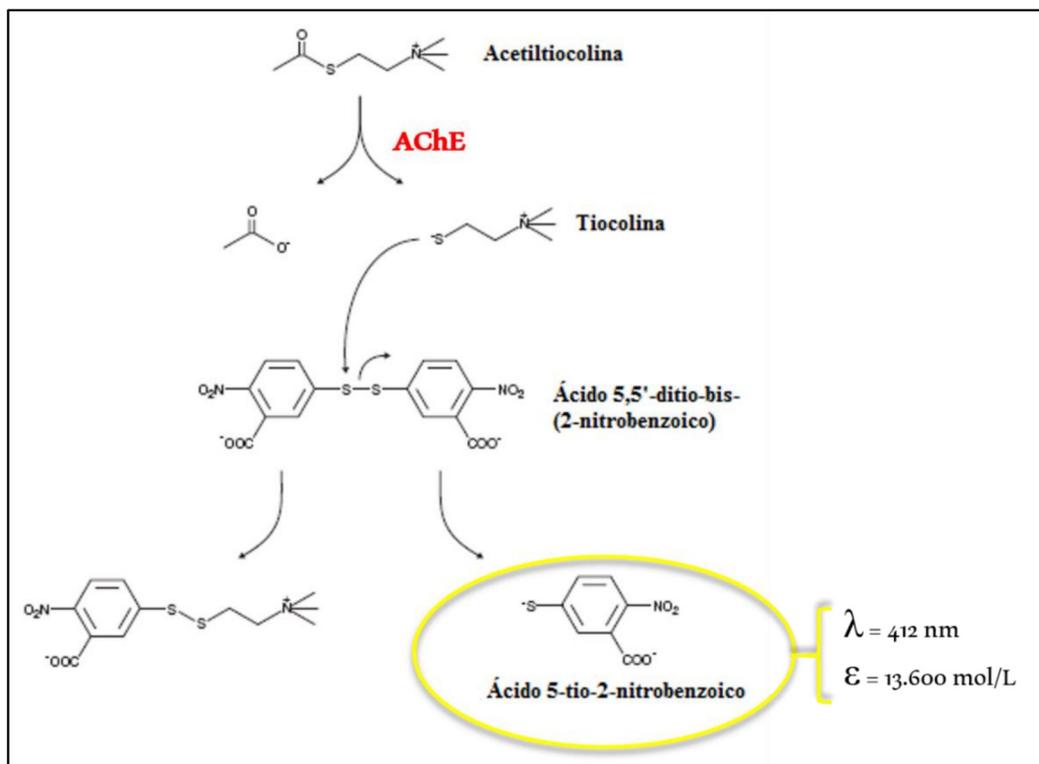
Ademais, das interações decorrentes do processo de inibição enzimática há a constante de inibição ( $K_i$ ), que reflete no grau de inibição entre envolvidos na reação, ou seja, inibidor e enzima inibida. A constante de inibição  $K_i$  é diretamente comparável à constante  $K_M$ , pois, um inibidor com alta afinidade liga-se com maior facilidade à enzima, e por tanto, possui capacidade inibitória elevada. A Equação 3 expressa a relação matemática entre  $K_i$  e  $\alpha$ , em relação à concentração de inibidor; onde  $\alpha$  é determinado através da diferença entre os valores de  $K_M$  na ausência e em presença de inibidor (Equação 2); enquanto  $[I]$  corresponde à concentração do inibidor (SGOBBI, 2012; NELSON; COX 2014).

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{(Equação 3)}$$

### 3.3.3 Método de Ellman

A fim de ser determinada a atividade da acetilcolinesterase, foi proposto o método espectrofotométrico por Ellman e colaboradores (1961), fazendo-se uso da lei de Lambert-Beer. A atividade enzimática é computada pela absorbância gerada a partir da reação de catálise, em que há o rompimento de ligação da molécula acetiltiocolina (substrato), com formação da colina. A presença do enxofre desemparelhado nesta molécula, após a catálise, garante o ataque à outra substância que obrigatoriamente deve estar no meio reacional, o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), (DTNB). Com a consequente produção de uma nova molécula que absorve luz no comprimento de onda de 412 nm (ARAÚJO et al., 2016).

A Figura 6 demonstra o esquema para o método descrito, sendo este fundamental por possibilitar a determinação de parâmetros para as condições experimentais, tais como a atividade específica da enzima, a faixa de concentração do substrato, aluídas as demais condições cinéticas envolvidas na reação, abrindo possibilidade também de avaliação da redução da atividade enzimática, quando em presença de inibidores.



**Figura 6.** Esquema para reação proposta pelo método de Ellman et al. (1961).  
Fonte: Adaptado de Barboza et al. (2010).

O emprego de tais métodos apresentados corroboram para determinação da atividade enzimática, bem como sobre funcionamento de biossensores à base de AChE. Além disso, foi realizado levantamento dos polos de produção agrícola da Ilha do Maranhão, região da Pré-Amazônia, em que foi efetuado o presente estudo através do monitoramento de pesticidas na atmosfera.

### 3.4 Os Polos de Produção Agrícola na Ilha do Maranhão e o Monitoramento de Pesticidas por Drones

Conforme Braga e Carneiro (2019), atualmente há cerca de 51 polos de produção agrícola, predominando a agricultura familiar de hortaliças, que abastecem os mercados e feiras dos municípios que compõe a Ilha do Maranhão. Em trabalho recente, Gomes e colaboradores (2018), ao traçarem o perfil socioespacial da comercialização de hortícolas na Ilha, revelaram que 31 % dos produtores locais declararam fazer o uso de agrotóxicos para proteção das lavouras. Ainda, dentre a quantidade de produtores entrevistados, é considerável o número de agricultores que não recebem assistência técnica. Ressalta-se que não há como

determinar precisamente se tais produtores rurais estão seguindo protocolo de manuseio de defensivos agrícolas, assegurando a proteção de possíveis danos por intoxicação (GOMES et al, 2018).

Com a abrangência de polos agrícolas e a diversificação nos meios de produção, não há verificação do controle efetivo quanto à utilização e manipulação de pesticidas em todo Estado. Marques (2017) revela através de pesquisa que houve o aumento de 166% na venda de insumos, resultando na urgência para a gestão eficaz no comércio dessas substâncias.

Até o momento, no Brasil, não se tem registro de trabalhos incluindo monitoramento de resíduos de pesticidas na atmosfera, facilitado por drones. Usualmente chamados como drones, os veículos aéreos não tripulados (do inglês UAVs) têm despertado interesse no que se refere ao vasto campo de aplicação. Conforme Erdelj et al., (2017), essas aplicações vão desde questões políticas, como a vigilância de fronteiras, missões de busca e resgate, ao monitoramento ambiental, incluindo em situações de desastres, acidentes ambientais. A funcionalidade dos drones também está relacionada ao baixo custo de manutenção e aquisição, dependendo da robustez do equipamento, haja visto o potencial de utilidades proporcionado.

Existem diversos tipos de sensores que podem estar a bordo dos UAVs, embora as câmeras sejam consideradas sensores passivos, sendo frequentemente utilizadas em monitoramentos aéreos. São considerados sensores ativos os leitores a laser, os pares de transmissor-receptor ultrassônicos, entre outros. Tais sensores precisam ter interface de fácil acesso, bem como fornecerem qualidade e satisfazerem os requisitos do monitoramento alvo. (YANMAZ et al., 2018).

Guimarães et al. (2019) desenvolveram um sistema de monitoramento na região urbana da Amazônica Central, mais precisamente na cidade de Manaus, em que foi utilizado um sensor químico para detecção de ozônio, adquirido comercialmente e acoplado ao UAV, para estabelecer perfil noturno da concentração desta substância e a relação com a estação chuvosa na região.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório do Núcleo de Análises em Resíduos de pesticidas (NARP) do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

#### 4.1 Reagentes e Soluções

A enzima acetilcolinesterase (AChE) extraída de enguia elétrica (eel)- (EC 3.1.1.7), o substrato cloreto de acetiltiocolina (ATChCl), os reagentes 5,5-ditiobis(2-ácidonitrobenzóico) (DTNB), glutaraldeído, soroalbumina bovina (BSA), cloreto de potássio (KCl), além dos princípios ativos ultrapuros dos inseticidas OFs clorpirifós (99%), fenitrothion (97%), malation (99%) e temefós (98%). foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Hidroxietilcelulose (HEC) foi obtida da Aldrich Co. (Steinheim, Alemanha). Para as diluições dos padrões de pesticidas, foi utilizado metanol grau HPLC (Merck).

A partir dos reagentes  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e NaOH, ambos obtidos da Merck, foram preparadas as soluções em concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e, também, foi preparada uma solução tampão fosfato (PBS, pH 7,2). A partir dessa solução, foram preparadas as soluções de DTNB  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e do substrato cloreto de acetiltiocolina (ATCh)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo estas preparadas imediatamente antes de cada ensaio espectrofotométrico ou amperométrico.

Para preparo da solução estoque da enzima, houve diluição da AChE ( $0,65 \text{ mg U}^{-1}$ ) em solução de NaCl (Merck) a 0,9% (m/v). A partir desta, soluções de trabalho foram preparadas por diluição em PBS (pH 7,2).

#### 4.2 Equipamentos e Acessórios

Para medidas eletroquímicas, foi utilizado um potenciostato/galvanostato Micro-AUTOLAB Tipo III (Methrom, Países Baixos), acoplado à um computador contendo o software GPES. Para as medidas espectrofotométricas, empregou-se o espectrofotômetro UV/Vis (Biospectro SSP-220, Madison, EUA), sendo que as medidas foram feitas em cubeta de quartzo. Utilizou-se também vórtex e micropipetas automáticas Eppendorf®, com capacidades variando de  $0,1-10 \mu\text{L}$ ,  $1-100 \mu\text{L}$  e  $10-1000 \mu\text{L}$ .

Para medidas atmosféricas foi empregado o drone modelo *Syma X8PRO* adquirido pelo grupo Núcleo de Análises em Resíduos de Pesticidas - NARP/UFMA, com controle remoto e duas baterias, acoplado à um *smartphone*, para controle piloto e registro de dados através dos aplicativos *syma fly* e *uav forecast*.

### 4.3 Preparo do Biossensor

#### 4.3.1 Preparo do sensor base

O sensor serigrafado utilizado para preparar o biossensor possuía base de PVC transparente. Tal sensor-base foi preparado mediante a impressão em máquina de serigrafia semiautomática (modelo DEK 248), com dimensões de 5 x 1,5 mm. Constituído de três eletrodos: eletrodo de trabalho, à base de grafite contendo o mediador eletroquímico; o auxiliar, formado mediante deposição da pasta de grafite, e o pseudo eletrodo de referência, preparado pela deposição da pasta de Ag/AgCl (Figura A5, Anexo 1). A fabricação desses sensores é um processo bem conhecido e tem sido amplamente reportado na literatura (BÉCKER, 2019 *apud* HAYAT; MARTY, 2014).

#### 4.3.2 Imobilização enzimática

Para imobilização da enzima por ligação cruzada com glutaraldeído, seguiu-se a metodologia descrita por Souto (2016). Foi preparada uma pasta enzimática conforme consta na Tabela 2, a partir de uma mistura inicial contendo 20 mg de grafite e 20µL de hidroetilcelulose (HEC) 3% (m/v). Após a adição sequencial dos reagentes, procedeu-se a homogeneização em vórtex a 5000 rpm por 10s.

**Tabela 2.** Reagentes e proporções obtidas para preparo da pasta enzimática utilizada no preparo do biossensor

Reagente adicionado na mistura grafite / HEC	Volume (µL)	Proporção obtida
Solução de trabalho da AChE <sup>1</sup>	18	9mU/g da pasta
Glutaraldeído 25 % (m/v)	12	16,5 % (m/v)
BSA <sup>2</sup> 3,2 % (m/v)	2	2,8 % (m/m)

AChE<sup>1</sup>: Acetilcolinesterase; BSA<sup>2</sup>: soroalbumina bovina

Em seguida, foram depositados manualmente, com auxílio de uma micropipeta para líquidos viscosos, 3 µL dessa mistura na superfície do eletrodo de trabalho (ET), dos seguintes sensores serigrafados: 1) ET de grafite sem mediador eletroquímico; 2) ET de grafite contendo

o mediador ftalocianina de cobalto (CoPC); 3) ET de grafite contendo o mediador azul de Meldola combinado com sal Reinecken com prensagem de 1 camada (MBRS 1X); e 4) ET de grafite contendo o mediador azul de Meldola combinado com sal Reinecken com prensagem 2 camadas (MBRS 2X). Tais sensores foram previamente testados por voltametria cíclica e de pulso diferencial, a fim de averiguar as interações eletroquímicas tanto com o eletrólito de suporte, quanto a adição de substrato. Após preparo, os biossensores foram levados à refrigeração a 4 °C por um período de 24 h, para garantir a fixação e conservação da atividade da enzima aprisionada no eletrodo de trabalho (Mendonça et al, 2012; Nunes et al, 2001).

#### **4.4 Cinética Enzimática na Ausência e Presença de Inibidor**

Inicialmente, o processo consistiu na avaliação espectrofométrica da atividade catalítica da enzima AChE, mediante método de Ellman et al. (1961), modificado por Nunes et al. (2014). A absorbância foi monitorada por 3 min de reação. Os seguintes parâmetros operacionais foram fixados: concentração de substrato (ATCh) com faixa de 0,5 a 4,0 mmolL<sup>-1</sup>; pH 7,2 com tampão PBS 0,1 molL<sup>-1</sup>; concentração de DTNB de 1,0 mmolL<sup>-1</sup>, e volume total para cada ensaio na cubeta de quartzo, de 500µL, correspondendo a 243µL de tampão PBS, 125 µL de DTNB e 32 µL da solução de trabalho de AChE.

Assim, os valores de absorbância obtidos foram tomados para cálculo das concentrações referentes ao produto formado, empregando-se a equação da Lei de Beer (PEREIRA, 2013).

Para definir as unidades existentes na solução de trabalho da enzima, ou seja, a atividade específica da enzima, foi multiplicado pelo fator de 500, referente ao volume total de 500µL na cubeta em cada ensaio, e depois dividido por 10<sup>6</sup> µL referente à grandeza do volume utilizado (µL). O valor obtido em unidades de µmol foi então dividido por 3, pois a cinética foi desenvolvida em 3 min de reação enzimática, para então obter a velocidade de reação expressa em µmol min<sup>-1</sup>, que equivale a unidade (U) da enzima.

Para o ensaio espectrofotométrico de inibição enzimática, foram tomados os volumes de 50 µL de solução dos padrões de pesticidas diluídos em metanol, seguido com incremento no volume de solução tampão, a fim de manter o volume total da cubeta (500µL). A concentração usada foi de 10 mg L<sup>-1</sup>, para cada um dos pesticidas OFs (clorpirifós, fenitrotion, malation e temefós). Individualmente foram realizados os testes de inibição mediante o incremento da concentração de substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata (SOUTO, 2016).

## 4.5 Medidas Eletroquímicas

Inicialmente, as medidas eletroquímicas empregando os sensores e biossensores foram realizadas por Voltametria Cíclica, Voltametria de Pulso Diferencial e Cronoamperometria, sempre num meio tamponado com PBS (pH 7,2) a 25 °C. O objetivo era determinar a intensidade de corrente gerada, de acordo com o potencial de trabalho aplicado, uma vez que este fator está direcionado à sensibilidade do sistema. Nesta etapa, objetivou-se selecionar o melhor mediador para o sistema. Antes das medidas cronoamperométricas, o biossensor foi primeiramente imerso em tampão PBS por ser cerca de 10 min, para seu intumescimento (MARQUES; YAMANAKA, 2008; NUNES et al., 2014; BECKER, 2019). Depois, a intensidade de corrente foi registrada em função do acréscimo de substrato ATCh em eletrólito, tendo sido avaliado o registro em concentrações de ATCh de 1 a 4 mmol L<sup>-1</sup>, de forma a selecionar a concentração ideal de substrato.

## 4.6 Ensaio Eletroquímico de Inibição com os Pesticidas OFs

### 4.6.1 Construção das curvas de inibição

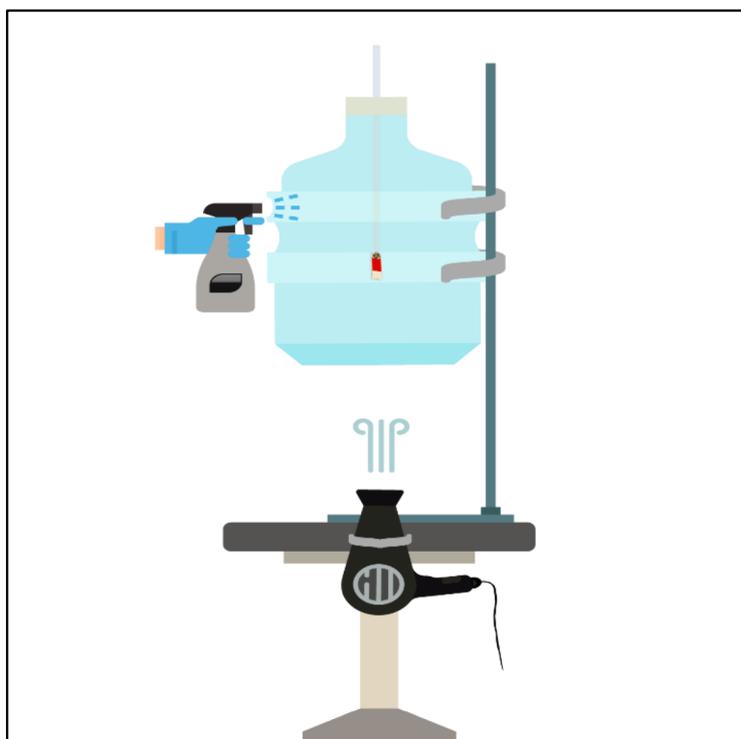
Uma vez estabelecido o melhor mediador e uma linha de base estável com concentração de substrato definida, a intensidade de corrente em estado estacionário foi registrada ( $I_0$ ). Depois, o biossensor foi imerso em solução do pesticida de concentração conhecida, permanecendo sob incubação por 10 min. Após enxague com tampão PBS, nova intensidade de corrente foi registrada ( $I$ ) em presença de substrato. Posteriormente, foram construídas curvas de inibição do tipo inibição relativa (%) *versus* concentração de pesticida. O percentual de inibição relativa foi calculado mediante a equação a seguir (PEREIRA, 2013).

$$\%IR = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A diferença entre a corrente gerada na ausência e na presença de inseticida organofosforado foi calculada, sendo que os ensaios foram realizados em diferentes concentrações dos pesticidas clorpirifós (0,006 a 5 µg L<sup>-1</sup>), fenitrothion (0,006 a 10 µg L<sup>-1</sup>), malation (0,006 a 20 µg L<sup>-1</sup>) e temefós (0,006 a 2 µg L<sup>-1</sup>).

#### 4.6.2 Ensaio de inibição em ambiente atmosférico artificial

Com o objetivo de produzir o ar atmosférico contendo resíduos do pesticida, foi realizada uma simulação da atmosfera, conforme adições sucessivas de névoas borrifadas de 1mL de solução do pesticida, a um recipiente de volume conhecido seguido de insuflamento de ar, simulando a corrente atmosférica. O recipiente consistiu em um container feito de plástico rígido, com cerca de 20,387 L de volume, tendo na sua parte inferior acoplado um secador, de forma a simular correntes de ar, à temperatura ambiente. O fluxo da corrente de ar era descendente, tendo sido controlada, durante o processo de formação de névoa, a concentração do pesticida, em  $\text{mg cm}^{-3}$ . Para tanto, a solução estoque do pesticida foi diluída em água deionizada, de forma a tornar o ambiente ainda mais aproximado da realidade, e borrifada através de um orifício situado na parte superior central do container, e com o biossensor previamente instalado em seu interior, em altura mediana (Figura 7). As curvas analíticas para cada pesticida foram construídas conforme acréscimo no volume borrifado (acrécimo de 1 mL ao container) no recipiente, a uma concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Entre um ensaio de inibição e outro, o container era lavado com solução de Extran alcalino a 10% (v/v) e deixado secar ao ar.



**Figura 7.** Esquema de simulação da aplicação de pesticida em atmosfera controlada  
Fonte: Autor (2020).

#### 4.6.3 Repetibilidade das medidas: estabilidade dos biossensores

Para avaliar a repetibilidade, foram testados oito biossensores preparados em diferentes dias, tendo sido realizadas as medidas cronoamperométricas sob mesmas condições experimentais. A precisão do biossensor foi avaliada a partir de cartas de controle estatístico, observando-se os limites de advertência e ação (superiores e inferiores). Para o cálculo de tais limites, foram empregados os valores das médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrão ( $\sigma$ ) para cada medida, de forma que, o limite de advertência foi determinado por  $\bar{x} \pm 2\sigma$  e o limite de ação, por  $\bar{x} \pm 3\sigma$  (OLIVEIRA, 2013).

Para testar a estabilidade do sinal de corrente em presença de substrato, um biossensor foi avaliado em diferentes dias durante um período de 13 semanas, sob mesmas condições experimentais, a fim de assegurar a confiabilidade estatística. As médias de corrente obtidas diariamente por cronoamperometria, foram avaliadas também a partir de carta de controle, observando os limites de advertência e ação.

### 4.7 Monitoramento de Resíduos de Pesticidas nas Atmosferas de Regiões Agrícolas

O acondicionamento dos biossensores até os locais onde foram realizadas as inibições na atmosfera foi feito em caixa térmica. Antes das medidas em campo, ou seja, no local onde há plantações de hortaliças, foram realizadas medidas de corrente do biossensor em presença do substrato. No campo, dois biossensores foram acoplados ao drone em lados opostos, com uso de uma fita dupla face resistente (Figura A6, Anexo 1). O drone foi ajustado ao *smartphone* e feito o procedimento de calibração antes do sobrevoo, para conexão com o GPS do dispositivo (Tabela B1, Anexo B). Após a planificação do drone por 5 min a uma altitude de aproximadamente 50 m ao redor do ponto de plantio (Figura A7, Anexo 1), os biossensores novamente foram transportados em caixa térmica e foi medido o novo sinal de corrente, por CA, bem como determinado o percentual de inibição. A inibição relativa (IR) percentual, foi determinada conforme descrito anteriormente.

### 4.8 Tratamento dos Dados

A comparação de médias, quando pertinente, foi feita a partir do teste t de Student não empareado, em um nível de 95% de probabilidade (CALLEGARI-JACQUES, 2009). Os

gráficos apresentados foram gerados mediante software Excel (versão 2011 – 64 bits) e Origin8.5 (64 bits).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cinética Enzimática

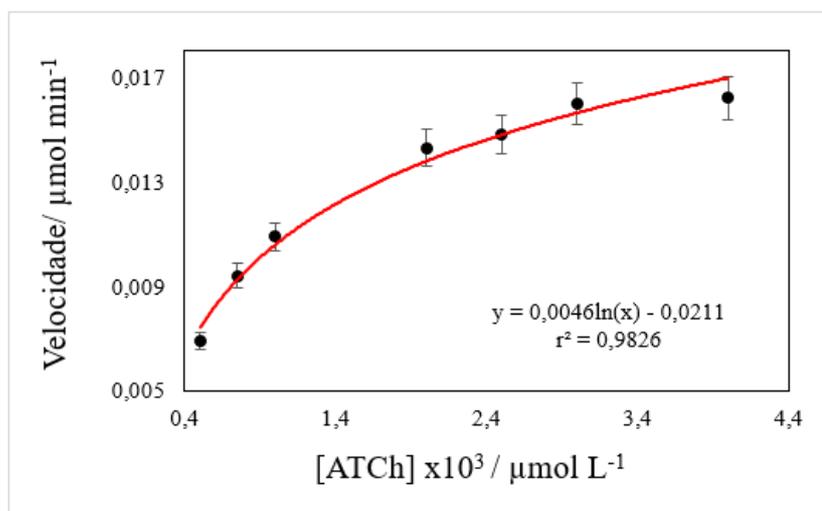
Nessa primeira etapa do trabalho, foi feita uma avaliação cinética de atividade da enzima AChE, e estudados os fatores que influenciam na velocidade da reação catalisada por esta. A Tabela 3 apresenta as concentrações do produto da reação, bem como sua respectiva velocidade, após incrementos sucessivos da concentração do substrato (acetiltiocolina, ATCh) em solução. As medidas foram realizadas contra um branco, correspondente ao tampão PBS (pH 7,2), na ausência do substrato de da enzima.

**Tabela 3.** Valores obtidos pelo método de Ellman para atividade enzimática da AChE

[ATCh] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Absorbância/ $\lambda= 412 \text{ nm}$	Concentração / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Velocidade/ $\mu\text{mol min}^{-1}$
500	0,188	13,8	$6,90 \times 10^{-03}$
750	0,255	18,7	$9,40 \times 10^{-03}$
1000	0,295	21,7	$1,09 \times 10^{-02}$
2000	0,388	28,5	$1,43 \times 10^{-02}$
2500	0,402	29,6	$1,48 \times 10^{-02}$
3000	0,435	32,0	$1,60 \times 10^{-02}$
4000	0,439	32,3	$1,62 \times 10^{-02}$

ATCh = acetiltiocolina.

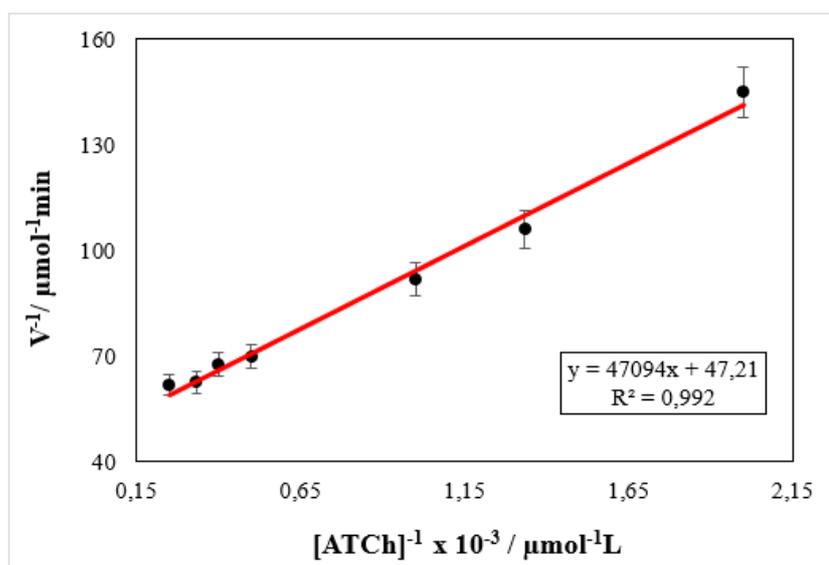
Como esperado, com o aumento gradativo na concentração do substrato, ocorreu o aumento proporcional da velocidade de reação, até a concentração de  $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de substrato ATCh, ponto em que ocorreu saturação dos sítios enzimáticos e estabilização de resposta (Figura 8).



**Figura 8.** Cinética da reação de hidrólise de acetilcolina (ATCh), catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE).

Por ter configuração de hipérbole retangular, o perfil da atividade enzimática descrito por Michaelis-Menten, descreve um acréscimo linear na velocidade da reação em baixas concentrações de substrato (VÁSQUEZ, 2017). A atividade catalítica indica as etapas do processo de hidrólise enzimática na formação do produto tiocolina, nas quais as concentrações iniciais de substrato configuram a etapa pré-estacionária da reação, como observado nos valores de absorbâncias obtidos (Tabela 3). Com o aumento da concentração de substrato, tem-se a etapa estacionária que indica a saturação referente a limitação de sítios catalítico ativos da enzima, e como consequente, estabilidade na velocidade da catálise enzimática (NELSON; COX, 2014; LIMA et al., 2006).

Assim, seguiu-se o modelo de linearização Lineweaver-Burk para cinética de enzimas, que obedecem ao modelo Michaelis-Menten, que exibem o inverso da velocidade ( $1/V$ ) versus o inverso da concentração de substrato ( $1/[S]$ ). O objetivo dessa representação, a qual emprega a equação 2 (página 25) para realização dos cálculos dos pontos da ordenada, é determinar os parâmetros cinéticos mais importantes, tais como a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ), bem como definir o mecanismo de inibição enzimática. O duplo recíproco, como também é definida tal representação, produz assim, uma linha reta que tem inclinação de  $K_M/V_{max}$  no eixo  $1/V_0$  e uma intersecção de  $-1/K_M$  no eixo  $1/[S]$  (Figura 9) (NELSON; COX, 2014; LEHNINGER, 1989).



**Figura 9.** Representação de Lineweaver-Burk para a hidrólise de acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE).

Vale ressaltar que mediante as condições experimentais, em geral os parâmetros cinéticos das enzimas podem variar bastante; entretanto, a enzima acetilcolinesterase é indiscutivelmente a que possui maior velocidade de catálise existente, quando comparada com outras enzimas (NEVES, 2015).

Os parâmetros cinéticos para a enzima AChE comercial, extraída da enguia elétrica, utilizada nesse trabalho, foram determinados após a regressão linear (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros cinéticos para a reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE)

Faixa de [ATCh] (mmol L <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (μmol min <sup>-1</sup> )
0,5-4	0,9975	0,02118

[ATCh] = concentração de acetiltiocolina (substrato); K<sub>M</sub> = constante de Michaelis-Menten;

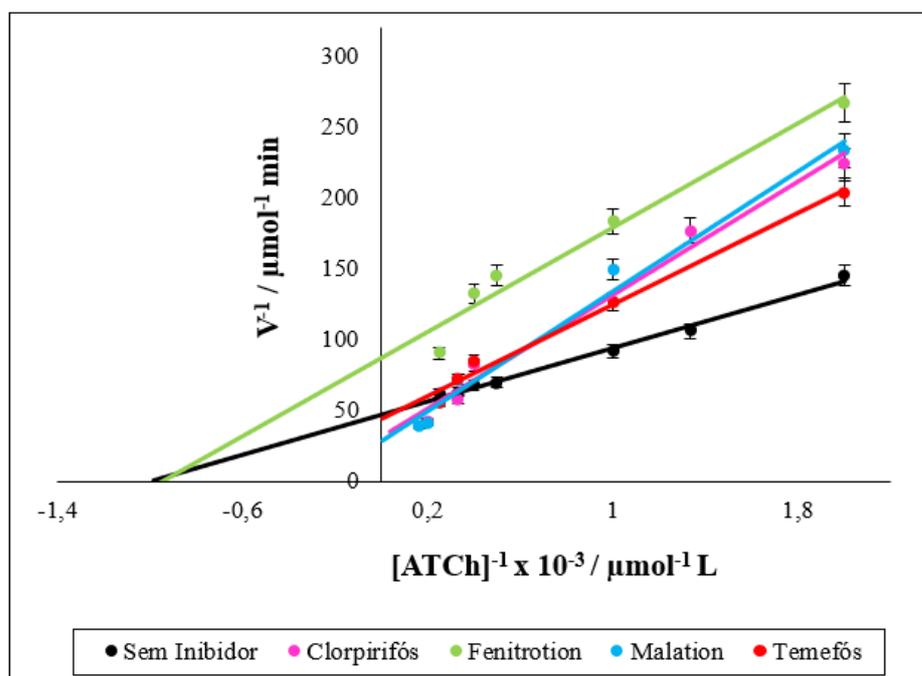
V<sub>max</sub> = velocidade máxima.

Segundo Campos (2018), o valor para constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>) indica a afinidade entre a enzima e o substrato (afinidade E-S), sendo que quanto menor for esse valor, maior tal afinidade. A velocidade máxima (V<sub>máx</sub>), por sua vez, indica a capacidade catalítica da enzima. Lehninger (1989) afirma que valor de K<sub>M</sub> próximo ao valor final da concentração de

substrato usada experimentalmente revela excelente interação E-S. No presente estudo, foi obtido um valor de  $K_M$  que indica elevada capacidade de acoplamento E-S, por ocasião da reação catalítica; isso é particularmente importante, uma vez que essa afinidade será exigida, por ocasião da construção dos biossensores, que operam mediante medidas de intensidade da corrente gerada durante a reação enzimática. Dessa forma, a corrente inicial será proporcional à concentração do substrato, mas também depende da formação inicial do complexo intermediário E-S (Figura 4 – página 26). Isso torna adequada a enzima selecionada para o presente estudo.

## 5.2 Potencial Inibidor dos Inseticidas OFs Selecionados

O potencial inibitório dos quatro pesticidas organofosforados (OFs) foi avaliado espectrofotometricamente, a fim de se verificar qual(is) molécula(s) exerceria(m) maior influência no impedimento da catálise enzimática (Figura 10). Ora, é sabido que os inseticidas organofosforados são capazes de inibir irreversivelmente a enzima AChE, e tal inibição é proporcional à capacidade que o composto tem de mimetizar a molécula do substrato e forma um complexo estável com a enzima, no lugar deste. (PUNDIR, 2012; SGOBBI, 2012).



**Figura 10.** Representação de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE), em presença dos inibidores (inseticidas organofosforados).

De acordo com o gráfico do duplo recíproco (Figura 10), construído na presença dos inibidores, as inclinações das retas aumentaram, haja vista que, como era esperado, as velocidades de reação diminuíram. Aplicando-se a Equação 3 (página 28), foi possível determinar os valores das constantes de inibição ( $K_i$ ) para cada pesticida. A Tabela 5 apresenta os valores de  $K_i$ , com os respectivos tipos de inibição enzimática, para um dos OFs, quando testados em uma concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

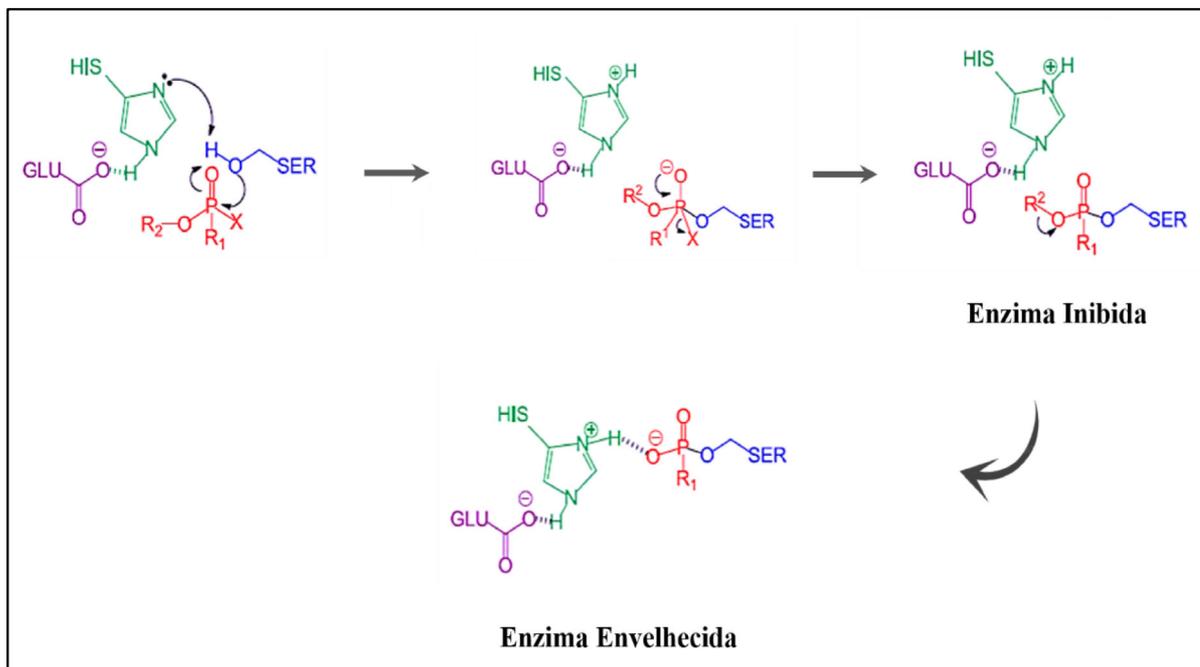
**Tabela 5.** Parâmetros cinéticos obtidos durante a hidrólise do substrato acetilcolina (ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE), na ausência e na presença dos inibidores

<b>Inibidor (inseticida OF)</b>	<b>Km (<math>\text{mmol L}^{-1}\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Velocidade (<math>\mu\text{mol min}^{-1}</math>)</b>	<b>Ki (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>
Nenhum	0,9974	0,02118	-
Clorpirifós	1,975	0,094	29,06
Malation	3,740	0,0353	10,98
Temefós	1,822	0,0226	51,77
Fenitrothion	1,123	0,01132	342,85

Observou-se que os pesticidas clorpirifós, malation e temefós exibiram comportamentos similares entre si, no tocante às inclinações das retas, gerando valores de  $K_i$  relativamente próximos, em comparação com o fenitrothion. Em contrapartida, a inibição por fenitrothion resultou no aumento da inclinação da reta refletindo na diminuição de  $V_{\text{máx}}$ , bem como apresentando maior valor de  $K_i$  (NELSON; COX, 2014; CHEN et al., 2017).

Devido à estrutura molecular dos OFs em questão, estes, ao inibirem a enzima AChE, atacam especificamente a hidroxila serina ativa (em azul - Figura 11), covalentemente ligando o enxofre presente em sua estrutura ao oxigênio do aminoácido serina. Isso resulta na impossibilidade da catálise enzimática, e o efeito em geral é irreversível (KRÁTKÝ et al., 2015; TOPAL et al., 2016). Nesse ponto, ocorre então um fenômeno denominado envelhecimento da enzima (Figura 11), processo relativamente rápido que justifica a inibição irreversível da AChE por parte dos OFs. Tal processo consiste na desalquilação do organofosforado, que perde a cadeia carbônica correspondente, gerando outra interação química por ligação de hidrogênio entre o resíduo da histidina da tríade catalítica protonado e o átomo de oxigênio do inibidor. A

inibição da enzima AChE por inseticidas OFs pode ocorrer em até cem por cento, devido à progressividade da reação, que é autocatalítica, ou seja, com o passar do tempo, pode ocorrer inativação total e irreversível da enzima (CAVALCANTE, et al., 2016).



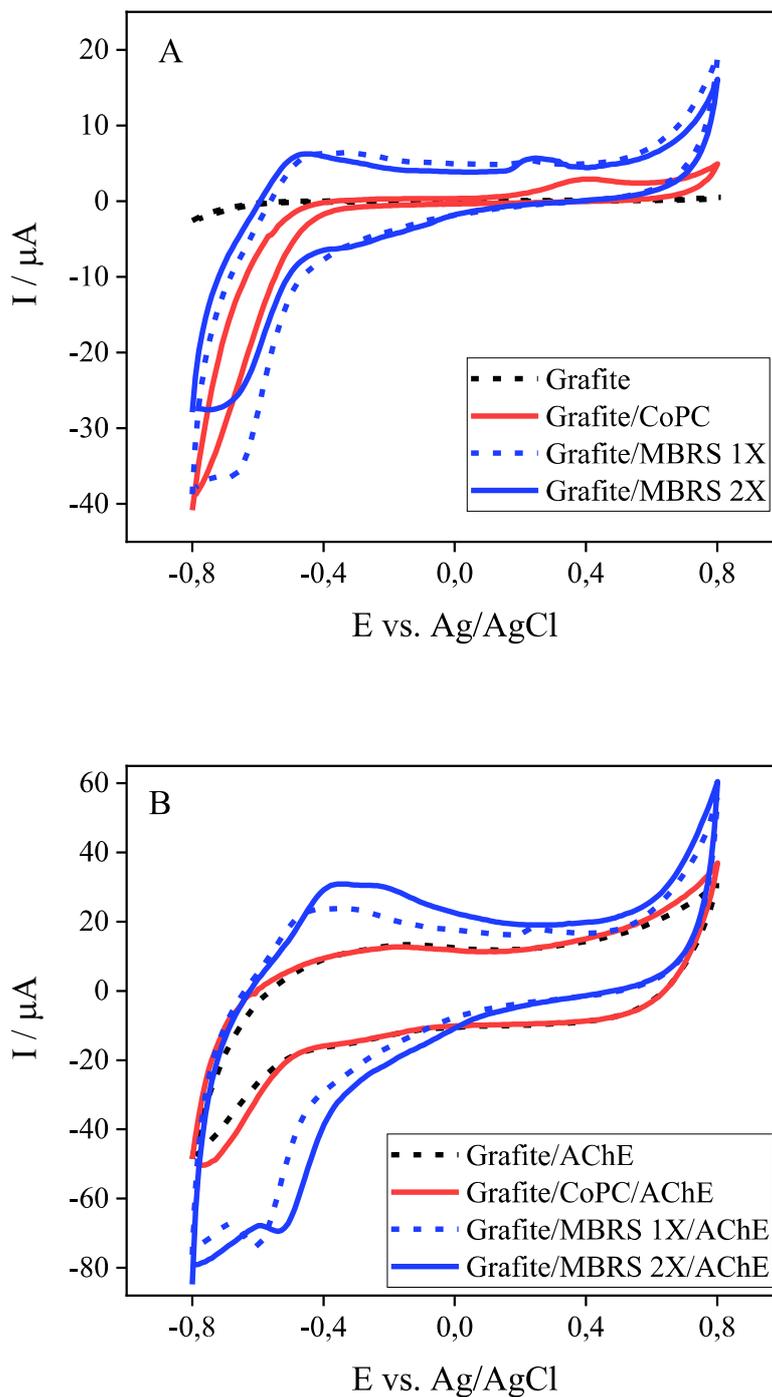
**Figura 11.** Processo de inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo composto organofosforado (OF).

Fonte: Autor (2021) Adaptado de Cavalcante et al., (2016).

### 5.3 Caracterização do Biossensor

#### 5.3.1 Comportamento eletroquímico dos mediadores

A voltametria é o método eletroanalítico que permite avaliar interações químicas entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução adjacente à essa superfície, pela medida da intensidade de corrente elétrica, como afirma Pacheco et al., (2013). Nessa etapa do trabalho, a fim de avaliar o perfil voltamétrico dos mediadores previamente depositados nos sensores serigrafados, foram testados sensores de grafite não modificados e também modificados com os mediadores ftalocianina de cobalto (CoPC) e azul de Meldola combinado com sal de Reinecken (MBRS) (1 camada e 2 camadas). O eletrólito de suporte utilizado foi tampão PBS (pH 7,2). A Figura 12 apresenta o perfil voltamétrico para os sensores, na ausência (A) e na presença da enzima AChE (B).



**Figura 12.** Voltamogramas cíclicos referentes aos sensores (A) e biossensores (B) com os respectivos mediadores eletroquímicos. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; velocidade de varredura:  $50\text{mVs}^{-1}$ ; número de scans: 10; faixa de potencial de -0,8 a 0,8 V.

Sobre os valores de potencial para corrente de pico referente à oxidação desses compostos, é reportado na literatura que o mediador CoPC possui pico em torno de 0,4V (REDDY, 2020), enquanto para o MBRS este valor é de aproximadamente 0,0V (BUCUR et al., 2018; LIMA et al, 2006). Nas condições operacionais do presente trabalho, tal resposta foi evidente para o mediador CoPC.

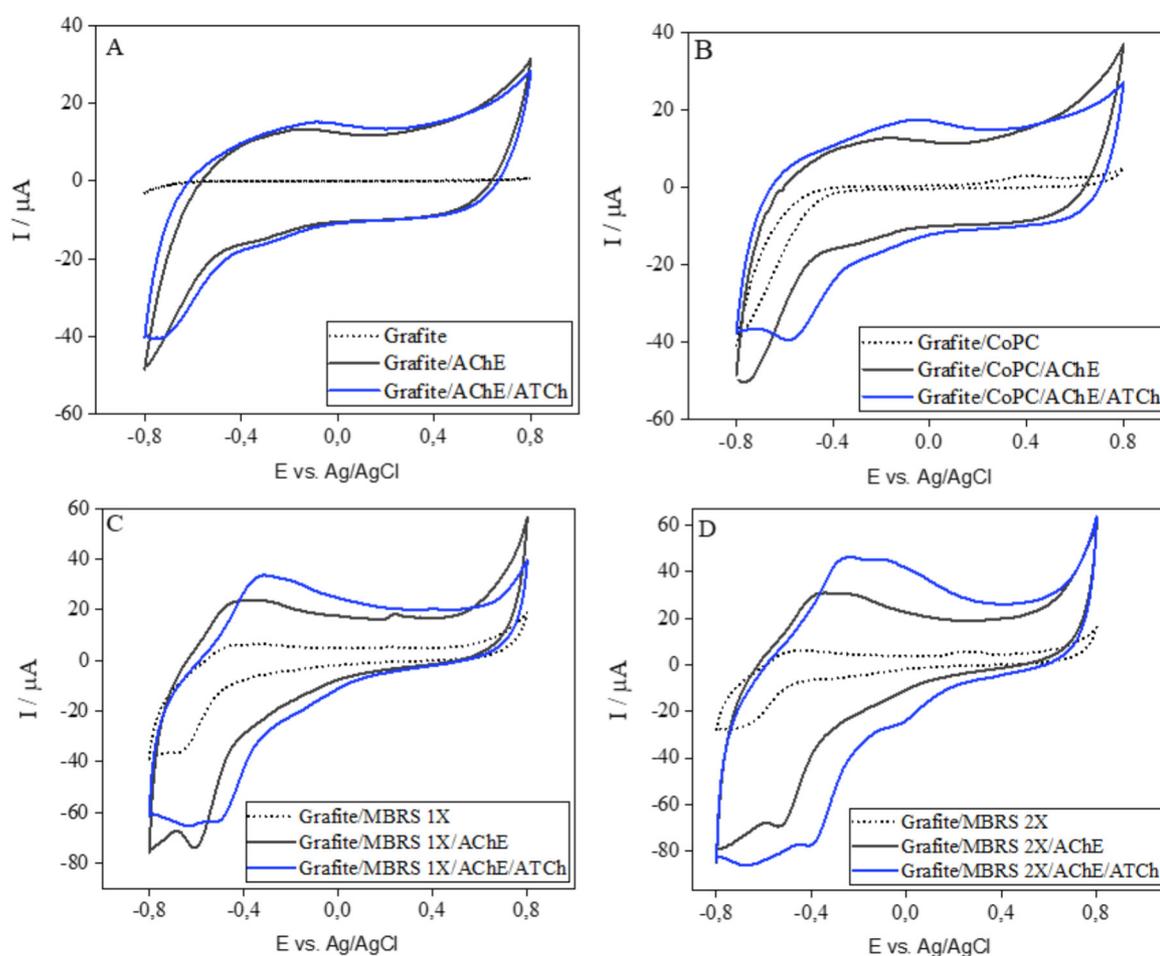
É perceptível na Figura 12 (A) a ocorrência dos picos de oxidação para o sensor contendo o mediador azul de Meldola, preparado pela deposição, por serigrafia, tanto de uma quando de duas camadas deste (1) e também para o sensor contendo ftalocianina de Cobalto (2), sob as condições experimentais descritas. O valor do potencial de trabalho atingido para CoPC foi de 0,4 V, enquanto para MBRS (1 e 2 camadas), o pico de oxidação apareceu em aproximadamente 0,18 V. Os voltamogramas demonstraram que, sob tais condições, não houve reversibilidade no sistema. Ainda, os voltamogramas indicam que os mediadores influenciam diretamente no aumento da intensidade de corrente, em comparação com o eletrodo não modificado, devido à facilitação de transferência de elétrons provocada por estes modificadores. A presença do mediador ocasionou ainda a diminuição do potencial de trabalho, mesmo na ausência da enzima, e isso tem sido reportado em outros trabalhos, pois em menores potenciais há a diminuição da ação de interferentes na solução de análise (SOUTO, 2016; NUNES e al, 2014; HAYAT; MARTY, 2014; NUNES et al, 2001;).

Então, averiguou-se a interferência no sinal de corrente produzido a partir do processo de imobilização da enzima AChE, para a produção dos biossensores (Figura 12 - B), visando à avaliação comparativa acerca de qual mediador ofereceria melhor resposta para a atividade catalítica em presença do substrato ATCh. Sabe-se que, oriunda da reação, há liberação de dois elétrons, com consequente produção de corrente elétrica, que viabiliza a medida eletroquímica (Figura 3- página 24) (NUNES et al, 2001; MARQUES; YAMANAKA, 2008; DONG et al. 2019).

A carga enzimática, isto é, a quantidade de enzima incorporada ao eletrodo de trabalho, também garante a funcionalidade do biossensor, bem como altera a sua sensibilidade. Entretanto, faz-se necessária a utilização de menores quantidades de enzima, haja vista que, finalizada a análise, o biossensor poderá ser descartado, em função da inibição irreversível da AChE com o inseticida OF, o que praticamente inutiliza o biossensor (MARQUES; YAMANAKA, 2008; PEREIRA, 2013). Além disso, menor carga enzimática implica em menor corrente inicial ( $I_0$ ), o que possibilita a detecção de OFs em níveis de traços; em valores de correntes de partida maiores, uma pequena variação de corrente, ocasionada pela inibição

com o pesticida, poderia ser confundida com o ruído do potenciostato (NUNES et al, 2014). No presente estudo, mediante ensaios espectrofotométricos e eletroquímicos (SOUTO, 2016), foi otimizada a carga enzimática, em cada um dos biossensores, de 0,52 mU.

Os sensores com mediadores eletroquímicos e sem enzima também foram testados, para avaliar a resposta destes em presença de substrato ATCh no meio reacional. Entretanto, conforme o esperado, não houve interação química desses sensores com o substrato, de modo que não houve diferença no sinal eletroquímico em presença de ATCh, confirmando que a resposta obtida em relação ao substrato foi somente da enzima AChE. Desse modo, a Figura 13 apresenta os perfis voltamétricos obtidos para os biossensores, indicando a influência no sinal obtido mediante a adição de ATCh ao meio reacional.

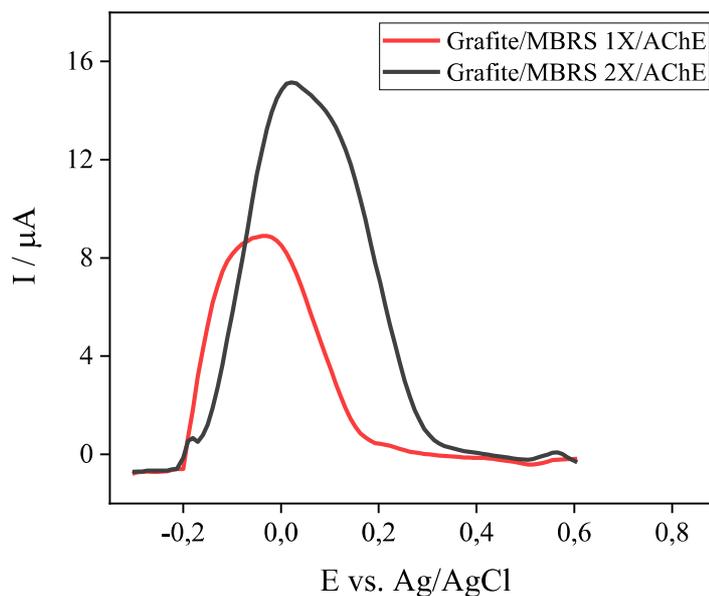


**Figura 13.** Voltamogramas cíclicos dos biossensores sem mediador (A) e com os mediadores CoPC (B), azul de Meldola-sal de Reinecken com 1 camada (C) e 2 camadas (D), em meio reacional contendo o substrato ATCh 2 mmol L<sup>-1</sup>. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; velocidade de varredura: 50 mVs<sup>-1</sup>; número de scans: 10; pH 7,2 (tamponado com PBS).

Mesmo para eletrodo de grafite sem mediador, percebe-se que houve resposta no sinal do biossensor, devido à simples presença do substrato, que foi hidrolisado, gerando corrente elétrica; no entanto, conforme o esperado, os mediadores facilitaram o processo de transferência de elétrons no meio reacional, o que pôde ser evidenciado pelo aumento de corrente observado nos VCs obtidos com os biossensores contendo os mediadores (Figura 13) Isso corrobora com os resultados obtidos em outros estudos envolvendo biossensores à base da enzima AChE (NUNES et al, 2014; TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014; DONG et al. 2019).

Nunes et al (2008) mencionam que é preferível utilizar-se valor de potencial de trabalho menor durante as medidas cronoamperométricas, visando à interferência mínima por parte dos demais componentes presentes na matriz a ser estudada. Nesse sentido, além do mediador azul de Meldola-sal de Reinecke oferecer menor potencial de trabalho para ser avaliado em comparação com CoPC, por exemplo, foi verificado em qual dos tipos de montagem do biossensor em MBRS ofereceria maior sinal de corrente em presença de substrato.

A voltametria cíclica tem se mostrado ser uma técnica bastante útil na elucidação do perfil de sensores e biossensores, sendo utilizada com sucesso para extrair informações qualitativas de sistemas os mais variados (Pacheco et al, 2013). No presente estudo, embora tenha sido observado que o sinal de corrente obtido em presença de substrato ATCh foi perceptivelmente maior que aquele gerado somente em tampão, optou-se, como uma estratégia confirmatória, realizar uma análise empregando a técnica voltametria de pulso diferencial (VPD) para os dois tipos de montagem de biossensor em MBRS, a fim de avaliar a interferência no sinal de corrente em decorrência da adição de substrato ATCh (Figura 14).

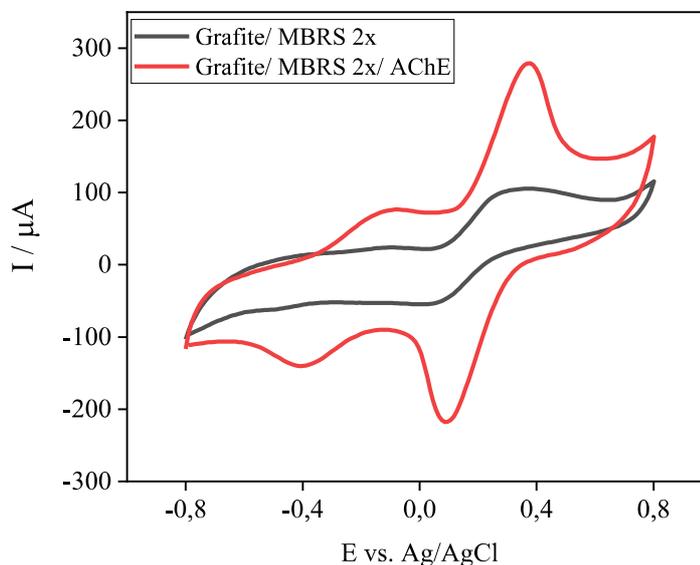


**Figura 14.** Voltamogramas de pulso diferencial dos biossensores contendo o mediador azul de Meldola-sal de Reinecken 1 camada (MBRS 1X) e 2 camadas (MBRS 2X em meio reacional contendo o substrato ATCh 2 mmol L<sup>-1</sup>. Condições operacionais: tempo de estabilização: 5 s; amplitude de modulação: 50 mVs<sup>-1</sup>; tempo de modulação: 0,015s; pH 7,2 (tamponado com PBS).

Foi observado que os biossensores à base de grafite modificado com MBRS 1X e MBRS 2X apresentaram similaridades entre si, no que se refere à proximidade em termos de potencial obtido, viabilizando o potencial de trabalho a ser utilizado nas medidas cronoamperométricas. O biossensor contendo MBRS 2X, apresentou intensidade no sinal da corrente de pico maior em presença de substrato ATCh, quando comparado com o biossensor contendo MBRS 1X. Além disso, observou-se um claro deslocamento do pico de voltagem; assim, em presença do substrato, a corrente de pico para o biossensor MBRS 2X foi obtida em potencial de ~ 0,1 V, enquanto para o MBRS 1X foi de 0,0 mV.

Numa etapa posterior, foi realizado um estudo comparativo entre o sensor MBRS 2X, com e sem a enzima AChE, num meio contendo o par redox ferri/ferrocianeto de potássio, por ser tal estratégia considerada uma das mais adequadas para se avaliar a resposta de eletrodos modificado com os mais variados materiais, desde mediadores eletroquímicos até enzimas ou organelas (GRIEP, 2018). Utilizou-se, para essa avaliação, a técnica por voltametria cíclica, em um intervalo de potencial de -0,8V a 0,8V e velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>, a partir da

adição do par redox a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , preparado em presença de KCl numa concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 15).

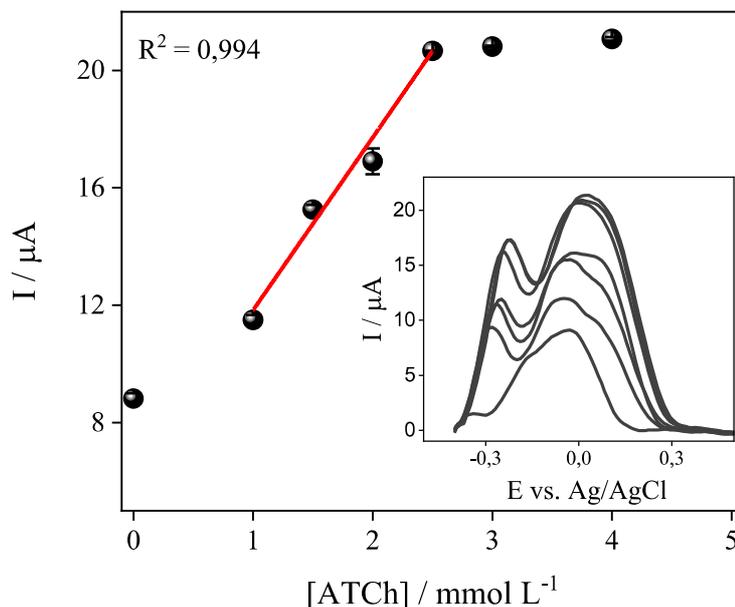


**Figura 15.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o sensor de grafite modificado com azul de Meldola-sal de Reinecken, serigrafado em duas camadas (MBRS 2X), com e sem a enzima AChE, obtidos em presença do par redox ferri/ferrocianeto de potássio a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Foram observados dois picos de redução, em potenciais de  $-0,1 \text{ V}$  e  $0,36 \text{ V}$ , e dois de oxidação, em potenciais de  $-0,4 \text{ V}$  e em  $0,1 \text{ V}$ . As correntes de pico reversíveis do par redox para o biossensor, ou seja, para o sensor de grafite modificado com MBRS 2X e a enzima, são claramente maiores que para o sensor Grafito/MBRS 2X sem a enzima. Esse aumento na resposta, em presença da enzima AChE, veio demonstrar que o biossensor modificado com MBRS 2X terá a sensibilidade necessária aos próximos ensaios envolvendo inibição da enzima pela presença dos inseticidas OFs.

### 5.3.2 Comportamento eletroquímico em presença de substrato ATCh

Nessa etapa do trabalho, foi feito um estudo objetivando selecionar a concentração mais adequada de substrato ATCh para o processo de oxidação da tiocolina, pois esse parâmetro é determinante, uma vez que está relacionado com a magnitude no sinal de corrente. Assim, para avaliar a atividade eletrocatalítica mediante a presença de substrato, e, portanto, o desempenho do biossensor, foi utilizada uma faixa de concentração de ATCh de  $1$  a  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 16).



**Figura 16.** Curva analítica para concentração de substrato. Inserido: Voltamograma de pulso diferencial do biossensor Grafite/MBRS 2X/ AChE em função da variação na concentração de substrato ATCh. Condições operacionais: tempo de estabilização: 5 s; amplitude de modulação:  $50\text{mVs}^{-1}$ ; tempo de modulação: 0,015s; faixa de potencial: -0,3 a 0,6V.

Como era esperado, o incremento na concentração de substrato influenciou no aumento da intensidade de corrente; pela Figura 16 pode-se observar que a oxidação da tiocolina aumentou de forma linear até certa concentração de substrato ( $2,5\text{ mmol L}^{-1}$ ). Os picos de corrente obtidos por VPD evidenciaram a forte interação entre biossensor e substrato, equivalente à transferência de elétrons no processo de oxidação da tiocolina. Com o aumento na concentração de ATCh, a partir de  $2,5\text{ mmol L}^{-1}$ , verifica-se que não houve aumento significativo no sinal de corrente, indicando saturação no sistema biossensor. Observou-se também que a relação linear ocorreu com concentrações de ATCh entre 1 e  $2,5\text{ mmol L}^{-1}$ , com  $r^2 = 0,994$ . Dessa forma, foi fixada a concentração de ATCh de  $2,5\text{ mmol L}^{-1}$  para as demais medidas cronoamperométricas, por ter sido aquela de maior resposta.

É importante destacar que a concentração de substrato para este tipo de análise tende a ser alta, uma vez que é registrado este sinal inicial e as demais medidas são baseadas na diminuição de corrente, em presença de inibidor (SGOBBI, 2016).

No voltamograma da Figura 16 é possível observar também que houve dois picos de oxidação, sendo que o primeiro na região negativa sofreu maior deslocamento de potencial a partir de -0,2V e outro mais acentuado em aproximadamente 0,1 V em presença de substrato.

Para o segundo potencial houve menor deslocamento de potencial, quando comparado ao primeiro em região negativa (aproximadamente - 0,2V). O deslocamento de potencial deve ser evitado, uma vez que a escolha de potencial implica diretamente na sensibilidade do biossensor na detecção do inibidor (PEREIRA, 2013). Yoon et al (2014) testaram a variação na concentração de substrato ATCh com um biossensor também serigrafado, à base da enzima AChE, também imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído, sendo que o mediador empregado foi a ftalocianina de cobalto (CoPC), e o potencial de trabalho foi de 0,1 V, contra o eletrodo auxiliar Ag/AgCl. Os autores otimizaram as medidas fixando a concentração de ATCh de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, concentração que, no presente trabalho, deu início à faixa linear, porém a corrente de partida, encontrada por estes, foi cerca de 5 vezes menor.

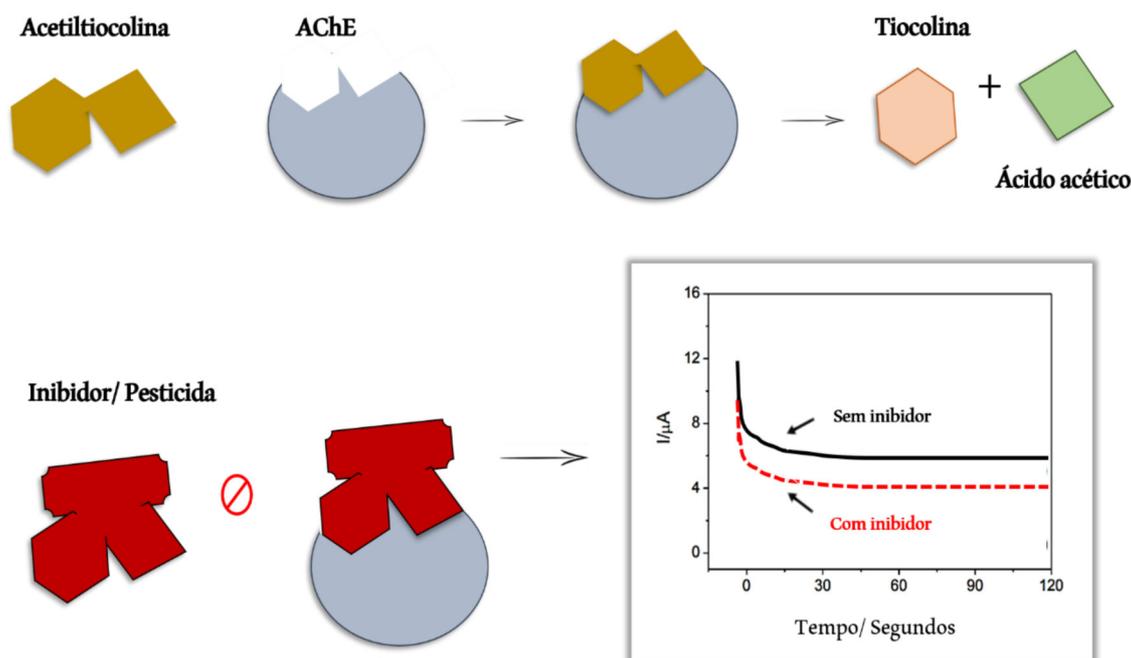
Então, para a determinação de percentual de inibição a partir da adição de inibidor, utilizou-se o valor de 0,1 V como potencial de trabalho em análises por cronoamperometria. Como o esperado, o potencial de trabalho passou a ser função do mediador MBRS 2X. (MARQUES; YAMANAKA, 2008; RUEDA et al., 2016).

## **5.4 Ensaios Cronoamperométricos de Inibição pelos Pesticidas OFs**

### **5.4.1 Curvas analíticas em meio aquoso**

Para determinação de curvas analíticas dos pesticidas através do biossensor Grafite/MBRS 2X/AChE, foram obtidos amperogramas antes e após a inibição para cada inseticida OFs.

As condições operacionais para os ensaios cronoamperométricos foram: potencial de trabalho fixo em 0,1 V; tempo de análise de 60s, após a estabilidade no sinal de corrente; tempo de incubação do biossensor na solução do pesticida de 10 min; concentração do substrato ATCh de 2,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH do meio em 7,2, tamponado em PBS. A Figura 17 apresenta esquema de detecção de pesticidas, através de análise cronoamperométrica.

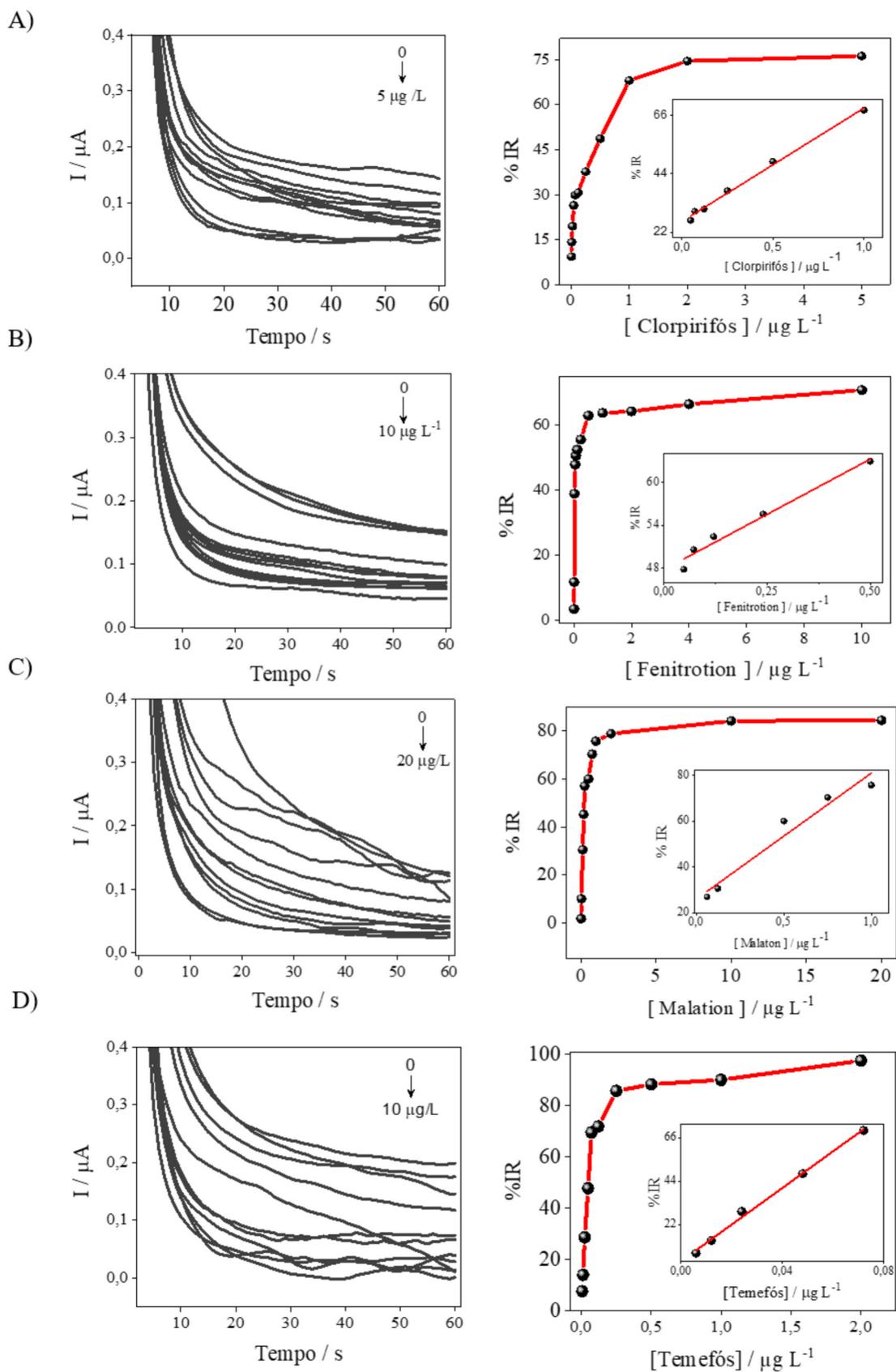


**Figura 17.** Esquema de inibição “chave-fechadura” da enzima AChE, mediante monitoramento cronamperométrico da corrente gerada, antes e após incubação do biossensor na solução contendo o pesticida (inibidor).

Fonte: Autor (2020)

O processo de inibição da AChE ocorreu mediante interação química provocada pelo pesticida organofosforado no sítio ativo da enzima. Logo, o substrato em solução deixa de ser catalisado pela enzima, uma vez que o sítio ativo está ocupado pelo inibidor, e portanto, há diminuição da corrente. Na prática, e em termos eletroquímicos, a corrente inicial oriunda da oxidação, é reduzida após incubação com o pesticida, ou seja, após contato da enzima imobilizada em eletrodo com o pesticida presente em solução. O mecanismo de detecção desses compostos por biossensores tem sido baseado na inibição decorrente do bloqueio no grupo hidroxila-serina da enzima pelo átomo de fósforo presente no composto organofosforado (Figura 2) (MOHAMMED et al., 2019).

Cada curva analítica, também chamada de *curva de inibição*, foi construída mediante os ensaios cronamperométricos, antes e após inibição enzimática; o cálculo dos percentuais de inibição, em função da concentração do pesticida, foi realizado empregando-se a equação 4 (página 34). A Figura 18 apresenta as curvas de inibição para os inseticidas OFs selecionados, e a Tabela 6, informações estatísticas sobre a faixa linear de inibição e a sensibilidade do método, caracterizada pelos limites de detecção.



**Figura 18.** Amperogramas que deram origem às curvas analíticas para os inseticidas organofosforados clorpirifós (A), fenitroton (B), malation (C) e temefós (D). E destaque, a região linear de cada curva.

**Tabela 6.** Linearidade e sensibilidade do biossensor otimizado, frente aos pesticidas organofosforados selecionados

<b>Inibidor</b>	<b>Equação de regressão linear</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
<b>Clorpirifós</b>	$y = 42,75 x + 26,054$	0,072 -1,0	0,994	0,0085
<b>Fenitrothion</b>	$y = 30,82 x + 47,815$	0,048- 0,5	0,966	0,010
<b>Malation</b>	$y = 25,875 x + 55,05$	0,062-1,0	0,940	0,031
<b>Temefós</b>	$y = 927,13 x + 3,432$	0,012-0,1	0,996	0,0087

Curvas analíticas construídas utilizando-se soluções dos pesticidas em meio tamponado (PH 7,2). Condições operacionais: potencial de trabalho de 0,1 V; tempo de análise de 60s; tempo de incubação do biossensor na solução do pesticida de 10 min; concentração do substrato ATCh de 2,5 mmol L<sup>-1</sup>.

Nas curvas, foi possível observar a concentração do inibidor na qual inicia-se a saturação dos sítios ativos da enzima. A partir destas concentrações dos analitos, a resposta expressa por percentual de inibição manteve-se praticamente constante.

Conforme recomenda a literatura de referência (LIMA et al, 2007; NUNES et al., 2014; LANG et al., 2016), para determinação do limite de detecção (LD), foi considerado o mínimo de 10 % de inibição relativa, extrapolando-se esse valor na equação da reta e encontrando-se o teor do inibidor. O biossensor produzido neste estudo apresentou elevada sensibilidade na detecção de organofosforados, tendo como base as baixas concentrações obtidas para LD. Tal sensibilidade pode estar intrinsecamente relacionada à eficiência na transferência eletrônica promovida pelo sistema biossensor, principalmente através do mediador eletroquímico, nesse caso, o MBRS 2X (LIMA, 2007; PEREIRA, 2013).

Foi observada maior sensibilidade da enzima frente os inseticidas OFs clorpirifós e temefós; curiosamente, os melhores valores de coeficiente de correlação linear também foram obtidos para esses mesmos compostos, 0,994 e 0,996, para clorpirifós e temefós, respectivamente. Vale ressaltar que a sensibilidade de um método bioanalítico depende de

muitos fatores, entre eles a escolha do elemento de biorreconhecimento (no caso, a fonte da enzima), bem como as condições operacionais, como potencial de trabalho, método de imobilização enzimática, pH do meio, concentração do substrato, entre outros. (ARAÚJO et al. 2016).

A Tabela 7 apresenta um comparativo entre os valores de LD do presente estudo em relação a outros sistemas biossensores à base da enzima AChE, já reportados na literatura, destacando o tipo de eletrodo, o mediador eletroquímico, o procedimento de imobilização enzimática, o potencial de trabalho utilizado na detecção do analito, e a sensibilidade do método.

**Tabela 7.** Comparativo entre o sistema biossensor otimizado no presente trabalho e outros registrados na literatura

<b>Eletrodo</b>	<b>Procedimento de Imobilização Enzimática</b>	<b>Mediador Eletroquímico</b>	<b>Potencial de Trabalho (V)</b>	<b>Limite de detecção (nM)</b>	<b>Analito(s)</b>	<b>Referência</b>
GCE	Gluteraldeído/ SWCNTs	-	+ 0,62	$3,75 \times 10^{-2}$	Metil paration	Kumar et al., (2019)
SPSE*	BSA	-	0,0	7,13	Clorpirifós	Tang et al., (2015)
SPE	CS	Carbon Black	+ 0,3	50	Paraoxon	Talarico et al., (2016)
CGE	Gluteraldeído	TTP	+0,83	17,5	Malation	Guler et al., (2016)
GCE	Náfion	AuNPs*/ GO*	+0,57	$8,25 \times 10^{-5}$	Metil malation	Dong et al., (2019)
SPE	BSA /Náfion	Carbon Black/ CoPC	+0,4	0,7	Paraoxon	Cinti et al., (2016)
SPE	PVA*	MSF*	+0,68	0,2	Monocrotofos	Wu et al., (2011)
SPE	Quitosana/ MWCNTs	DCHP*	+0,85	0,142	Clorpirifós	Chen et al., (2017)
CGE	Gluteraldeído/ CS	NTCPM/CoTSPc	0,0	$4,3 \times 10^{-3}$ $2,3 \times 10^{-3}$ $7,5 \times 10^{-3}$	Fenitrotion Diclorvós Malation	Pereira (2013)
SPE	Gluteraldeído/ BSA	MBRS 2X	+0,1	$2,4 \times 10^{-2}$ $3,75 \times 10^{-3}$ $9,4 \times 10^{-3}$ $1,71 \times 10^{-2}$	Clorpirifós Fenitrotion Malation Teméfós	Presente estudo

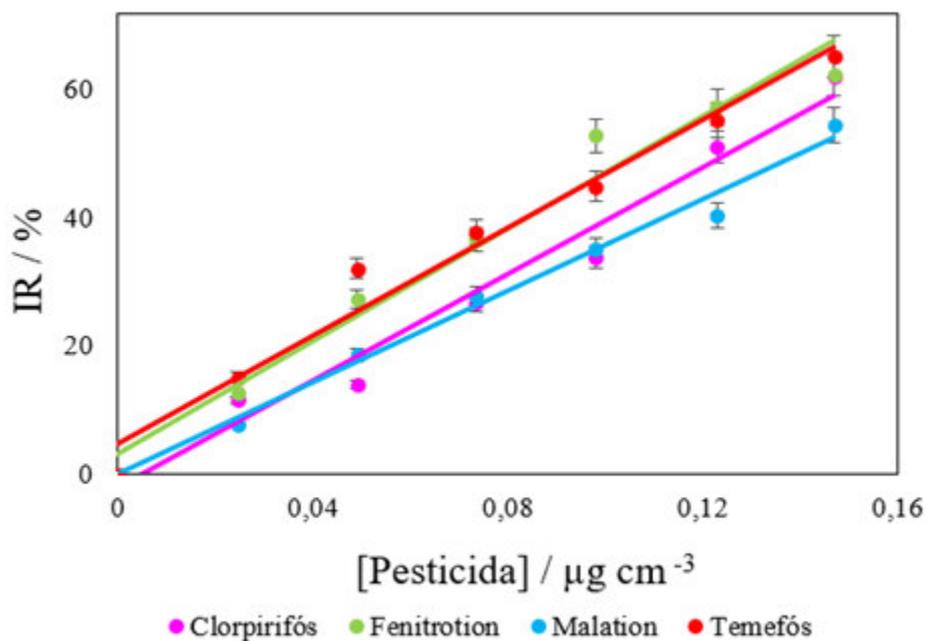
Legenda: - Não houve menção no trabalho; GCE\* (Eletrodo de carbono vítreo); SPSE\* (Eletrodo de Prata Serigrafado); CS (Quitosana); SWCNTs\* (Nanotubo de carbono de parede única); GO\* (Óxido de grafeno); AuNPs\* (Nanopartículas de ouro); PVA(Álcool polivinílico); MSF\* (Silica mesocelular); MWCNTs \* (Nanotubos de carbono com paredes múltiplas); TTP\* (Poli [2,2,5,5]-Tertiofeno- 3-carbaldeído); DCHP\* (Diciclohexil ftalato).

Em relação à sensibilidade dos métodos, observa-se que o sistema biossensor desenvolvido no presente trabalho apresentou limites de detecção relativamente próximos àqueles obtidos por Pereira (2013), muito embora o autor tenha empregado a quitosana como material modificador do eletrodo de trabalho. Além disso, em relação aos potenciais de trabalho, há maior variação devido à diversidade de mediadores, que são os facilitadores do processo de geração de corrente elétrica durante as reações (TALEAD et al. 2014).

É evidente, pois, a elevada aplicabilidade do sistema biossensor aqui proposto, na detecção de inibidores da enzima AChE, seja no meio aquoso, seja no meio atmosférico, como veremos mais adiante.

#### 5.4.2 Curvas analíticas obtidas em atmosfera artificial

A Figura 19 apresenta as curvas de inibição enzimática para inseticidas OFs, que foram construídas em uma atmosfera artificialmente produzida, e carregada com os pesticidas, simulando um ambiente atmosférico poluído. Foram empregadas concentrações dos inibidores variando de 0,045 a 0,147  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , considerando o volume total do container utilizado no ensaio. A Tabela 8 apresenta os dados de linearidade e sensibilidade obtidos com essa estratégia. Mais uma vez, para o cálculo do LD, considerou-se uma inibição relativa mínima de 10 %.



**Figura 19.** Curvas de inibição para os pesticidas organofosforados, obtidas em atmosfera artificialmente produzida.

**Tabela 8.** Correlação linear e sensibilidade do biossensor, considerando a detecção mediante inibição em atmosfera artificial

Inibidor	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação	LD ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
Clorpirifós	$y = 432,24x + 3,8306$	0,967	0,021
Fenitroton	$y = 411,66x + 6,245$	0,961	0,019
Malation	$y = 356,46x + 0,1458$	0,985	0,031
Temefós	$y = 381,94x + 9,062$	0,979	0,016

Em atmosfera simulada, o biossensor apresentou boa linearidade para os quatro inibidores de acetilcolinesterase. No entanto, as condições experimentais aparentemente provocaram uma diminuição da sensibilidade do biossensor, resultando em valores de LD

relativamente mais elevados. Apesar disso, a estratégia de simular uma atmosfera contendo teores dos inseticidas, mediante adição de uma nevoa borrifada a partir de soluções de concentrações conhecidas, foi satisfatória, e mostrou que seria possível empregar o biossensor para realizar medições em um ambiente atmosférico natural e em tempo real.

Deste modo, o sistema desenvolvido foi eficiente no estabelecimento de curvas analíticas, que apresentaram boa linearidade. Convém lembrar que uma inibição, quando detectada em um ambiente natural, seja ele aquático ou atmosférico, pode ser proveniente da presença de um ou mais compostos inibidores. No ambiente agrícola, torna-se impossível afirmar que compostos inibidores poderiam estar presentes (análise qualitativa), mas se houver um relatório de campo, poder-se-ia saber de antemão qual princípio ativo teria sido aplicado pelo produtor e, mediante determinação da inibição relativa e interpolação na curva de inibição, inferir acerca do teor do pesticida na atmosfera. Isso seria particularmente interessante em estudos envolvendo riscos a comunidades de agentes poluidores, em especial abelhas, cujas populações têm diminuído sobremaneira em todo o planeta, em virtude do uso excessivo desses inseticidas (MELLO et al. 2020; SILVA et al, 2016).

Da Figura 19, observam-se perfis de inibição similares para os pesticidas OFs; contudo, destaca-se maior sensibilidade para os compostos teméfos e fenitrothion, nas condições dos ensaios, com valores altamente coincidentes de inibição na faixa de concentração testada.

Quando efetuado o estudo de inibição através da espectrofotometria, o princípio ativo fenitrothion resultou numa maior constante de inibição ( $K_i$ ). Tal constante mede a capacidade inibitória do pesticida sobre a enzima AChE (LIMA et al, 2007).

Evidentemente, as condições experimentais nessa etapa foram propositalmente menos favoráveis para o funcionamento do biossensor, uma vez que o objetivo proposto foi testar a capacidade que o dispositivo desenvolvido teria em relação à detecção do inibidor em condições mais próximas ao observado na atmosfera. Assim sendo, nem o pH nem a temperatura foram controlados durante os ensaios de inibição, considerando-se que as diluições dos princípios ativos dos inseticidas OFs não foram realizadas em tampão PBS (pH 7,2), mas em água, normalmente usada no preparo dos agrotóxicos no campo, e a um valor de pH relativamente menor (pH 6,9).

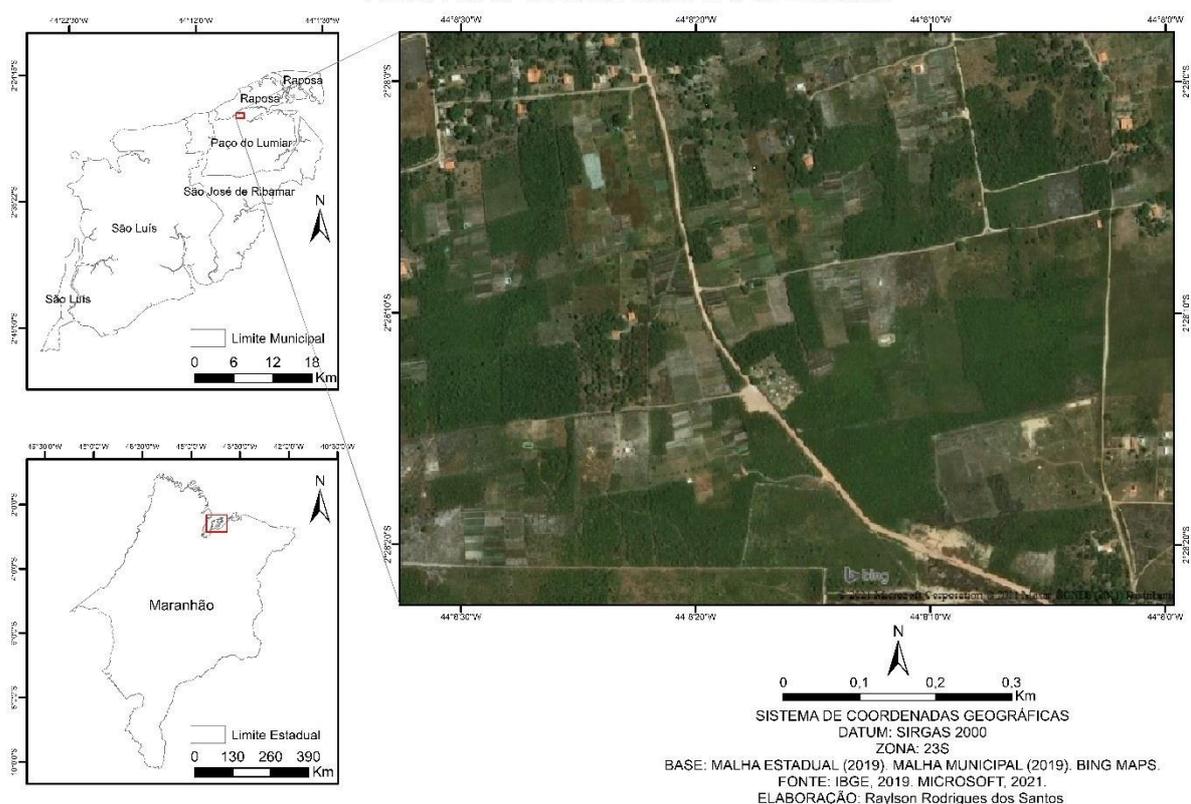
## 5.5 Detecção de Resíduos de Inibidores da AChE em Atmosfera Natural da Pré-Amazônia Maranhense

Os biossensores foram empregados na detecção da presença de inibidores da AChE, na qual a eficiência destes para a detecção de OFs em ambientes atmosféricos, foi previamente testada. Dessa forma, foram acoplados os biossensores ao drone, que realizou sobrevoos de 5 min, a uma altitude de ~50 m, para que então a enzima inibida e a respectiva inibição relativa calculada, conforme já descrito anteriormente. Inicialmente, porém, precisava-se estabelecer um ponto de controle, numa região com ausência total de atividades agrícolas, e que fosse plana e livre de interferentes. Assim, optou-se por realizar medidas de inibição em uma área dentro da Cidade Universitária – UFMA. Assim, conforme as condições favoráveis para sobrevoos, em temperatura amena do horário da manhã (medições entre 8:00-8:30h), com pouco vento e na ausência de chuvas, houve inibição relativa de  $11,59 \pm 1,25$  %, e esse valor foi tomado como a “prova em branco”. Tal valor foi diminuído dos resultados subsequentes, obtidos nas áreas agrícolas amostradas.

Os pontos de produção agrícola, onde foram realizadas as medidas com uso do biossensor acoplado ao drone, foram fornecidos pela Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Maranhão – AGERP. Também, através da AGERP, houve tentativa de levantamento prévio de OFs mais utilizados na agricultura da Ilha. Entretanto, a produção agrícola de hortaliças na Ilha do Maranhão é baseada na agricultura familiar, e não houve disponibilidade dessa informação.

A Figura 20 apresenta a imagem, tomada por satélite, da área onde foram tomadas as medidas de inibição, para detecção da presença de inibidores de AChE no meio atmosférico. O cultivo de hortaliças na Ilha do Maranhão abastece feiras e supermercados da região. Embora não haja estudos que comprovem a utilização de defensivos agrícolas, é iminente que no decorrer das lavouras os trabalhadores rurais façam uso de tais substâncias, gerando inquietação, principalmente, sobre o acesso à informação do manejo desses compostos. Desse modo, de forma a proteger a identidade dos pequenos produtores locais, haja vista ser a agricultura familiar o meio de subsistência destes, o presente estudo não indicará com precisão os pontos específicos onde foram efetuadas as medidas, mas somente a área de forma mais ampla, conforme observado na Figura 20.

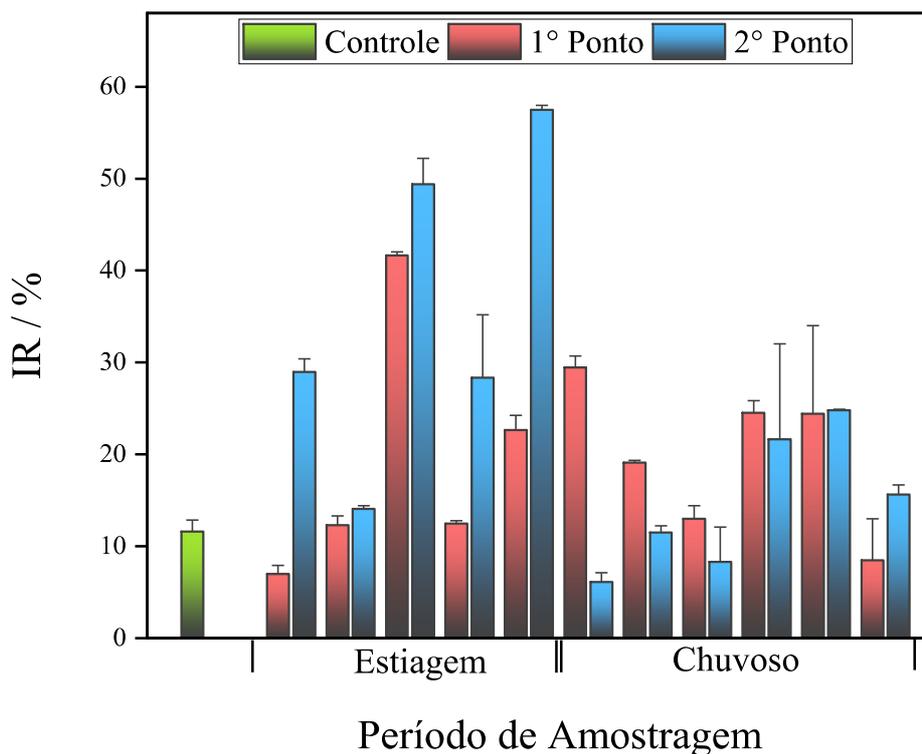
## ÁREA DAS MEDIDAS ATMOSFÉRICAS



**Figura 20.** Mapa da área de plantio, localizada na Pré-Amazônia Maranhense, na qual foram estabelecidos os dois pontos de amostragem atmosférica.

Com o consentimento dos proprietários dos terrenos agrícolas, foram realizados os sobrevoos com os drones, estando acoplados a estes, os biossensores. Para tanto, fez-se necessário avaliar se as condições climáticas estavam propícias, atentando ao horário de coleta de dados, a fim de evitar a interferência mínima do calor do sol, uma vez que o fator da temperatura influencia na perda de atividade da enzima no sistema biossensor.

A Figura 21 apresenta os dados de inibição obtidos durante o monitoramento da inibição da enzima AChE, mediante uso dos biossensores acoplados ao drone, no período de novembro de 2020 a fevereiro de 2021.



**Figura 21.** Detecção de pesticidas inibidores da enzima acetilcolinesterase no ambiente atmosférico de regiões agrícolas da Pré-Amazônia Maranhense, mediante uso de biossensores acoplados a drones. Período: novembro/2020 a fevereiro/2021. IR = inibição relativa (n=2)

Observa-se que foi possível detectar a presença de pesticidas OFs nos locais amostrados, em todo o período de amostragem, especialmente no segundo ponto e na estação de estiagem, onde foram verificados maiores percentuais de inibição em diferentes dias. Os valores médios de inibição relativa (IR %), obtidos para o primeiro ponto amostral, sempre apresentaram maior precisão. Esse fato pode ser atribuído às melhores condições atmosféricas, como por exemplo ausência de correntes de ar muito intensas naquele ponto. Além disso, há a diminuição da inibição no período chuvoso, no qual ocorre a redução da produção agrícola em decorrência das chuvas e, portanto, redução da quantidade de agrotóxicos aplicados (GOMES et al. 2018).

Acerca da dinâmica atmosférica, Pinheiro (2017) afirma que há a classificação de apenas duas estações na referida região, no Estado do Maranhão, sendo elas estação chuvosa, predominantemente nos meses de abril e maio, e a outra estação seca ou de estiagem. Entretanto, alguns fatores climáticos como a presença de ventos Alísios, ventos locais (brisa

marítima e terrestre), fenômenos cíclicos como o El Niño e La Niña configuram a dinâmica atmosférica da Ilha do Maranhão.

De acordo com dados obtidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, o início da estação seca na região deu-se a partir do mês de agosto de 2020, cujo mês de novembro destacou-se por maior índice de precipitação comparado ao último trimestre do referido ano. Além disso, a estação chuvosa iniciou-se no mês de dezembro atingido o maior pico de precipitação no mês de janeiro/ 2021 (INPE, 2021). As condições climáticas pertinentes à região onde está localizada a Ilha do Maranhão, são avaliadas pelo INPE a partir de uma faixa que abrange todo nordeste do Estado do Maranhão, e, portanto, compreende vários municípios em termos de extensão territorial.

Na atualidade, muitos estudos têm sido publicados objetivando avaliar qualidade do ar, em relação a gases poluentes, como CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub> e os NO<sub>x</sub> (MAHMOUD et al. 2021). Também, poluentes orgânicos persistentes, conhecidos como POs hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, PAHs, dioxinas e furanos, bifenilas policloradas, PCBs, entre outros poluentes, têm sido detectados na atmosfera empregando-se a mais variadas técnicas. (KIM, et al. 2019). YU et al., (2019), por exemplo, empregaram um sistema integrando filtros de ar com base em fibra de vidro, e monitoraram resíduos de compostos organoclorados (OCs) em sete cidades na região do litoral sudoeste da China.

Kim et al. (2019), por sua vez, detectaram traços de PAHs, pesticidas OCs e PCBs em quatro pontos da cidade de Gwangju, na Coreia do Sul; para tanto, coletaram partículas de grandes volumes de ar através de filtros de quartzo; realizaram análises mediante extração seletiva de líquido pressurizado (SPLE) e determinaram as concentrações dos poluentes por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas. Em ambos os estudos, os autores usaram filtros para extrair os compostos poluentes da atmosfera, e depois os analisaram por cromatografia a gás, publicando os resultados em ng/m<sup>3</sup>.

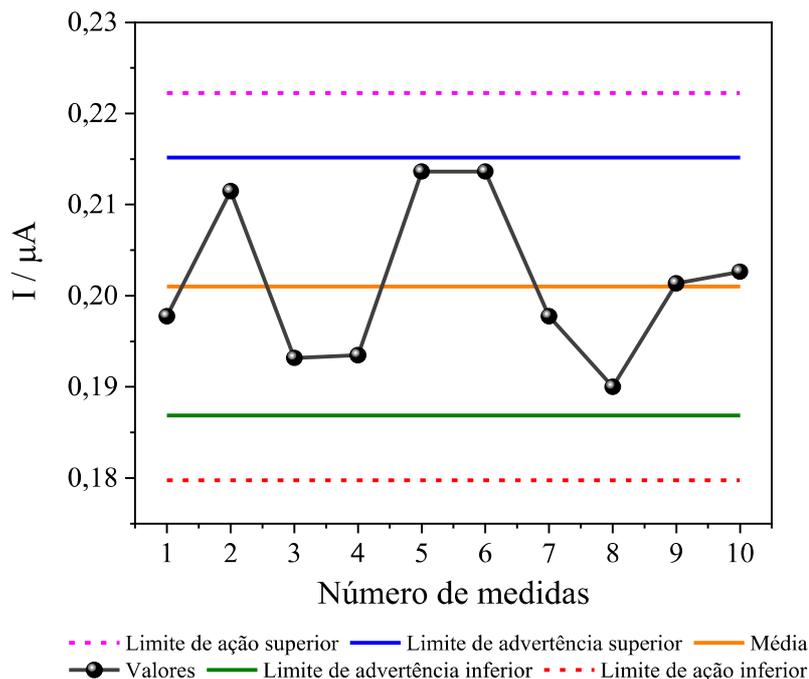
Até o momento, poucos são os estudos envolvendo monitoramento de compostos na atmosfera, como ozônio, através do emprego de drones (GUIMARÃES et al. 2019), e nenhum descrevendo o acoplamento drone-biossensor. Para análises de resíduos de organofosforados na atmosfera, por exemplo, não há relato algum de sistema similar ao proposto no presente trabalho, e, portanto, este é o pioneiro dentro do objetivo pretendido.

É importante também mencionar que os teores residuais dos compostos analisados nesses e em outros trabalhos (YU et al. 2020; KIM et al. 2019), assim como no presente estudo, foram maiores durante o verão. Alguns fatores devem ser considerados quanto à avaliação da

qualidade de ar das regiões monitoradas no presente estudo, entre os quais a predominância de atividade agrícola, com emissão de agrotóxicos nos entornos dos pontos analisados, as condições climáticas e a volatilidade dos compostos. Por outro lado, deve-se levar em consideração que os compostos organofosforados são altamente instáveis, e por essa razão degradam-se rapidamente nos diversos compartimentos ambientais, seja por oxidação, hidrólise e até mesmo fotólise (PAVANI, 2016). Assim sendo, o fato de terem sido detectados esses inibidores da enzima AChE, no ar, indica que a concentração inicial era seguramente bem superior à detectada. Em virtude do extensivo uso dos inseticidas organofosforados (MELO; CRUZ; BOTELHO, 2020) e face à sua elevada toxicidade às abelhas (BURALLI, 2020) – o que certamente tem contribuído para o paulatino e evidente declínio da população desses polinizadores em todo o mundo (BURALLI, 2020; MELLO et al. 2021) –, uma vez mais, destaca-se aqui a importância de estudos envolvendo o monitoramento desses poluentes na atmosfera, em áreas agrícolas.

## **5.6 Estabilidade dos Biossensores**

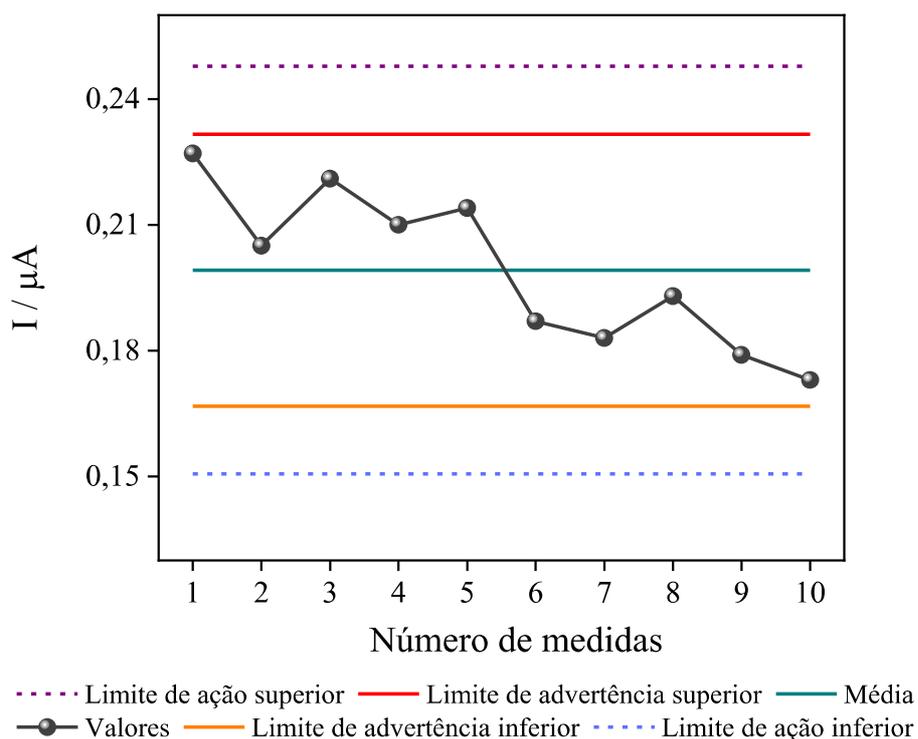
A fim de avaliar a repetibilidade na produção do biossensor proposto e a estabilidade do seu sinal, foram obtidos amperogramas, mediante reação com o substrato, empregando-se 10 biossensores produzidos em diferentes dias e sob mesmas condições. Para essa análise, construiu-se uma carta de controle, que estabeleceu os limites estatísticos de advertência e de ação, e nela foram plotado os valores médios de corrente ( $n = 3$ ), obtidos sob mesmas condições operacionais (Figura 22).



**Figura 22.** Carta de controle para avaliação da repetibilidade na produção de 10 biossensores preparados sob mesmas condições em diferentes dias (n=3).

Na Figura 22, O eixo-x refere-se à quantidade de medidas efetuadas com os 10 biossensores, enquanto o eixo-y mostra os valores de correntes obtidos (médias de 3 repetições) por cronoamperometria, durante a hidrólise enzimática do substrato ATCh. Segundo esse tipo de carta de controle, o método analítico será considerado estatisticamente fora de controle quando dois ou mais resultados excederem uma das linhas de advertência, sucessivamente, ou quando somente um resultado ultrapassar uma linha do limite de ação (BÉCKER, 2019). Verifica-se que, no geral, os procedimentos adotados na produção dos biossensores não resultaram em diferenças alterações significativas nas respostas, e que o método de detecção utilizando o biossensor proposto pode ser considerado estatisticamente preciso e confiável, isto é, apresenta elevada repetibilidade.

A fim de avaliar a estabilidade no sinal de corrente, para um mesmo protótipo, no decorrer do tempo, um único biossensor foi tomado para teste, e a corrente medida aleatoriamente em dias diferentes, durante um período de 13 semanas, sob mesmas condições operacionais. A partir das médias de corrente do biossensor obtidas em contato com o substrato em concentração de  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , uma nova carta de controle foi elaborada (Figura 23).



**Figura 23.** Carta de controle para avaliar estabilidade de único biossensor para medidas em diferentes dias. (n=3).

Foi constatado que, a partir da quinta semana de armazenamento, o valor de corrente começou a decair, e na décima terceira semana, o valor já se encontrava bem próximo do limite de advertência inferior. Essa perda da atividade deve-se provavelmente à desnaturação parcial da enzima AChE durante o armazenamento, não obstante os biossensores tenham sido mantidos sob refrigeração a  $\sim 4^\circ C$  durante todo o período do teste. De forma a assegurar sua eficácia e confiabilidade estatística, optou-se por considerar o biossensor proposto estável para utilização até no máximo 12 semanas após o preparo.

## 6. CONCLUSÃO

O biossensor eletroquímico serigrafado, cujo eletrodo de trabalho, preparado à base de uma pasta de grafite contendo o mediador azul de Meldola-sal de Reineken em duas camadas (MBRS 2X) e a enzima acetilcolinesterase (AChE), otimizado no presente trabalho, mostrou-se ser uma ferramenta viável, específica, estável e altamente sensível para a detecção de inseticidas organofosforados (OFs), por meio de técnica cronoamperométrica, baseada no princípio da inibição enzimática. Além disso, os procedimentos de preparo e emprego do biossensor podem ser considerados relativamente simples e de baixo custo, podendo este ser empregado na avaliação da poluição, por esses contaminantes, em ambientes aquáticos e/ou atmosféricos.

Os ensaios de inibição pelos inseticidas OFs clorpirifós, fenitrothion, malation e temefós, realizados como o biossensor em ambiente atmosférico artificial, isto é, mediante a produção de névoas borrifadas em contêiner com fluxo de ar e teor dos pesticidas controlados, foram considerados uma estratégia analítica pioneira e propiciaram a construção de curvas do tipo Inibição Relativa (IR, %) *versus* concentração dos pesticidas ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ). Tais curvas analíticas apresentaram adequadas linearidade e sensibilidade, demonstrada pelos baixos limites de detecção dos compostos, e evidenciaram a elevada viabilidade de uso desses biossensores acoplado a drones para a detecção de pesticidas inibidores da enzima AChE em ambientes agrícolas cuja atmosfera estaria supostamente poluída.

Finalmente, foi possível detectar tais poluentes, em duas estações amostrais localizadas em uma região de plantio de hortaliças, ao norte da Pré-amazônia maranhense, utilizando a estratégia de acoplamento dos biossensores a drones. Nessa etapa, foi possível verificar em qual das estações estava sendo mais intenso o uso dos pesticidas, haja vista a diminuição na produção agrícola durante período chuvoso e, portanto, constatou-se maior presença desses poluentes durante a estação seca. Tais poluentes podem ser transportados por correntes atmosféricas e afetar não só o homem e poluir os ambientes aquáticos, mas também impactar populações de insetos não-alvo, incluindo as abelhas polinizadoras. Isso pode explicar o crescente declínio dessas espécies, tão necessárias ao equilíbrio do Planeta, ao longo dos últimos anos.

Como conclusão, pode-se afirmar que o presente estudo representa uma grande contribuição para o campo da Química Analítica, uma vez que abre a possibilidade de exploração de uma importante e inovadora plataforma analítica, baseada no acoplamento biossensor-drone, voltada para a detecção de contaminantes orgânicos potencialmente

perigosos em ambientes atmosféricos. Inegável será também a contribuição desse estudo para os campos da Química Ambiental, Biologia, Agronomia e áreas afins, salientando a relevância de trabalhos envolvendo monitoramentos de pesticidas, acrescida aqui a possibilidade de se fazê-lo em ambientes atmosféricos e em tempo real

## REFERÊNCIAS

- ALBAREDA-SIRVENT, Miquel et al. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.
- ALMEIDA, Mirella Dias et al. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei nº 3.200/2015. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, p. e00181016, 2017.
- ALVES, Diego P. et al. Quantificação de clorpirifós em alfices comercializadas no município de Seropédica–RJ, através de cromatografia líquida de alta eficiência. **Cadernos de Agroecologia**, v. 15, n. 2, 2020.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**. Brasília, 15 de abril de 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 17 out. 2020.
- ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- ASTURIAS-ARRIBAS, Laura et al. Screen-printed biosensor based on the inhibition of the acetylcholinesterase activity for the determination of codeine. **Talanta**, v. 111, p. 8-12, 2013.
- BARBOZA, Henriqueta Talita Guimarães et al. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (Carica papaya L.). **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documents (INFOTECA-E)**, 2010.
- BASTOS, Lucia Helena Pinto et al. Implementação de método analítico para determinação de resíduos de organofosforados em leite por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1657-1663, 2012.
- BASTOS, Lucia Helena Pinto et al. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Cad. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011.
- BECKER, Magda Márcia et al. Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. **Talanta**, v. 204, p. 626-632, 2019.
- BIN, Zou et al. Acetylcholinesterase biosensor based on functionalized surface of carbon nanotubes for monocrotophos detection. **Analytical biochemistry**, v. 560, p. 12-18, 2018.
- BOLZONELLA, C. et al. Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health? **Global Ecology and Conservation**, 2019.

BRAGA, C. L.; CARNEIRO, M. S. Transformações na agricultura periurbana da MRH da aglomeração urbana de São Luís. *RAIZES (UFPB)*, v. 39, p. 241-261, 2019.

BRASIL. Congresso Nacional. Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 08 jan. 2002.

\_\_\_\_\_. Lei 8.702, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 de jul. 1989, Seção 1, p. 60.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Insumos Agrícolas. Registros de princípios ativos. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>> Acesso em 22 de fevereiro de 2021.

BUCUR, Bogdan et al. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. *Biosensors*, v. 8, n. 2, p. 27, 2018.

BURALLI, Rafael Junqueira. **Efeitos à saúde por exposição ambiental e ocupacional aos pesticidas de uso agrícola**. 198f. Tese de Doutorado (Doutorado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

CAMARGO, João Pedro Corrêa. Preparação e caracterização de biossensores baseado na eletrodeposição de grafeno/polipirrol/acetilcolinesterase para determinação de pesticidas em amostras de frutas e vegetais. 60f. 2017. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Estadual paulista “Júlio de mesquita Filho”, Araraquara, 2017.

CALDAS, Sergiane Souza et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Artmed Editora, 2009.

CAMPOS, Juliana Soares et al. **Desenvolvimento de método de microanálise dupla mediada por eletroforese capilar para a determinação simultânea das atividades inibitórias de fenólicos frente às enzimas acetilcolinesterase e  $\alpha$ -glicosidase**. Monografia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

CARVALHO, Miguel Mundstock Xavier de; NODARI, Eunice Sueli; NODARI, Rubens Onofre. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no

estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.

CAVALCANTI, Laura Patricio et al. Intoxicação por organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.

CHAE, Myung-Sic et al. Graphene-based enzyme-modified field-effect transistor biosensor for monitoring drug effects in Alzheimer's disease treatment. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 272, p. 448-458, 2018.

CHEN, Yao et al. Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of tacrine–cinnamic acid hybrids as multi-target acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **RSC advances**, v. 7, n. 54, p. 33851-33867, 2017.

CINTI, S. et al. Novel carbon black-cobalt phthalocyanine nanocomposite as sensing platform to detect organophosphorus pollutants at screen-printed electrode. **Electrochimica Acta**, v. 188, p. 574-581, 2016.

COLEONE, Ana Carla et al. Validação de método analítico e de extração do malation em água e solo após nebulização de combate ao *Aedes aegypti*. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, n. 3, p. 426-434, 2017.

DONG, Pei; JIANG, Bin; ZHENG, Jianbin. A novel acetylcholinesterase biosensor based on gold nanoparticles obtained by electroless plating on three-dimensional graphene for detecting organophosphorus pesticides in water and vegetable samples. **Analytical Methods**, v. 11, n. 18, p. 2428-2434, 2019.

DRAGUNSKI, Josiane Caetano. **Desenvolvimento e aplicações de eletrodos modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas em matrizes de alimentos**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ELLMAN, George L.; BURKHALTER, Alan; LADOU, Joseph. A fluorometric method for the determination of hippuric acid. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 57, n. 5, p. 813-818, 1961.

EL-MOGHAZY, A. Y. et al. Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly (vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil. **Food chemistry**, v. 203, p. 73-78, 2016.

ERDELJ, Milan et al. Help from the sky: Leveraging UAVs for disaster management. **IEEE Pervasive Computing**, v. 16, n. 1, p. 24-32, 2017.

GAN, Stephanie D.; PATEL, Kruti R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 9, p. e12, 2013.

GRIEP, Jordana Borges. **Síntese e caracterização de filmes de nanocompósitos de polipirrol e nanopartículas de ouro para aplicação em biossensores de pesticida metil paration**. 90f. 2018. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

GRIZA, F. T., et al. **Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha-Rio Grande do Sul**. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p. S1, 2008.

GOMES, João Flávio Bomfim; DE SOUZA, Alex Oliveira; GOMES, Renata da Silva Bomfim. Caracterização socioespacial da produção e comercialização de hortícolas na Ilha de São Luís, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, 2018.

GUIMARÃES, Patrícia et al. Vertical profiles of Ozone concentration collected by an Unmanned Aerial Vehicle and the mixing of the Nighttime Boundary Layer over an Amazonian Urban Area. **Atmosphere**, v. 10, n. 10, p. 599, 2019.

GULER, Muhammet; TURKOGLU, Vedat; KIVRAK, Arif. Electrochemical detection of malathion pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on glassy carbon electrode modified with conducting polymer film. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 12, p. 12343-12351, 2016.

HAYAT, Akhtar; MARTY, Jean Louis. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 10432-10453, 2014.

HUANG, Qilin; WANG, Ya; LI, Lei; XU, Zhiai; ZHANG, Wen. Photoelectrochemical biosensor for acetylcholinesterase activity study based on metal oxide semiconductor nanocomposites, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 781, 2016, Pages 377-382.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente Recursos Naturais e Renováveis. Requisito legal e competência do Ibama Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>> Acesso em 22 de fevereiro de 2021.

INPE- Instituto Nacional de Pesquisa Espacial. Centro de previsão do tempo e estudos climáticos. Disponível em: <<http://clima1.cptec.inpe.br/>> Acesso em 12 de janeiro de 2021.

IVANOV, Alexey et al. Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase. **Talanta**, v. 194, p. 723-730, 2019.

JARDIM, A. N. O., CALDAS, E. D., Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010, **Food Control**, 25, 607-616, 2012.

JIANG, Bin et al. A novel amperometric biosensor based on covalently attached multilayer assemblies of gold nanoparticles, diazo-resins and acetylcholinesterase for the detection of organophosphorus pesticides. **Talanta**, v. 183, p. 114-121, 2018.

KAREY, Kenneth P.; SIRBASKU, David A. Glutaraldehyde fixation increases retention of low molecular weight proteins (growth factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis. **Analytical biochemistry**, v. 178, n. 2, p. 255-259, 1989.

KIM, Injeong; LEE, Sunhong; KIM, Sang Don. Determination of toxic organic pollutants in fine particulate matter using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1590, p. 39-46, 2019.

KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.

KRÁTKÝ, Martin et al. Salicylanilide diethyl phosphates as cholinesterases inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 58, p. 48-52, 2015.

KUMAR, TH Vignesh; SUNDRAMOORTHY, Ashok K. Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. **Analytica chimica acta**, v. 1074, p. 131-141, 2019.

LANG, Qiaolin et al. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. **Talanta**, v. 156, p. 34-41, 2016.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. Ed. 5 São Paulo: Sarvier, 1989.

LI, Shuaizhang, et al, Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides. **Toxicology in vitro**, 56, 93-100, 2019.

LIMA, Roberval Soares et al. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos: estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 9-17, 2007.

LIU, Qian et al. Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes/graphene oxide nanoribbons nanostructure. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 740, p. 8-13, 2015.

LU, Xiong et al. Bimetallic Pd@ Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 2575-2581, 2018.

MARQUES, Laura Antoniêta Araújo Soares et al. **Gestão de agrotóxicos: uma proposta de controle para o Estado do Maranhão**. 91f. 2017. Dissertação (Mestrado em Energia e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2017

MARQUES, Paulo Roberto Brasil de Oliveira; YAMANAKA, Hideko. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MAFTOUH, I. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chlorpyrifos-ethyl and its metabolites 3, 5, 6-Trichloro-2-Pyridinol and Diethylthiophosphate. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 100, n. 12, p. 1336-1349, 2020.

MAHMOUD, Montaser et al. The impacts of different heating systems on the environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 766, p. 142625, 2021.

MELLO, Renata Bacellar; MATTOS, Claudemar; MARTINS, Rodrigo Lemes. Impactos do uso de agrotóxicos sobre a riqueza e abundância de abelhas em Lumiar e São Pedro da Serra, Nova Friburgo, Rio de Janeiro–Brasil. **Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável**, v. 1, 309-315, 2021.

MELO, Danielle Brandão; CRUZ, Brisa Mariana Costa da; SANTANA, Lourenço Luiz Botelho de. Implicações Advindas do Emprego Indiscriminado de Agrotóxicos no Brasil. **Saúde em Foco**, p. 67-84, 2020.

MOHAMMED, S., LAMOREE, M., ANSA-ASARE, O. D., BOER, J. Review of the analysis of insecticide residues and their levels in different matrices in Ghana. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., 170, 361-372, 2019.

MOYO, Mambo; OKONKWO, Jonathan O.; AGYEI, Nana M. Recent advances in polymeric materials used as electron mediators and immobilizing matrices in developing enzyme electrodes. **Sensors**, v. 12, n. 1, p. 923-953, 2012.

NELSON, D. L; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 6.3.

NEVES, Paulo Alexandre Alves de Almeida. **Estudo microcalorimétrico da inibição da acetilcolinesterase pelo agrotóxico carbaryl**. Dissertação de mestrado. 91f. Mestrado em Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

NOGUEIRA, P. R. R. B, et al., Biossensores para detecção de pesticidas: processos de imobilização da enzima acetilcolinesterase. **Revista Transdisciplinar Logos e Veritas**, Vol. 01, nº 04, 33-46, 2014.

NUNES, G. S. et al. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 1, p. 1-8, 2001.

\_\_\_\_ G. S. et al. Ultrasensitive biosensors for the detection of insecticide residues in fruit juices. **Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Medical Sciences. Series VI**, v. 1, p. 29, 2008.

\_\_\_\_ G. S. et al. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. **Chemosphere**, v. 111, p. 623-630, 2014.

\_\_\_\_ G. S. RIBEIRO, M. L. Pesticidas: uso, legislação e controle. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, 1999.

OLIVEIRA, Camila Cardoso de et al. Manual para elaboração de cartas de controle para monitoramento de processos de medição quantitativos em laboratórios de ensaio. **Instituto Adolfo Lutz. São Paulo**, p. 18, 2013.

OLIVERO-VERBEL, R. et al. Organophosphate esters in airborne particles from subway stations. **Science of The Total Environment**, p. 145105, 2021.

PACHECO, Wagner Felipe et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAVANI, Nilton Dias. **Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos**. 64f. Monografia (Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.

PEREIRA, Neuma das Mercês. **Desenvolvimento e aplicação de um biossensor à base da enzima acetilcolinesterase empregando NTCPM/CoTSPc para a determinação de pesticidas organofosforados**. 122f. 2013. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

PINHEIRO, Juarez Mota. Alterações pluviométricas em 41 anos (1975-2015) ocasionadas por eventos de el niño na Ilha do Maranhão, Pré-Amazônia Brasileira. **Os Desafios da Geografia Física na Fronteira do Conhecimento**, v. 1, p. 1422-1431, 2017.

PIRES, Carmen Sílvia Soares et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

POSSAVATZ, Juliana et al. **Determinação de resíduos de pesticidas, em amostras de água e sedimento, na bacia hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso**. 92f. 2013. Dissertação de mestrado (Mestrado em Recursos Hídricos) – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2013.

PUNDIR, C. S., CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, 429, 19-31, 2012.

RAZZINO, Claudia do Amaral. **Desenvolvimento, caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para a determinação da carbaril**. 96f. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências- Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REDDY, KR Venugopal et al. The electrochemical investigation of carboxamide-PEG 2-biotin-CoPc using composite MWCNTs on modified GCE: the sensitive detections for glucose and hydrogen peroxide. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3330-3340, 2020.

RÊGO, Teresa Cristina Epifânio Diógenes. **Otimização e validação de metodologia para determinação multirresíduos de agrotóxicos em alface e solo empregando QuEChERS e LC-MS/MS**. 103 f. 2015. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

RUEDA, Nazzoly et al. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **The Chemical Record**, v. 16, n. 3, p. 1436-1455, 2016.

RODRIGUES, F. M., et al, Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. **Microchemical Journal**, 98, 56-61, 2011.

RODRIGUES, Núbia Fernanda Marinho. **Desenvolvimento de sensor bioinspirado em hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas**. 121f. 2018. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química- Doutorado em Química, Araraquara, São Paulo.

SANTOS, Adriana Miranda dos. **Estudos bioquímicos e cinéticos de acetilcolinesterases de formigas cortadeiras (Atta sexdens)**. 115f. 2017. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

SAKATA, Renata Parruca et al. Docking molecular, síntese e estudo biológico de potenciais inibidores da beta-secretase (BACE-1) e da acetilcolinesterase (AChE). 2018.

SGOBBI, Livia Flório. **Desenvolvimento de um biossensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento**. 120f. 2016. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

SGOBBI, Livia Flório. **Potencialidades do ácido 4-[(1E) etanohidrazonoil] benzóico como biomimético para a esterase da acetiltiocolina**. 117f. Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos -Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.

SHABAN, Nema S.; ABDON, Khaled A.; HASSAN, Nour El-Houda Y. Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. **Beni-suef university journal of basic and applied sciences**, v. 5, n. 1, p. 102-106, 2016.

SHAMAGSUMOVA, Rezeda V. et al. Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar [5] arene. **Talanta**, v. 144, p. 559-568, 2015.

SILVA, Emanuelle Gonçalves da et al. **Agrotóxicos no Brasil: comparativo da atual legislação com o Projeto de Lei nº 6.299/2002**. 51f. 2019. Monografia (Graduação em Direito) – Universidade Federal de Campina Grande, Sousa, 2019.

SILVA, Fernanda Gabrielle Soares. **Avaliação da qualidade de solos e águas subterrâneas no Estado do Maranhão, em relação a alguns parâmetros físico-químicos e também à presença de pesticidas organofosforados**. 73f. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Química analítica – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016

SILVA, Sérgio Macedo et al. Nota técnica: inspeção de pulverizadores e qualidade na aplicação de produtos fitossanitários. **Revista engenharia na agricultura-reveng**, v. 24, n. 5, p. 439-449, 2016.

SOARES, Juliana Coatrini. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da uréase em filmes de polipirrol**. 127 f. 2010. Tese de Doutorado (Doutorado em engenharia de materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SONGA, Everlyne A.; OKONKWO, Jonathan O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. **Talanta**, v. 155, p. 289-304, 2016.

SOUTO, L. A. S., **Desenvolvimento de biossensores amperométricos à base de acetilcolinesterase para detecção de microcistinas**. 76f. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Química analítica – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

SOUZA, Gustavo dos Santos et al. Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3269-3280, 2017.

STEPURSKA, K. V. et al. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. **Analytica chimica acta**, v. 854, p. 161-168, 2015.

TALARICO, Daria et al. Screen-printed electrode modified with carbon black and chitosan: a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 26, p. 7299-7309, 2016.

TALEAT, Zahra; KHOSHROO, Alireza; MAZLOUM-ARDAKANI, Mohammad. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9-10, p. 865-891, 2014.

TANG, Wenzhi et al. Unmodified screen-printed silver electrode for facile detection of organophosphorus pesticide. **Ionics**, v. 21, n. 2, p. 587-592, 2015.

TELLES, Milena. **Relação entre sistema colinérgico e formação de reserva cognitiva após treino de atenção semanal em camundongos infundidos cronicamente com peptídeo B-amiloide**. 60f. Dissertação - Mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

TOH, Saw Yi et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. **Biosensors and bioelectronics**, v. 64, p. 392-403, 2015.

TOPAL, Ahmet et al. The in vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity of rainbow trout brain. **Journal of applied animal research**, v. 44, n. 1, p. 243-247, 2016.

TOSCANO, Ilda AS et al. 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.

VÁSQUEZ, Paula Catalina Hoyos. **Cinética de inibição por produto e substrato da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

VIEIRA, Lucas Campos Curcino et al. Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase. 161f. Dissertação de mestrado. Ufscar. 2010.

WU, Shuo et al. Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2864-2869, 2011.

YANMAZ, Evşen et al. Drone networks: Communications, coordination, and sensing. **Ad Hoc Networks**, v. 68, p. 1-15, 2018.

YOON, Yong-Jin et al. Microfluidics biosensor chip with integrated screen-printed electrodes for amperometric detection of nerve agent. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 198, p. 233-238, 2014.

YU, Shuang Yu et al. Organochlorine pesticides in ambient air from the littoral cities of northern China: spatial distribution, seasonal variation, source apportionment and cancer risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 652, p. 163-176, 2019.

ZHAI, Chen et al. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 124-130, 2013.

## ANEXO A

Figura A1. Espectrofotômetro UV/Vis (Biospectro SSP-220, Madison, EUA) utilizado nas medidas.



Figura A2. potenciostato/ galvanostato do tipo Micro-AUTOLAB Tipo III, Methrom, Países Baixos, ligado aos conectores, adaptador para sensor eletroquímico, e um computador contendo o software GPES.

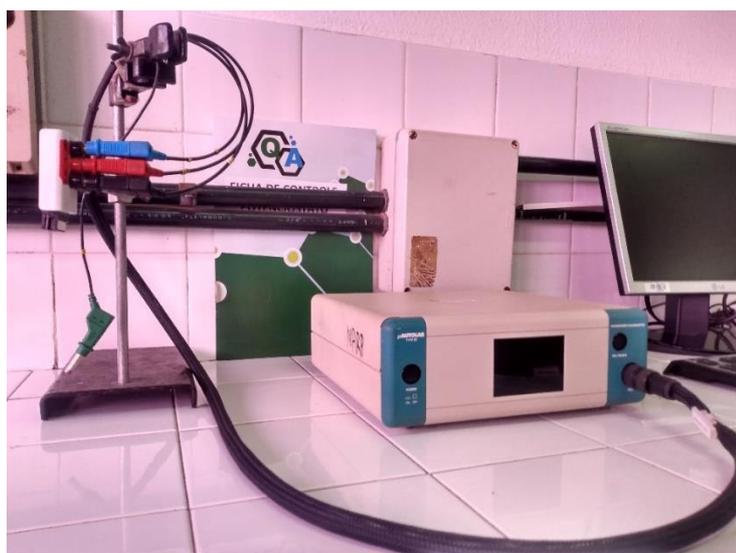


Figura A3. Máquina de serigrafia em processo de fabricação de sensores eletroquímicos conforme deposição de camadas finas de tinta e as respectivas pastas de grafite e Ag/AgCl em placa fina de PVC.

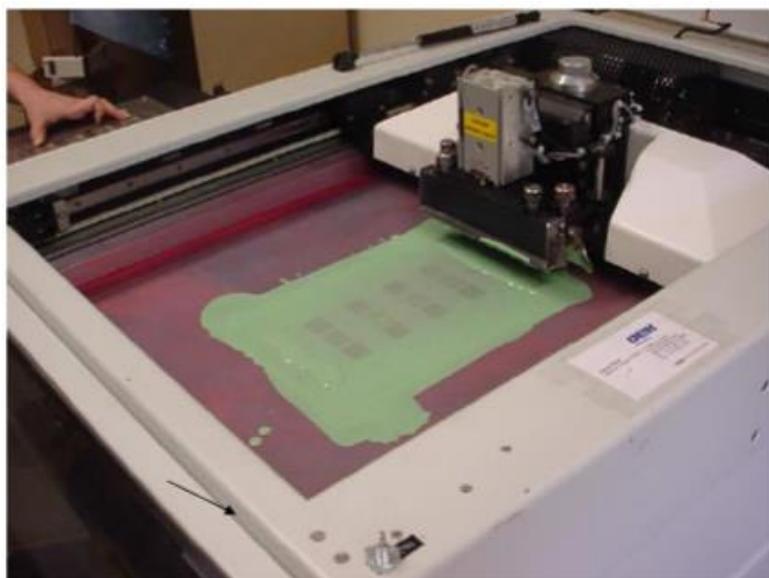
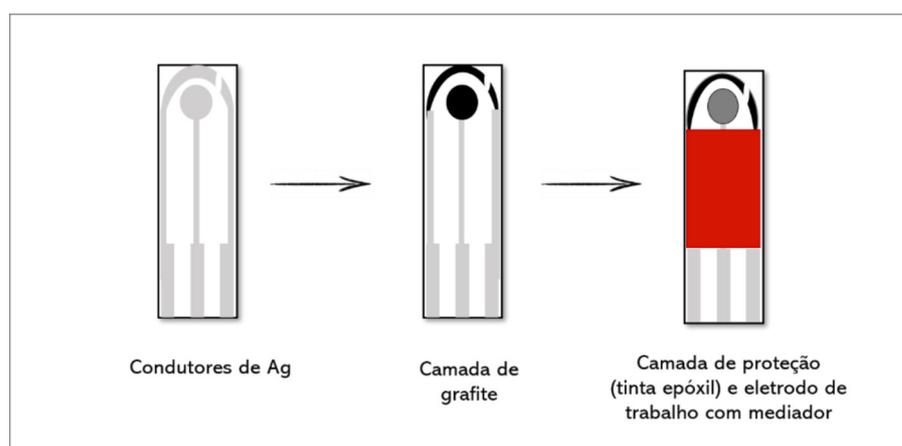


Figura A4. Representação do esquema de deposição referentes às partes componentes do sensor eletroquímico.



Adaptado de Bécker (2019)

Figura A5. Cartela de sensores eletroquímicos com modificador azul de Meldola- sal reinecken 2 camadas (MBRS 2X), utilizados na montagem de biossensores à base de AChE.

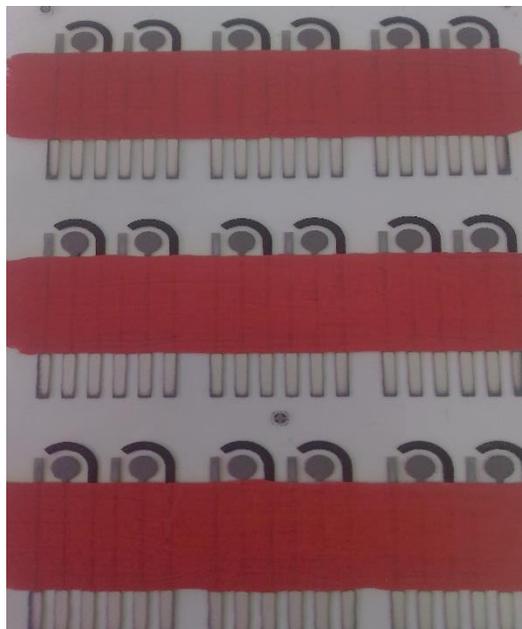
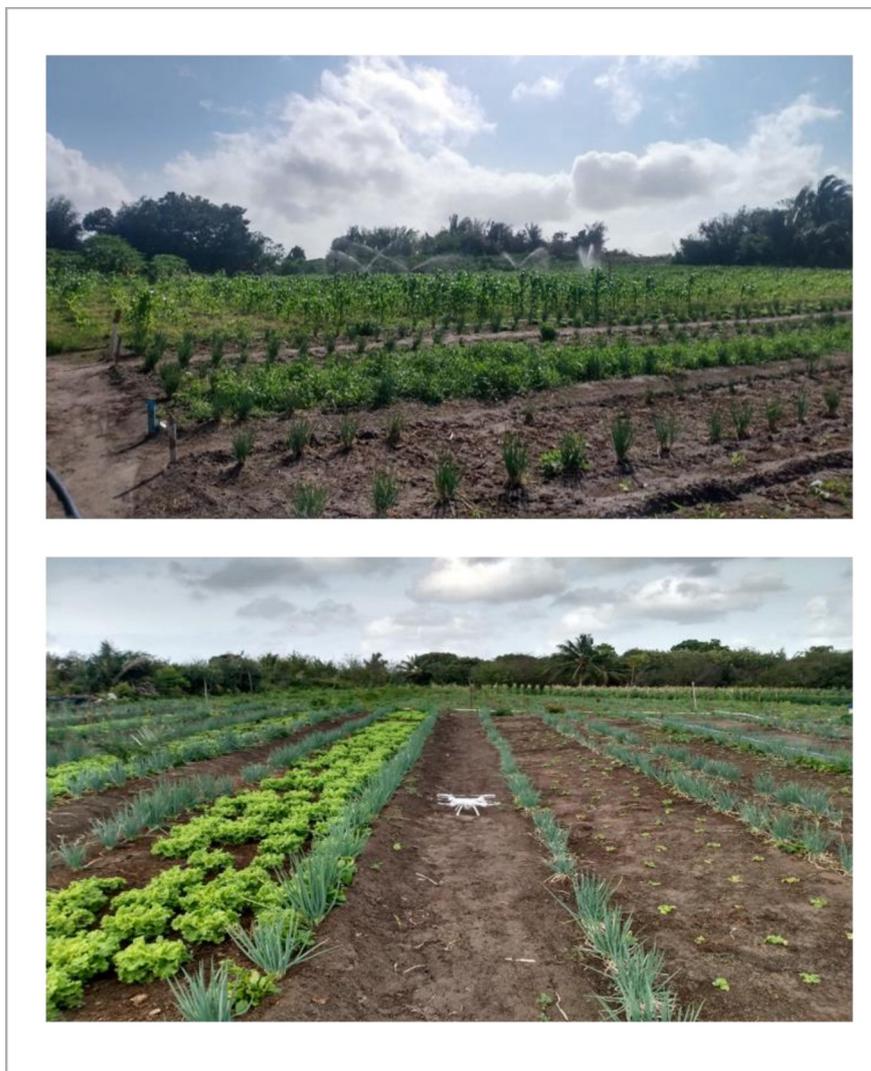


Figura A6. Biossensor acoplado ao drone para realizar medidas em campo.



Figura A7. Terreno de cultivo de hortaliças em que foram realizadas as medidas de inibição.



## ANEXO B

Tabela B1. Coordenadas geográficas referentes aos pontos utilizados para monitoramento com Biossensor acoplado à drone, em Paço do Lumiar na região metropolitana da Ilha do Maranhão.

Pontos	Coordenadas
1	2° 28'08.5" S 44°08'16,8" W
2	2° 28'08.1" S 44°08'18,5" W