

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

DARLAN FERREIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EMPREGANDO SPME-GC/MS E
BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA ANÁLISE DO INSETICIDA
PARATION METÁLICO EM AMOSTRAS DE ARROZ *IN NATURA***

São Luís
2010

DARLAN FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EMPREGANDO SPME-GC/MS E
BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA ANÁLISE DO INSETICIDA
PARATION METÍLICO EM AMOSTRAS DE ARROZ *IN NATURA***

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

Orientadora: Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes

São Luís
2010

Silva, Darlan Ferreira da.

Desenvolvimento de métodos empregando spme-gc/ms e biossensores amperométricos para análise do inseticida paration metílico em amostras de arroz *in natura*/ Darlan Ferreira da Silva. – 2010.

73 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Gilvanda Silva Nunes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós – Graduação em Química Analítica, 2010.

1. Cromatografia a gás. 2. Microextração em fase sólida. 3. Biossensores amperométricos.
I. Título.

CDU 543. 544.3

DARLAN FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EMPREGANDO SPME-GC/MS E
BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA ANÁLISE DO INSETICIDA
PARATION METÍLICO EM AMOSTRAS DE ARROZ *IN NATURA***

Dissertação de Mestrado defendida por Darlan Ferreira da Silva e aprovada em 11 de outubro de 2010 pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Teresa Cristina do Santos Franco
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Maria Del Pillar Taboada Sotomayor
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do NARP: Antônio Fernandes (Júnior), Thiessa, Virgínia, Lia, Marcelle, Ilmar e demais pessoas do meu convívio durante os trabalhos em laboratório.

À profa, Dra. Gilvanda por ter me auxiliado nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho

À Nilia, por todo o carinho e compreensão durante esta etapa da minha vida.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Eletroanalítica (UNESP-Araraquara) por todo o auxílio prestado.

Ao Thiago (Caramujo) e ao Miguel Ramirez, pela receptividade e convívio durante minha estadia em Araraquara.

À Profa Dra. Hideko Yamanaka, pela receptividade e supervisão durante o trabalho com biossensores realizado no Laboratório de Eletroanalítica (UNESP- Araraquara) e principalmente pelo auxílio durante problemas de saúde enfrentados.

LISTA DE FIGURAS

Parte 1

- Figura 1.1. Modos de extração por microextração em fase sólida. (a) Extração a uma altura pré-definida da solução (headspace-SPME); (b) Extração direta por SPME 23
- Figura 1.2. Fluxograma do processo de microextração em fase sólida do pesticida paration metílico, diretamente em amostras de arroz fortificadas, seguida de análise por GC/MS 28
- Figura 1.3. Espectrograma do inseticida paration metílico. Modo de operação: *Full-scan*; faixa: 200-360 m/z; com voltagem do multiplicador (1×10^{-5}) de 300 V; com multiplicador *offset* de 0 volts e corrente de emissão de 10 μ A; tempo de ionização pré-scan de 100 μ s 32
- Figura 1.4. Rota de fragmentação do composto paration metílico. Fórmula estrutural do composto-pai (a); íons 125 e 109, respectivamente, originados da fragmentação do composto-pai (b) e (c) 33
- Figura 1.5. Cromatograma obtido da análise do inseticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em uma solução padrão de concentração de 1 mg.L^{-1} . Condições operacionais: hélio como gás de arraste (fluxo: 1 mL.min^{-1}); temperatura do injetor: 240°C ; temperatura na coluna programada de 80°C (mantida por 1 min) até 180°C (12 min) a uma faixa de $30^\circ\text{C.min}^{-1}$; teor 1 mg.L^{-1} . Tempo total de corrida: 16,50 min. Tempo de retenção do composto: 15,33 min 34
- Figura 1.6. Curva analítica para o pesticida paration metílico, obtida pela injeção em triplicata em cada nível de concentração 35
- Figura 1.7. Cromatogramas obtidos de amostras de arroz polido fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A), $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (C). Condições operacionais conforme Figura 1.5 37
- Figura 1.8. Cromatogramas obtidos de amostras de arroz com casca fortificadas com o inseticida paration metílico, em níveis de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A), $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (C). Condições operacionais conforme Figura 1.5 40
- Figura 1.9. Cromatogramas obtidos de amostras de arroz integral fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B). Condições operacionais conforme Figura 1.5 42

Parte 2

- Figura 2.1: Reação da acetiltiocolina (substrato) com a enzima AChE, com a formação da tiocolina 53
- Figura 2.2: Reação da acetiltiocolina até a formação do composto 5-tionitrobenzoato (Método de Elman) 56
- Figura 2.3. Voltamograma gerado nos testes de otimização do sistema empregando biossensores. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; tempo de modulação: 0,05 s; intervalo entre medidas: 0,5 s; potencial inicial= 0; potencial final: 0,6 V; amplitude da modulação: 0,05055 V 59
- Figura 2.4: Curvas de inibição relativa (IR) para as enzimas AChE ee (enguia elétrica), AChE eb (eritrócito bovino), AChE (Dros) B08-29-44 e AChE (Dros) B12, usando biossensor de pasta de carbono com 10mU/mL de enzima..... 61
- Figura 2.5: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (Dros) B08. S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 min com o pesticida em concentrações de 10^{-3} , 2×10^{-3} e 10^{-2} mg.L⁻¹ respectivamente. Condições do teste: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh): 2mM em tampão fosfato pH 7,5; volume de solução de substrato: 100 μ L 64
- Figura 2.6: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (Dros) B12. S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 min com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} e 10^{-2} mg.L⁻¹ respectivamente. Condições do teste: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh): 2mM em tampão fosfato pH 7,5; volume de solução de substrato: 100 μ L..... 65
- Figura 2.7: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (ee). S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 min com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} e 10^{-2} mg.L⁻¹ respectivamente. Condições do teste: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh): 2mM em tampão fosfato pH 7,5; volume de solução de substrato: 100 μ L 66
- Figura 2.8: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (eb). S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 min com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} e 10^{-2} mg.L⁻¹ respectivamente. Condições do teste: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh): 2mM em tampão fosfato pH 7,5; volume de solução de substrato: 100 μ L 67

LISTA DE TABELAS

Parte 1

Tabela 1.1. Parâmetros de calibração do método de separação cromatográfica por GC/MS	36
Tabela 1.2. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz polido.....	38
Tabela 1.3. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz com casca	41
Tabela 1.4. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz integral.....	43

Parte 2

Tabela 2.1. Faixa linear, limite de detecção e dados da curva de calibração	62
Tabela 2.2. Recuperações obtidas empregando-se os biossensores amperométricos construídos com diferentes enzimas	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	enzima acetilcolinesterase
BSA	soro albumina bovina
CW-PDMS	carbowax-polidimetilsiloxano
CW-DVB	carbowax-divinilbenzeno
C-18	octadecilsilano
Dros	<i>Drosophila Melanosgaster</i>
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DI-SPME	microextração em fase sólida direta
GC	cromatografia a gás
GC/MS	cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
HS	<i>headspace</i>
HS-SPME	microextração em fase sólida por <i>headspace</i>
IQ	Instituto de Química
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
NARP	Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas
PDMS	polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PA	poliacrilato
SPME	Microextração em fase sólida
SPE	Extração em fase sólida
SPME-GC/MS	microextração em fase sólida com cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	12
PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO HEADSPACE-SPME-GC/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DO INSETICIDA PARATION METÍLICO EM AMOSTRAS DE ARROZ <i>IN NATURA</i>	
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Geral	15
1.2.2 Específicos	15
1.3 REVISAO DE LITERATURA	15
1.3.1 Classificação dos Pesticidas quanto à Toxicidade	17
1.3.2 Descrição dos Grupos de Inseticidas	18
1.3.2.1 Organoclorados	18
1.3.2.2 Organofosforados	19
1.3.2.3 Carbamatos	19
1.3.2.4 Piretróides	20
1.3.4 Cromatografia a Gás e Microextração em Fase Sólida	20
1.3.4.1 Microextração em fase sólida	22
1.3.4.2 Microextração em <i>headspace</i>	24
1.4 MATERIAS E MÉTODOS	26
1.4.1 Reagentes, Soluções e Demais Materiais	27
1.4.2 Preparo das Amostras: Ensaio de Fortificação	27
1.4.3 Microextração em Fase Sólida Utilizando Padrões Analíticos	29
1.4.4 Instrumentação	29
1.4.5 Análise dos Dados	30
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
1.5.1 Estabelecimento de Condições Analíticas para Determinação do Paration Metílico 	31
1.5.1.1 Possibilidade de Identificação do Inseticida Paration Metílico: Análise Qualitativa	31
1.5.1.2 Análise Quantitativa do Paration Metílico	34
1.5.2 Exatidão do Método: Resultados das Recuperações	38
1.6 CONCLUSÕES PARCIAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

PARTE 2: DETECÇÃO DO INSETICIDA PARATION METÁLICO EM EXTRATOS DE ARROZ *IN NATURA* EMPREGANDO BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS.

2.1	INTRODUÇÃO	51
2.2	OBJETIVOS	53
2.2.1	Geral	53
2.2.2	Específicos	54
2.3	REVISÃO DE LITERATURA	54
2.4	MATERIAS E MÉTODOS	55
2.4.1	Reagentes	55
2.4.2	Equipamentos	56
2.4.3	Determinação da Atividade Enzimática	56
2.4.4	Imobilização Enzimática	56
2.4.5	Preparo do Biossensor	57
2.4.6	Preparo das Amostras de Arroz	57
2.4.7	Medidas Amperométricas e Ensaio de Inibição	58
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
2.5.1	Estudo Eletroquímico para Seleção do Potencial de Trabalho	58
2.5.2	Otimização do Procedimento de Imobilização Enzimática	59
2.5.3	Otimização dos Ensaio de Inibição	59
2.5.4	Construção de Curvas Analíticas e Determinação da Sensibilidade do Método	59
2.5.5	Análise Direta do Inseticida Paration Metílico em Amostras de Extrato de Arroz	61
2.5.6	Exatidão do Método	62
2.6	CONCLUSÕES PARCIAIS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	Considerações Gerais	73

RESUMO

Os inseticidas organofosforados, em especial aqueles à base do princípio ativo paration metílico, têm sido extensivamente usados na proteção de cultivos de arroz no Estado do Maranhão. Neste trabalho, foi otimizado um método cromatográfico para determinação do inseticida paration metílico usando microextração em fase sólida em ambiente confinado (*headspace*), seguido de análise empregando cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (HS-SPME-GC/MS). Métodos eletroanalíticos empregando biossensores amperométricos também foram desenvolvidos, tendo sido empregados para análise do composto em amostras de arroz *in natura*. O método otimizado empregando SPME resultou em resultados satisfatórios quanto à sensibilidade (limite de detecção: 0,026 mg/L⁻¹), precisão (coeficientes de variação entre 6,1 e 22,4%; 8,8 e 32,5% e 19,7 a 24,6%, para as amostras de arroz polido, arroz com casca e arroz integral respectivamente) e exatidão (recuperações na faixa de 73,2 a 90%, para as amostras de arroz polido; de 88,7 a 89,5 %, para as amostras de arroz com casca e de 59,5 a 60,6%, para as amostras de arroz integral). No caso dos biossensores, estes foram construídos à base de enzimas acetilcolinesterase (AChE), comerciais e geneticamente modificadas, tendo sido os sensores preparados com pasta de carbono modificada com o mediador TCNQ (tetracianoquinodimetano). Melhores sensibilidades foram verificadas com sensores preparados à base de enzimas AChE extraídas da *Drosophila Melanogaster*. Limites de detecção de 10; 0,05 e 0,001 μg.L⁻¹ foram encontrados para os sensores preparados com as enzimas AChE (ee), AChE (eb) e mutantes (AChE (Dros) B08 e B12), respectivamente. A eficiência do método de detecção do inseticida paration metílico em amostras de arroz sem nenhum prévio tratamento foi comprovada pelas recuperações médias de 103,9%; 101 %; 102,3% e 105,6 % para os sensores preparados com as enzimas AChE (ee), AChE (eb), AChE (Dros) B08 e B12 respectivamente. De modo geral, a técnica cromatográfica empregada foi prática e eficiente para detecção direta de resíduos do inseticida em amostras de arroz, em uma faixa maior de concentração (0,1 a 1 mg.Kg⁻¹). Já os biossensores foram mais sensíveis e eficientes em teores menores (0,0005 a 0,01 mg.Kg⁻¹) do inseticida no arroz, considerando ainda a vantagem adicional da rapidez e menor custo da técnica analítica.

Palavras-chave: Cromatografia a gás. Microextração em fase sólida. Biossensores amperométricos. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Organophosphate insecticides, especially those based on the active ingredient methyl parathion, have been extensively used in crop protection of rice in the State of Maranhão. In this work, an optimized chromatographic method for determination of the methyl parathion insecticide by using solid phase microextraction in a confined environment (headspace) followed by analysis employing gas chromatography with mass spectrometric detection (HS-SPME-GC/MS). Electroanalytical methods using amperometric biosensors were also developed and used to analyze the composite samples of fresh rice. The optimized method using SPME resulted in satisfactory results for sensitivity (limit of detection: 0.026 mg/L⁻¹), precision (coefficients of variation between 6.1 and 22.4%, 8.8% and 32.5 and 19.7 and 24.6%, for milled rice samples, rice with shells and full rice, respectively) and accuracy (recoveries ranging from 73.2 to 90% for milled rice samples, from 88.7 to 89.5%, for paddy rice samples and from 59.5 to 60.6% for full rice samples). In the case of biosensors, these have been built based on acetylcholinesterase enzyme (AChE), commercially obtained or genetically modified, having the sensors prepared with carbon paste modified with TCNQ (tetracyanoquinodimethane) mediator. Better sensitivities were observed with sensors based on AChE enzymes extracted from *Drosophila melanogaster*. Detection limits of 10.0, 0.05 and 0.001 µg.L⁻¹ were found for the sensors based on AChE (ee), AChE (eb) and mutant enzymes (AChE (Dros) B08 e B12), respectively. The efficiency of the detection method of the methyl parathion insecticide in rice samples without any previous treatment was evidenced by an average recovery of 103.9%, 101%, 102.3% and 105.6%, for the sensors prepared with AChE (ee), AChE (eb), AChE (Dros) B08 and B12 enzymes, respectively. In general, the chromatographic technique used was practical and efficient for direct detection of insecticide residues in rice samples in a wider range of concentration (0.1 a 1 mg.Kg⁻¹). Since the biosensor was more sensitive and effective in smaller amounts (0.0005 a 0.01 mg.Kg⁻¹) of such insecticide in rice, considering the additional advantage of speed and decreasing cost of the analytical technology.

Keywords: Gas chromatography. Solid phase microextraction. Amperometric Biosensors. Acetylcholinesterase.

Parte 1:

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO HEADSPACE-
SPME-GC/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DO
INSETICIDA PARATHION METÍLICO EM AMOSTRAS DE
ARROZ *IN NATURA*

PARTE 1

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO HEADSPACE-SPME-GC/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DO INSETICIDA PARATION METÁLICO EM AMOSTRAS DE ARROZ *IN NATURA*

1 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma planta anual, monocotiledônea e da família das Gramíneas (Poaceae). Pode ser cultivado sob diferentes sistemas, quais sejam: arroz irrigado, cultivado em várzeas sistematizadas, arroz de terras baixas, no qual o controle de irrigação é feito mediante lamina d'água; arroz de sequeiro ou terras altas, dependendo exclusivamente de precipitações pluviais ou das formas de irrigação (Silva, 2004).

O arroz é um dos grãos mais produzidos no mundo, sendo uma importante fonte de nutrientes. Aproximadamente 60% da população mundial consome o arroz, sendo a Ásia um dos seus principais produtores e consumidores (Nguyena *et al*, 2008). O uso de pesticidas em campos de cultivo deste grão faz-se necessário para aumentar a produtividade da cultura. Conseqüentemente, resíduos de pesticidas no grão podem ocorrer pelo uso inadequado de pesticidas durante o plantio e a armazenagem.

Não obstante seja o arroz uma importante fonte de alimento, a qualidade dos grãos pode ser comprometida pela presença de resíduos de pesticidas. O Brasil tem uma produção de arroz de aproximadamente 10 milhões de toneladas e pesticidas são rotineiramente usados e integrados em programas de monitoramento para reduzir perdas por pragas (EMBRAPA, 2002).

Pesticidas são amplamente usados no controle de pragas em agricultura com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola. São uma das fontes de contaminação de água com sérios riscos para saúde humana e animal. Adicionalmente, causam alterações nos ecossistemas com conseqüências prejudiciais para o ambiente e a agricultura, devido ao surgimento de organismos mais resistentes e de novas doenças em decorrência do aumento da necessidade do uso de mais agrotóxicos (Menezes, Santos e Pereira, 2010).

O aumento da poluição ambiental e dos alimentos por de pesticidas, das mais variadas classes químicas, tem estimulado o desenvolvimento de técnicas apropriadas para avaliação destes compostos em diferentes tipos de alimentos e bebidas em geral, pois estes são os principais caminhos de ingestão pelo homem (Tadeu *et al*, 2000).

1.2 Objetivos

Esta parte do trabalho visa a desenvolver um método rápido para análise de resíduos do inseticida organofosforado paration metílico, utilizando a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e extração por microextração em fase sólida. O método foi avaliado segundo sua seletividade, sensibilidade e exatidão.

1.2.1 Geral

Desenvolver e estabelecer condições analíticas para determinação do inseticida paration metílico em amostras de arroz polido, com casca e integral, empregando técnicas cromatográficas.

1.2.2 Específicos

- a) otimizar a separação cromatográfica do inseticida organofosforado paration metílico empregando um sistema de cromatografia à gás acoplada a detecção por espectrometria de massas, com auxílio de microextração em fase sólida por *headspace* (SPME-GC/MS);
- b) determinar a eficiência do processo de extração mediante uso da fibra de polidimetilsiloxano, analisando-se a eficiência do método através dos ensaios de recuperação com amostras de arroz fortificadas;
- c) avaliar o método analítico com relação aos seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade e exatidão,
- d) aplicar o método otimizado na determinação da concentração do inseticida paration metílico em amostras de arroz *in natura*.

1.3 Revisão de literatura

Em 1930, compostos orgânicos sintéticos, com propriedades letais para vários tipos de pestes que atacam as colheitas, foram lançados no mercado. Em 1939, foi sintetizado o diclorodifeniltricloroetano (DDT) que, naquela época, era um dos mais eficientes pesticidas. Posteriormente, foram surgindo outros compostos mais poderosos e eficazes e atualmente,

podem ser encontrados no mercado diferentes pesticidas com propriedades bem específicas e ação mais eficaz (Lima, 2002).

Além do controle eficiente dos insetos-pragas, patógenos e das ervas daninhas, espera-se que ocorra redução do impacto ambiental de tais substâncias no solo, na água e no ar. Da forma como o controle de pragas tem sido feito, com a utilização de grandes quantidades de agroquímicos, as diversas culturas onde tais substâncias são aplicadas merecem atenção, especialmente aquelas que ocupam grandes extensões de terras, como ocorre com as cultura de soja e arroz, por exemplo. Nesse contexto, existem em torno de 300 princípios ativos distribuídos em mais de 2000 formulações que são empregados nas mais diversas culturas, finalidades e modalidades de uso (Lara e Batista, 1992).

Hoje são raras as culturas onde os pesticidas não sejam usados. Entretanto, é importante procurar várias formas de minimizar os impactos nocivos sobre o ambiente e sobre os seres humanos, pois o crescimento da produção de defensivos agrícolas decorre da crescente demanda do consumo (Lima, 2002).

Como sintomas da intoxicação aguda por inseticida organofosforados, podem ser descritos suor, salivação, lacrimejamento, fraqueza, tontura, dores e cólicas abdominais, seguidos de vômito, dificuldades respiratórias, colapso, tremores musculares, convulsões e morte (Pires, Caldas e Recena, 2005). Os organofosforados causam também efeitos neurológicos retardados após a exposição crônica, incluindo confusão e fraqueza muscular (Alavanja, Hoppin e Kamel, 2004). A exposição crônica a estes compostos pode levar ao desenvolvimento de sintomas de depressão, um fator importante nos suicídios. Outros autores complementam referindo que a exposição crônica ao agrotóxico esta relacionada, entre outros, ao câncer, efeitos teratogênicos, neuropatias e toxicidade reprodutiva (Caldas e Souza, 2000).

A elevada prevalência de quadros de intoxicação pelos agrotóxicos, tanto aguda como crônica, reflete a precariedade com que são realizadas as atividades de controle de pragas no campo, sem proteção por equipamentos de segurança e com o uso indiscriminado de substâncias químicas prejudiciais ao meio ambiente, às espécies e ao homem. Alguns autores comentam que a frequência de sinais e sintomas provêm de uma ocorrência elevada de casos de contaminação humana por exposição simultânea a inúmeros produtos, utilizados geralmente na forma de coquetel, em curtos intervalos de reaplicação e sem a adoção das adequadas medidas de segurança (Araújo *et al*, 2007).

1.3.1 Classificação dos Pesticidas Quanto à Toxicidade

A classificação dos pesticidas constitui tema de controvérsia, pois várias denominações têm sido empregadas para designar sua ação, tais como defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas e agrotóxicos. Pela legislação brasileira, tais compostos são denominados de “agrotóxicos” e classificados como inseticidas, fungicidas e herbicidas. A denominação “pesticida” é dada à substância ou à mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir direta e indiretamente insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura (Sanchez *et al*, 2003).

Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas: I = rótulo vermelho (altamente tóxicos); II = rótulo amarelo (medianamente tóxicos); III = rótulo azul (pouco tóxicos) e IV = rótulo verde (praticamente não-tóxicos).

1.3.2 Descrição dos Grupos de Inseticidas

1.3.2.1 Organoclorados

Dentre os pesticidas mais utilizados destacam-se os inseticidas organoclorados, que são hidrocarbonetos clorados com características associadas às poucas possibilidades de reação que podem sofrer, sendo a descloração e a oxidação um processo que só se realiza em nível enzimático. Tais compostos são pouco solúveis em água e solúveis em gordura; portanto, tendem a se acumular nos tecidos gordurosos dos animais e ao longo da cadeia alimentar. O exemplo mais comum desse tipo de princípio ativo é o DDT (Barrigossi, Lanna e Ferreira, 2004).

Os organoclorados apresentam em sua estrutura átomos de carbono e cloro e surgiram comercialmente na década de 40. Tais inseticidas constituem importantíssimo grupo, e compreendem o DDT e vários outros produtos comerciais como o Aldrin, o Dieldrin, o Pentaclorofenol, etc (Santisteban, 1999).

Os pesticidas organoclorados são extremamente tóxicos e apresentam elevada estabilidade e capacidade de bioacumulação, podendo gerar problemas ambientais e de saúde (Galli *et al*, 2006).

Como os compostos organoclorados são muito lipossolúveis e se acumulam nas gorduras dos organismos, eles percorrem rapidamente a cadeia alimentar, com resultados desastrosos para espécies, incluindo o homem, que ocupa o topo desta cadeia (Lopez e Matuo, 1990).

Os pesticidas clorados podem ser introduzidos no organismo através das vias cutânea, digestiva e respiratória. A eficiência da absorção dermal é variável. Os hexaclorocicloexanos, incluindo o Lindano, e ciclodienos, como Aldrin, Dieldrin e Endossulfan, são eficientemente absorvidos quando em contato com a pele. No entanto, a maior introdução no organismo de produtos como o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e o Dicofol ocorre através dos alimentos, principalmente com os que contém elevada quantidade de gordura. Além dos alimentos, a absorção dos pesticidas pode ocorrer através das vias respiratórias, por absorção de partículas de pó contaminadas pelos pesticidas (Flores *et al*, 2004).

1.3.3.2 Organofosforados

Os pesticidas organofosforados possuem em sua estrutura um átomo de fósforo central pentavalente, ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre por uma dupla ligação. Estes são menos persistentes no ambiente que os organoclorados, contudo possuem efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, pois são inibidores da enzima acetilcolinesterase, essencial para transmissão de impulsos nervosos. Assim como os organoclorados, os organofosforados são lipossolúveis, sendo contaminantes em potencial para diversos tipos de alimentos (Baird, 2000).

Pesticidas do grupo dos organofosforados são compostos anticolinesterásicos que causam variado grau de toxicidade para o ser humano e são amplamente utilizados na agricultura há muitas décadas. Em razão do benefício do agrotóxico para o sucesso do plantio, o trabalhador tem a tendência de superestimar seus efeitos benéficos para o plantio, desconsiderando os efeitos maléficos à saúde em curto, médio e longo prazos (Körbes *et al*, 2010).

Em virtude do efeito inibidor das acetilcolinesterases, os pesticidas organofosforados podem ocasionar, em mamíferos, diversos efeitos, tais como lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores por intoxicação aguda e distúrbios cardiorespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidez e mortalidade por tais produtos (Ecobichon e Joy, 1991).

O efeito crônico leva a sintomas de intoxicação que podem ser praticamente confundidos com o mal de Parkinson, depressão, fadiga, confusões mentais entre outros, que mascaram a sua causa (Baird, 2000).

Um dos inseticidas organofosforados mais utilizados na agricultura brasileira, na atualidade, é o paration metílico.

O paration metílico é um inseticida organofosforado que teve sua introdução no mercado no início de 1950. Foi originalmente desenvolvido pela empresa alemã Bayer. É um pesticida não-sistêmico que mata as pragas, agindo como veneno no estômago. Ele é usado para controlar insetos mastigadores e sugadores em uma gama de culturas, incluindo cereais, frutas, legumes, plantas ornamentais, algodão e outros. O paration metílico é geralmente aplicado como pulverizante, principalmente como uma formulação de concentrado emulsionável (Tomlin, 1994).

O paration metílico é classificado como extremamente tóxico, ou classe I. É altamente tóxico por inalação e ingestão e moderadamente tóxico por absorção cutânea (também é facilmente absorvido pela pele). A dose letal em ratos é de 2,9 mg.Kg⁻¹, em camundongos é 33,1-119,5 mg.Kg⁻¹, em coelhos é de 19-420 mg.Kg⁻¹ e cães é de 50 mg.Kg⁻¹. Quando inalado o primeiro efeito adverso é o sangramento ou corrimento nasal, tosse, desconforto no peito e dificuldade respiratória. Contato com a pele pode causar sudorese localizadas e contrações musculares involuntárias. Após a exposição por qualquer via, outros efeitos sistêmicos podem começar dentro de minutos, ou ser adiada por 12 h. Estes podem incluir palidez, náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais, cefaléia, tontura, dor ocular, visão turva, visão de constrição ou dilatação das pupilas, lágrimas, saliva, sudorese e confusão. Em casos graves, a intoxicação afetará o sistema nervoso central, produzindo em coordenação, fala arrastada, perda de reflexos, cansaço, fraqueza e eventual paralisia das extremidades do corpo e dos músculos respiratórios. A morte pode ser causada por insuficiência respiratória e parada cardíaca (EXTOXNET, 1994).

O paration metílico tem uma meia-vida em solução aquosa de 175 dias e 10 dias a dois meses de solos. A taxa de degradação aumenta com a temperatura e com a exposição à luz solar. Quando uma grande concentração do paration metílico atingir o solo, como em um derramamento acidental, a degradação irá ocorrer apenas depois de muitos anos (Howard, 1989).

1.3.3.3 Carbamatos

Os carbamatos são usados como inseticidas e acaricidas. São compostos muito instáveis em condições neutras e alcalinas, em temperatura ambiente (Galli *et al*, 2006).

No sistema respiratório, a presença dos carbamatos leva à diminuição da atividade da acetilcolinesterase e ao agravamento do quadro clínico, que inclui aumento acentuado das secreções brônquicas e dispnéias sibilias que parecem ser devidos a efeitos muscarínicos (Ecobichon e Roy, 1991).

A forma mais comum de morte é a falência dos órgãos, que ocorre como resultado da broncoconstrição, da broncorreia e da paralisia dos órgãos respiratórios e depressão dos centros respiratórios (Lemus, 2000).

Genericamente, diz-se que organofosforados atravessam mais a barreira hematoencefálica do que os carbamatos, sendo o quadro de relevância nas intoxicações aguda. Assim, a inibição de enzima acetilcolinesterase pelos organofosforados é irreversível, enquanto pelos carbamatos é reversível (Amorim *et al*, 2005).

1.3.3.4 Piretróides

Os inseticidas piretróides foram originalmente obtidos a partir de compostos de origem natural, tais como piretro, nicotina e ácido crisantêmico. Apesar de possuírem menor toxicidade que a maioria das outras classes de inseticidas, podem apresentar longa persistência em ambientes fechados, uma vez que são utilizados como inseticidas domésticos (Esteve-Turrillas *et al*, 2004).

Os piretróides são mais eficientes e seguros, pois são seletivos e não apresentam toxicidade elevada para os mamíferos. São largamente usados em diversos tipos de cultura no controle de insetos, podendo ser eventuais contaminantes de alimentos (Galli *et al*, 2006).

1.3.4 Cromatografia à Gas e Microextração em Fase Sólida

A cromatografia é um procedimento analítico bem estabelecido com uma história de usos de várias décadas. Constitui-se em um método que vem sendo continuamente aperfeiçoado através de suas novas variantes e modificações dos procedimentos (Eiceman *et al*, 2002).

A maioria das operações químicas, incluindo as análises químicas, envolve a separação de misturas em seus componentes individuais. O processo de análise fica simplificado e agilizado se os componentes do material a ser analisado puderem ser separados em frações ou isolados individualmente (Neto e Nunes, 2003).

Os métodos cromatográficos constituem um grupo diversificado e importante de métodos aplicáveis a todos os ramos da ciência, pois há necessidade do desenvolvimento de novas metodologias de análise, mais rápidas e confiáveis, que resultem em métodos mais robustos de caracterização de misturas complexas, com procedências distintas (Silva, 2007).

A cromatografia a gás do inglês, *gas chromatography* (GC), por exemplo, é fundamentada em aspectos como a utilização de uma fase móvel baseada em um fluxo de gás inerte e a potencialidade de análise de compostos voláteis e semi-voláteis. É uma modalidade da cromatografia que encontra uso intensivo, principalmente devido aos conseqüentes desenvolvimentos tecnológicos; sendo assim, a cromatografia a gás constitui-se em uma poderosa técnica de separação que permite a detecção de analitos puros. Em outros termos, a cromatografia a gás prepara de forma muito mais eficiente os compostos para identificação e quantificação (Valente e Augusto, 2000).

A cromatografia a gás tem sido bastante utilizada na pesquisa de compostos de usos agrônomico e farmacêutico, além de contaminantes ambientais, entre outros. Detectores específicos, tais como detector por captura de elétrons, detector espectrométrico de massas, detector por ionização em chama, entre outros, são bastante conhecidos na determinação de resíduos de pesticidas por GC (Nguyen *et al*, 2008).

A qualidade de um método analítico está sujeita à qualidade de suas etapas, levando-se em consideração seus erros experimentais. Faz-se então imprescindível obter uma fração representativa da amostra, onde haja condições de identificar e quantificar os analitos, que presumivelmente definem a amostra. É conveniente que estas frações não tenham ou gerem interferências, além de incompatibilidades com os equipamentos analíticos. São assim empregados procedimentos de preparo de amostras, onde se procura isolar e concentrar os analitos, como também obter um nível de limpeza que não comprometa a análise química (Valente e Augusto, 2000).

Enquanto técnica analítica, a GC depende da qualidade da etapa de preparo de amostra, pois quase nenhuma amostra pode ser diretamente injetada num cromatógrafo a gás (Valente e Augusto, 2000). Portanto, a viabilização da análise por CG fica sujeita a um método adequado de preparação de amostra.

A constante de distribuição dos compostos por GC é determinada pela temperatura da coluna cromatográfica e pela extensão das interações intermoleculares entre o analito e a fase estacionária sólida ou líquida, já que a fase móvel gasosa é responsável apenas pelo transporte do analito através da coluna, não participando do mecanismo de retenção (Abraham, Poole e Poole, 1999).

Um dos métodos já bem conhecido para preparo de amostras é a microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction, SPME*) que apresenta diversas vantagens, tais como: não utilização de solventes, alto poder de concentração dos analitos, aplicabilidade a muitos tipos de compostos e facilidade de transportar o material extraído para o cromatógrafo (Silva, 2007).

A técnica de microextração em fase sólida foi introduzida por Arthur e Pawlyszin (1990), Pawlyszin (1997), Pawlyszin (1999) e Zhang, Yang e Pawlyszin (1994) como uma alternativa para outros métodos de extração, porque integra a amostra, extrai, concentra e introduz a amostra para a análise, sem o uso de solventes. Na SPME, a extração dos analitos da amostra matriz para a fibra acontece sempre na mesma seqüência, com a fibra coberta que pode estar imersa na amostra líquida, técnica conhecida como SPME direta, *DI-SPME* ou no próprio ambiente confinado ou *headspace* (técnica conhecida com *HS-SPME*) (Lambropoulou, Konstantinou e Albanis, 2007).

Na técnica HS-SPME, a fibra coberta é suspensa sobre a amostra dentro do recipiente de vidro. Depois que o equilíbrio é alcançado após 15 a 20 min, a fibra é introduzida dentro do injetor do GC, onde os analíticos são termicamente desorvidos e analisados. Fatores que influenciam os passos de extração incluem tipo de fibra, tempo de extração, força iônica, pH da amostra, temperatura de extração e agitação da amostra (Tsoutsis, Hela e Albanis, 2006).

Variáveis que afetam os passos de desorção incluem a temperatura e o tempo de desorção focado na temperatura do injetor. Como a técnica é limitada para compostos relativamente voláteis e seus efeitos são notados em matrizes complexas, é necessário um adicional cuidado na otimização de diferentes condições e parâmetros experimentais. Gilbert-López, Garcia-Reyes e Molina Díaz (2008), consideram a técnica não apropriada para análise multiresidual. Contudo, inúmeros trabalhos empregando esta técnica têm sido reportados na literatura, objetivando analisar resíduos de pesticidas em diferentes amostras (Viñas *et al*, 2009; Zhu *et al*, 2009; Menezes Filho *et al*, 2010; Cortés-Aguado *et al*, 2008).

1.3.4.1 Microextração em Fase Sólida

Basicamente, a microextração em fase sólida é uma técnica de extração baseada em seringa adaptada com uma agulha recoberta com uma camada de material adsorvente. O dispositivo básico para SPME consiste em um bastão de fibra ótica de sílica fundida com uma extremidade recoberta com um filme fino de polímero (material adsorvente) (Valente e

Augusto, 2000). Para segurança da fibra, o sistema é montado em um dispositivo semelhante a uma seringa, conhecido como aplicador ou *holder*. O material sorvente pode ser exposto diretamente na solução ou acima da solução a uma altura pré-definida, o que é denominado *headspace* (*HS-SPME*), e os compostos voláteis são então sorvidos (Figura 1.1).

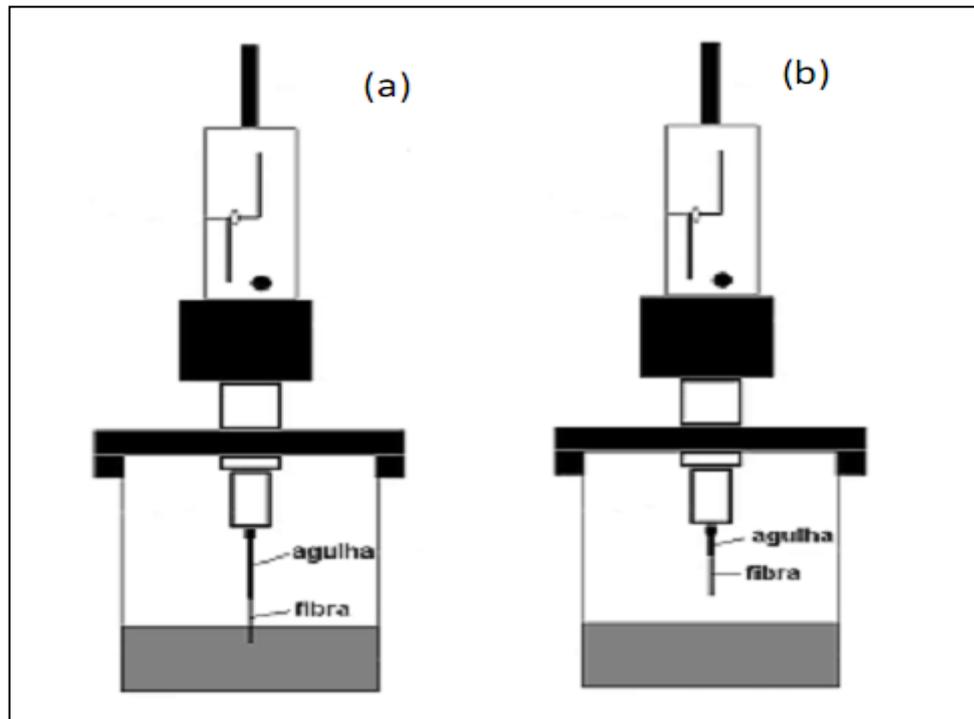


Figura 1.1 Modos de extração por microextração em fase sólida. (a) Extração a uma altura pré-definida da solução (*headspace-SPME*); (b) Extração direta por *SPME*.

O tipo de sorção depende do material constituinte da fibra, que é determinada pela natureza química dos analitos. A seleção da fibra é baseada primeiramente na polaridade e na volatilidade dos compostos-alvo, a fim de alcançar a seletividade e a eficiência na extração (Grinberg *et al*, 2003).

A *SPME* direta (Figura 1a) apresenta grande sensibilidade analítica, pois opera em contato direto da fibra com os analitos na amostra. No entanto, é uma técnica indicada para análises de matrizes aquosas isentas de materiais particulados ou componentes que possam contaminar ou deteriorar a fibra e/ou impedir a subsequente análise por GC (Valente e Augusto, 2000).

A HS-SPME (Figura 1b) é especialmente indicada para analitos de média e alta volatilidade, apresentando como principais vantagens a maior preservação da integridade da fibra, devido ao fato de que a fibra não entra em contato com a matriz da amostra, e diminuição da ocorrência de carryover, ou seja, diminuição da ocorrência de analitos não completamente desorvidos (ainda sorvidos na fibra) que provavelmente produzirão falsos sinais em análises subsequentes. Embora esse efeito conhecido como *carryover*, é bastante pronunciado no modo *HS-SPME* já que a extração dos compostos depende da intensidade da interação analito-fibra.

Em ambas as modalidades, uma agitação eficiente propicia alcance rápido da condição de equilíbrio entre a matriz e o polímero, diminuindo o tempo de extração (Silva, 2007).

1.3.4.2 Microextração em *Headspace*

A técnica de *HS-SPME* é baseado em uma fibra de sílica fundida, coberta com uma fase estacionária polimérica e montada em uma seringa para cromatografia gasosa modificada, que será exposta ao *headspace* acima da amostra líquida ou sólida. A absorção dos analitos sobre o revestimento da fibra fornece mais equilíbrio ao processo existente entre a amostra no recipiente de vidro e a fase gasosa que a envolve. Essa adicional constante de equilíbrio de partição poderá também ser incluída em todo processo de calibração, mas na prática o equilíbrio de partição muitas vezes não é alcançado (Lord e Pawliszyn, 2000).

A chave do problema quando se aplica HS-SPME está no desenvolvimento do método, e a decisão primária para a análise é a escolha do melhor adsorvente que será hábil para reter os analitos traços (Lambropoulou, Konstantinou e Albanis, 2007).

Vários tipos de fibra têm sido utilizados como adsorvente, entre elas poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), carbowax-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) e o polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB). A maioria dos métodos de extração por *headspace* empregam fibras de PDMS (100 μm de diâmetro), que possui a maior capacidade para extração de compostos apolares e pode efetivamente coletar os diferentes componentes da amostra por *headspace*. Como passo seguinte, as condições no *vial* podem ser otimizadas. A adição de sal, o pH, as temperaturas de extração, a relação da amostra, o *headspace* e o tempo de incubação são parâmetros importantes para se ter uma melhor eficiência na extração (Pawliszyn, 1997).

Um aumento na temperatura da amostra faz aumentar a volatilidade do analito e, finalmente, a sensibilidade do *headspace*. Mas com SPME esse efeito é neutralizado por uma redução simultânea da concentração no revestimento da fibra (Mills e Walker, 2000).

O tempo de dessorção do analito da fibra depende da volatilidade do analito, da temperatura de dessorção e da espessura do revestimento da fibra, que varia de 7 e 10 μm . Geralmente, tempos de dessorção elevados e altas temperaturas no injetor são recomendados para uma rápida dessorção (Theodoridis, Koster e Jong, 2000).

É muito comum o procedimento para dessorção dos analitos da fibra em SPME, que é a dessorção térmica. Esta ocorre no injetor do cromatógrafo a gás, pois esse método de dessorção elimina completamente o uso de solventes orgânicos. Os analitos adsorvidos na fibra também podem ser dessorvidos pelo uso de solventes orgânicos polares, tais como metanol e acetonitrila. Esse caminho é usado para combinar essa técnica de extração com a cromatografia a líquido ou a eletroforese capilar. Para a cromatografia a líquido, existe um dispositivo comercial que permite a dessorção de todos os analitos acumulados na fibra diretamente para o injetor do sistema cromatográfico. Esse sistema proporciona um aumento da sensibilidade do método (Picó *et al*, 2007).

Existem dois caminhos para dessorção dos analitos na fibra. Quando os analitos não são fortemente adsorvidos na fibra, o modo de dinâmica da dessorção por um movimento do fluxo da fase móvel é suficiente. Mas, quando o analito está fortemente adsorvido na fibra, esta é mergulhada na fase móvel ou em outro solvente específico, por um determinado tempo. Dessorções feitas desse modo são chamadas de dessorções estáticas (Parreira e Cardeal, 2005).

Quando a SPME foi desenvolvida, tal atenção foi dada para a extração de pesticidas em matrizes biológicas, ambientais e de alimentos. Desde então, o trabalho neste campo foi continuado, e a técnica por HS-SPME tem sido freqüentemente usada como uma técnica de rotina para extração de pesticidas de amostras líquidas e sólidas. Evidentemente, os organofosforados e organoclorados são os grupos de pesticidas mais estudados por HS-SPME, devido à sua estabilidade térmica e à sua volatilidade (Lambropoulou, Konstantinou e Albanis, 2007).

A vantagem da SPME pode ser completamente e facilmente explorada pelo modo *headspace*. O enriquecimento dos analitos é único, em comparação com outros métodos de preparo de amostra. É consideravelmente mais simples que puxar e armazenar em seringas comuns, tendo em mente que as seringas comumente usadas em cromatografia não enriquecem a amostragem (Picó *et al*, 2007).

Desde a sua apresentação, a SPME tem ganhado popularidade como uma técnica livre de solventes, confiável e uma ferramenta flexível para amostragem de uma variedade de compostos voláteis e não-voláteis. Além de amostras de água, amostras de frutas e vegetais têm sido também analisadas por SPME, estas últimas sendo submetidas a uma extração prévia com solvente (Cai *et al*, 2006).

A fibra de SPME pode também ser suspensa no *headspace* sobre a amostra homogeneizada. Essa opção, chamada de headspace-SPME (HS-SPME), elimina interferentes, pois a fibra não entra em contato com a matriz complexa de frutas e vegetais. Várias classes de pesticidas têm sido extraídos de matrizes complexas com HS-SPME (Chang e Doong, 2006).

Ao contrário do mais convencional método de extração, a SPME não é empregada para extrair todos ou a maior parte dos analitos de uma amostra. É esse aspecto da SPME que pode fazer uma calibração problemática. Calibração em SPME é usualmente feita por adição de padrões preparados em água pura. Para amostras ambientais heterogêneas, supõe-se que uma fibra de SPME poderia vir a equilibrar apenas com analitos livremente dissolvidos em fase aquosa ou em vapor, dependendo da metodologia usada. Entretanto, em uma amostra, a fibra interage diretamente com cada fase nesta amostra. Por exemplo, como um analito é retirado de uma fase dissolvida por absorção da fibra, o analito é subsequente reabastecido via reequilíbrio em outras fases na amostra. Embora as recuperações sejam baixas, a boa repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos permitem uma quantificação satisfatória dos analitos (Picó *et al*, 2007).

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório do Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

1.4.1 Reagentes, Soluções e Demais Materiais

Foi utilizada fibra para SPME com revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm de espessura, da Supelco), Metanol e sulfato de sódio, foram obtidos da Merck, (Darmstadt, Alemanha). Foram preparadas soluções de estoque e de trabalho do pesticida paration metílico (Sigma-Aldrich) em metanol. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição do pesticida no mesmo solvente para a concentração de 10 mgL⁻¹. Estas soluções

foram utilizadas na construção das curvas analíticas, na determinação da linearidade do método e nos ensaios de fortificação.

1.4.2 Preparo das Amostras: Ensaios de Fortificação

As amostras de arroz foram adquiridas em comércio local, com garantia de produção orgânica (sem uso de pesticidas e/ou fertilizantes). As amostras foram acondicionadas em papel e resfriadas a 4°C antes da análise, procedida em no máximo 24 h.

Inicialmente, as amostras de arroz foram trituradas, e uma massa de 2 g transferida para um béquer de 20 mL, tendo sido em seguida fortificada com o inseticida paration metílico. Os níveis de fortificação foram de 0,1; 0,2 e 1,0 mg.Kg⁻¹. A amostra fortificada foi deixada em contato com o pesticida durante 30 min. Após esse tempo, procedeu-se à adição de 10 mL de água destilada e 0,5 g de Na₂SO₄, e seguiu-se à etapa de adsorção/dessorção na fibra do sistema SPME automatizado com posterior análise cromatográfica do pesticida. A Figura 1.2 resume as etapas de preparo da amostra.

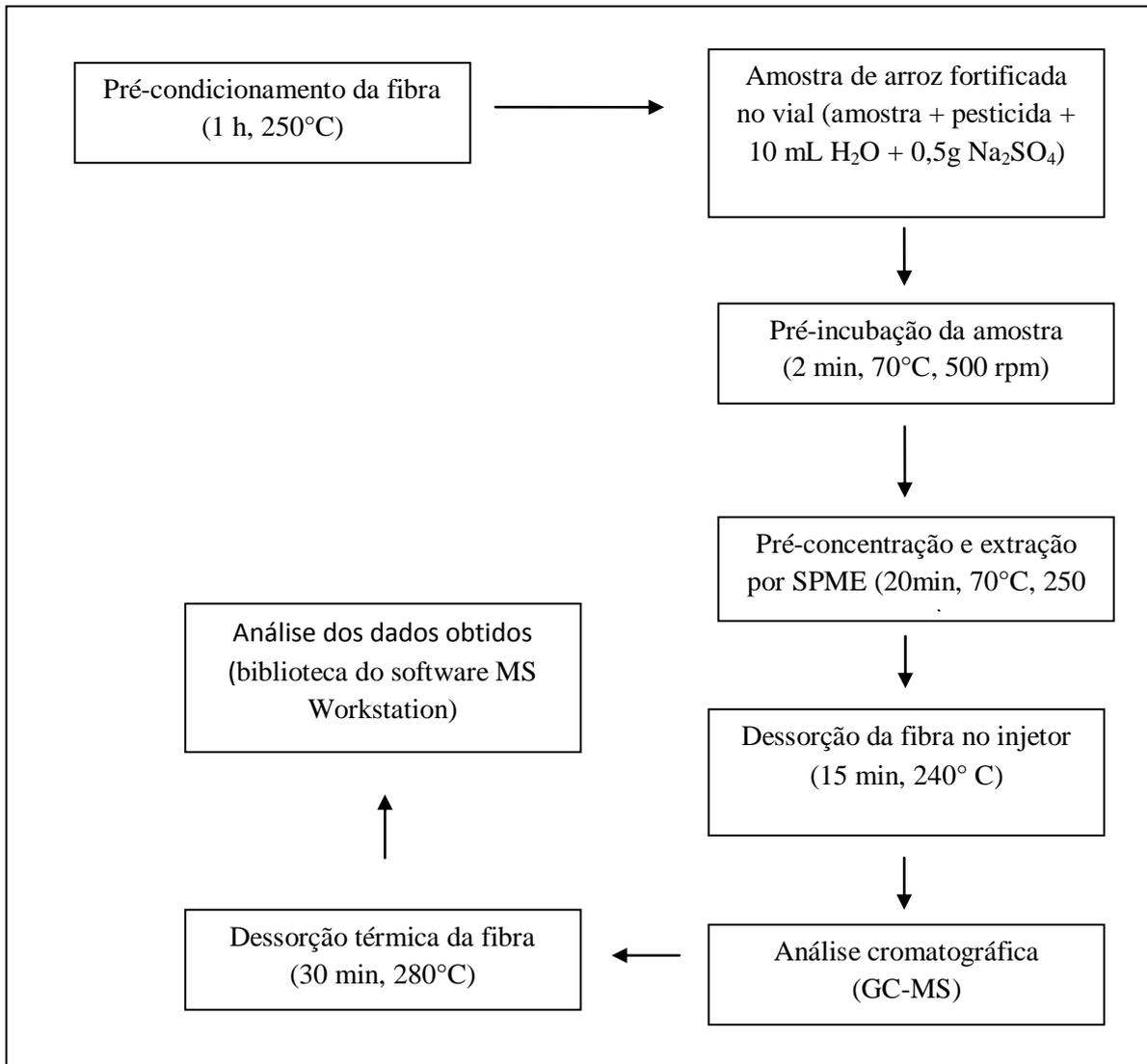


Figura 1.2. Fluxograma do processo de microextração em fase sólida do pesticida paration metílico, diretamente em amostras de arroz fortificadas, seguida de análise por GC/MS.

Para cada nível de fortificação, foram obtidas 7 repetições, totalizando 21 determinações para as amostras de arroz integral, polido e com casca. A escolha dos níveis de fortificação foi baseada no limite aceitável do inseticida paration metílico no arroz, que é de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$, de acordo com a legislação brasileira (MAPA, 2006). Assim, $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ equivale à metade deste nível, e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$, cinco vezes o valor máximo permitido. Este procedimento foi otimizado e adotado na determinação do inseticida em amostras de arroz comerciais.

1.4.3 Microextração em Fase Sólida Utilizando Padrões Analíticos

Para otimização do procedimento por SPME, foi utilizado um volume de 1 mL da solução do padrão, em concentração de 10 mg.L^{-1} , preparada por diluição da solução estoque em água. O procedimento de extração e pré-concentração do pesticida organofosforado foi realizado empregando-se o procedimento padrão de microextração do *headspace*. A fibra para microextração em fase sólida foi inicialmente pré-condicionada a 250°C por 1 h, em seguida o equipamento (amostrador) procedeu com a incubação da amostra e, logo após, a fibra foi posicionada a certa altura da amostra aquosa por um determinado tempo. Transcorrido o tempo de extração do analito da amostra, o composto extraído foi dessorvido termicamente dentro do injetor do cromatógrafo a gás por 15 min a 240°C .

No processo de microextração, utilizou-se um volume constante do padrão em frasco tipo espaço confinado (*headspace*) de 20 mL de capacidade, com septos de borracha butílica faceados com teflon e sob agitação magnética constante. As condições otimizadas do método foram: volume de amostra no recipiente de 10 mL; adição de 0,5 g de sulfato de sódio anidro ao recipiente; ajuste da temperatura para 70°C no agitador; tamanho da agulha de 2 cm; tempo total de extração de 40 min; dessorção térmica a 280°C durante 30 min; temperatura de dessorção da fibra de 240°C durante 15 min; agitação a 250 rpm.

Na etapa de otimização do procedimento de SPME optou-se por um volume de amostra de 10 mL em um frasco de 20 mL, após testes com diferentes volumes de amostra. Após definido o volume, foi selecionada uma massa de 0,5 g Na_2SO_4 , como sendo a quantidade a ser usada nos ensaios, segundo recomendado por Capobianco e Cardeal (2005), a fim de facilitar o processo de extração pela fibra, como também para evitar sua saturação. No processo de dessorção da fibra, foi empregado um tempo de 15 min.

1.4.4 Instrumentação

As análises foram efetuadas usando-se um cromatógrafo a gás Varian modelo 3900, equipado com um injetor com e sem divisão de fluxo (*split/splitless*) e um detector espectrométrico de massas Saturn 2100T (Varian). O multiplicador de elétrons foi operado a 2300 V no modo de monitoração *full scan*. A temperatura da linha de transferência e o tempo

de não-ionização (*delay time*) foram de 280°C e 5 min, respectivamente. O injetor sem divisão de fluxo (*splitless*) foi mantido a 240°C e a purga do divisor fechada por 5 min. Foi utilizada uma coluna capilar VF-5 MS *Factor Four* (30 m x 0,25 mm id., 0,25 µm de espessura do filme, com a pressão na cabeça da coluna controlada a 15 psi) e hélio como gás de arraste (fluxo de 1 mL min⁻¹). A temperatura da coluna foi programada de 80°C (1min) até 180°C (mantida por 12 min), seguida de rampa de crescimento térmico a 30°C min⁻¹. A temperatura do injetor foi mantida a 240°C durante toda a corrida cromatográfica.

O processo de extração e pré-concentração foi realizado adaptando-se a fibra de PDMS em um amostrador automático CombiPAL (CTC analytics, Suíça), equipado com uma bandeja para acondicionar 32 recipientes com capacidades de 10 e 20 ml.

Resumidamente, para as análises por GC/MS, foram fixados os seguintes parâmetros: fluxo do gás de arraste de 1 mL.min⁻¹; pressão de trabalho do gás de 100 psi; temperatura do injetor de 240°C; temperatura na coluna iniciando a 80°C, mantida por 1min, em seguida aumentando até 180°C, numa faixa de 30°C min⁻¹, e depois mantida por 12 min.

1.4.5 Análise dos Dados

O tratamento dos dados cromatográficos foi realizado mediante comparação dos espectros de massas obtidos com a biblioteca do software MS Workstation Version 6.9 Varian do GC-MS. Para monitoramento dos dados, o espectrômetro de massas foi empregado em modo *Full-scan* na faixa de 200 a 360 m/z, com multiplicador de voltagem (1×10^{-5}) de 300 V, multiplicador *offset* de 0 volt e corrente de emissão de 10 µA, e tempo de ionização do tipo *pre-scan* de 100 µs .

Para determinação dos parâmetros de calibração, foram utilizadas faixas de concentração variando de 0,1 a 2,0 mg.L⁻¹. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pelas seguintes equações: LD= 3,3 x a/b e LQ= 10 x a/b, onde: a=coeficiente linear e b=coeficiente angular.

A comparação das médias nos ensaios de recuperação foi realizada por análise de variância, em um nível de 95% de probabilidade mediante o teste F.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a microextração, a partição do pesticida organofosforado entre as fases aquosa e polimérica de polidimetilsiloxano se processa até que o equilíbrio seja obtido. A constante de equilíbrio de cada pesticida depende da maior ou menor solubilidade dos pesticidas na fibra. A fase polimérica usada neste trabalho já tem destaque na literatura por sua eficiência na extração do inseticida paration metílico e de outros pesticidas (Capobiango e Cardeal, 2005; Lambropoulou, Psillakis e Albanis, 2004; Yao *et al*, 2001; Sampedro *et al*, 2000; Silva, Cardeal e Carvalho, 1999). A escolha desta fase polimérica deu-se pelo fato de que o polidimetilsiloxano pode ser aplicado tanto para compostos polares quanto apolares, justificando a elevada afinidade pelo paration metílico, que possui polaridade mediana (Lambropoulou, Psillakis e Albanis, 2004).

Silva, Cardeal e Carvalho (1999), em um trabalho envolvendo a extração de dez pesticidas organofosforados empregando a técnica SPME, obtiveram máxima capacidade de extração em um tempo total de 60 min. No presente trabalho, 20 min foram suficientes para obter resultados satisfatórios para o pesticida paration metílico. De fato, naquele trabalho, pode-se verificar que o sinal observado para este composto, considerando o tempo de extração entre 25 e 60 min, não teve um incremento significativo a partir de 30 min. Neste caso, houve um ganho em rapidez na análise do paration metílico, mesmo considerando a maior complexidade da matriz.

1.5.1 Estabelecimento de Condições Analíticas para Determinação do Paration Metílico

1.5.1.1 Possibilidade de Identificação do Inseticida Paration Metílico: Análise Qualitativa

A identificação do princípio ativo foi feita mediante monitoramento dos íons selecionados (SIM). A Figura 1.3 mostra o espectrograma do composto. Os fragmentos utilizados para identificação dos picos do paration metílico foram: [M], [M-138] e [M-154], cujas relações m/z foram iguais a 263, 125 e 109, e abundâncias relativas foram de 86, 85 e 100%, respectivamente.

O tipo de fragmentação não permitiu o aparecimento do íon molecular protonado, $[M+1]$, provavelmente devido à elevada voltagem aplicada. A Figura 1.4 tem-se uma possível rota de fragmentação do composto-pai, originando os íons $[M-138]$ e $[M-154]$. Uma das fragmentações provavelmente ocorreu em uma das duplas ligações do anel aromático do composto, resultando no íon de massa 109, e a outra, em uma clivagem sobre uma ligação entre oxigênio e fósforo, resultando no íon de massa 125.

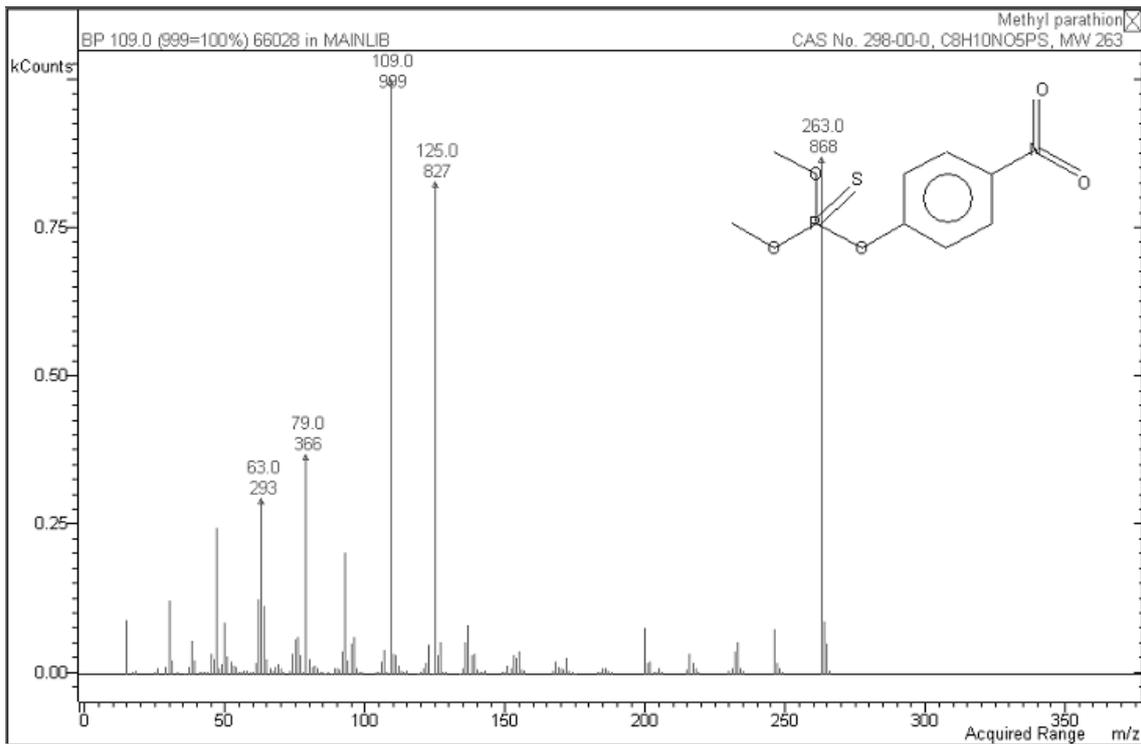


Figura 1.3. Espectrograma do inseticida paration metílico. Modo de operação: *Full-scan*; faixa: 200-360 m/z; com voltagem do multiplicador (1×10^{-5}) de 300 V; com multiplicador *offset* de 0 volts e corrente de emissão de 10 μA ; tempo de ionização pré-scan de 100 μs .

1.5.1.2. Análise Quantitativa do Paration Metílico

A Figura 1.5 mostra o cromatograma de uma solução do pesticida em uma concentração de 1 mg.L^{-1} em modo *headspace*, preparado em água destilada em um frasco de 20 mL. Sucessivas injeções de padrões possibilitaram as etapas de calibração do método analítico.

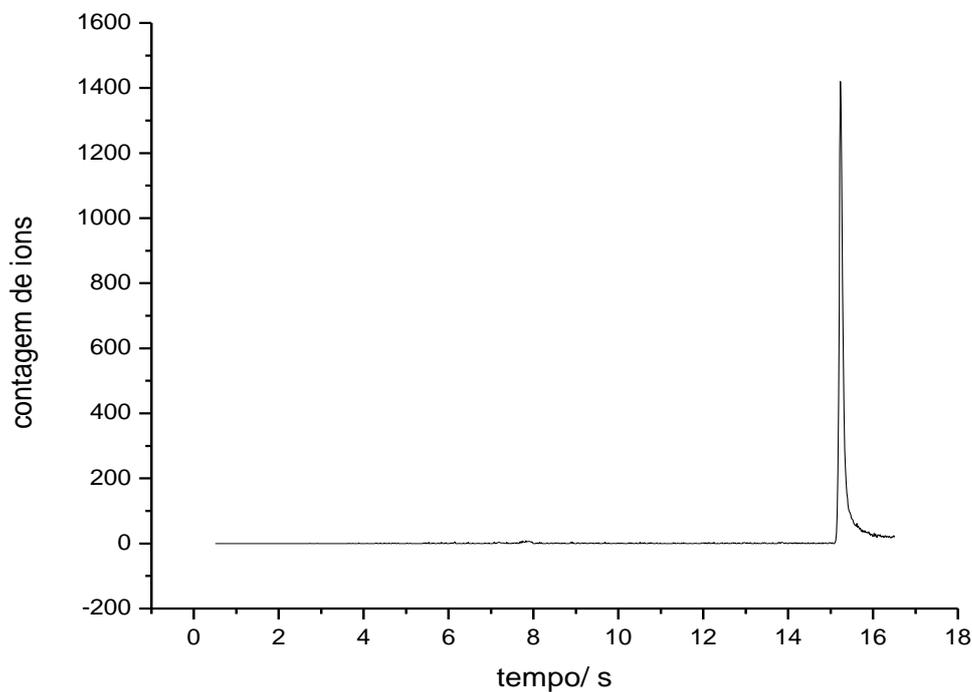


Figura 1.5. Cromatograma obtido da análise do inseticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em uma solução padrão de concentração de 1 mg.L^{-1} . Condições operacionais: hélio como gás de arraste (fluxo: 1 mL.min^{-1}); temperatura do injetor: 240°C ; temperatura na coluna programada de 80°C (mantida por 1 min) até 180°C (12 min) a uma faixa de $30^\circ\text{C.min}^{-1}$. Tempo total de corrida: 16,50 min. Tempo de retenção do composto: 15,33 min.

Comparando-se os resultados obtidos com o método empregando HS-SPME com aqueles obtidos pela extração direta do pesticida, durante os testes de otimização, percebeu-se que houve uma melhora significativa no sinal e no formato do pico cromatográfico, que apresentou-se bem definido e sem interferentes.

Para isso, o parâmetro relacionado ao tempo de extração foi avaliado, assim como o tempo de dessorção da fibra, a velocidade de agitação da amostra e o volume do recipiente,

pois afetam diretamente a sensibilidade do método, dependendo inclusive do tipo de matriz a ser analisada. O aumento do volume da solução de trabalho no recipiente e também da temperatura do agitador resultaram em uma melhora no sinal analítico, quando comparados com outros trabalhos envolvendo este tipo de otimização (Capobiango e Cardeal, 2005; Silva, Cardeal e Carvalho, 1999).

Em análise por HS-SPME utilizando *headspace*, uma baixa definição no sinal analítico pode estar relacionada com um tempo inadequado para extração do composto de interesse, assim como um tempo inferior ao necessário para total dessorção deste composto na fibra utilizada (Picó *et al*, 2007). A Figura 1.6 apresenta a curva analítica para o inseticida paration metílico, obtida de injeções em triplicata do padrão, mostrando as dispersões randômicas em torno de cada ponto.

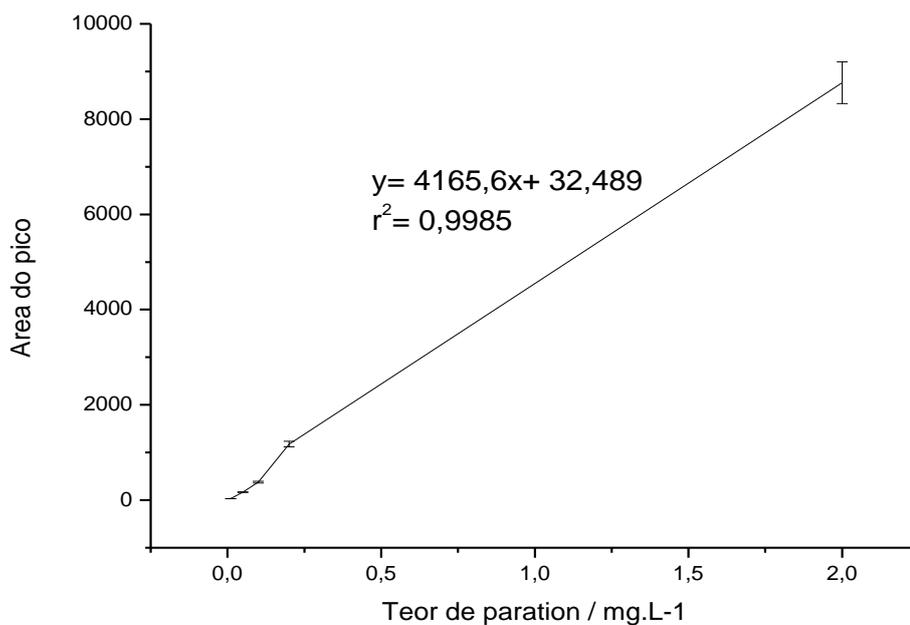


Figura 1.6. Curva analítica para o pesticida paration metílico, obtida pela injeção em triplicata em cada nível de concentração. Condições operacionais conforme Figura 1.5.

Pode-se observar que as condições operacionais do método foram satisfatórias para a determinação do pesticida, sem prejuízo na identificação deste, considerando-se a presença de co-extrativos que foram eluídos antes do tempo de retenção do paration metílico.

Os parâmetros de calibração para análise do paration metílico estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Parâmetros de calibração do método de separação cromatográfica por GC/MS

Curva linear	Coefficiente de correlação linear (r²)	Limite de detecção (mg.L⁻¹)	Limite de quantificação (mg.L⁻¹)
Y= 4165,6X + 32,489	0,9985	0,026	0,078

O limite de detecção do método de separação pode ser considerado adequado, quando se considera o limite máximo recomendado de resíduo do pesticida em arroz, que é de 0,2 mg.Kg⁻¹, de acordo com a legislação brasileira (MAPA, 2006). Assim, o método analítico proposto atende aos propósitos a que se destina.

Dependendo da complexidade da matriz, a sensibilidade do método tende a variar consideravelmente. Em amostras de água, por exemplo, sensibilidades na faixa de 0,02 mg.mL⁻¹ a 0,05 mg.mL⁻¹ para o composto paration metílico foi obtida por Silva, Cardeal e Carvalho (1999), utilizando SPME-GC-MS. Limites de detecção em tais níveis de traços foram adequados ao controle ambiental dos resíduos do composto. Em alguns casos, pode-se melhorar consideravelmente a sensibilidade do método usando-se maiores quantidades de amostra e/ou aumentando-se o tempo de extração. No presente estudo, o aumento do tamanho da amostra resultou em um aumento da sensibilidade do método, mas deve-se ter o cuidado de não saturar a fibra com a amostra sólida, o que resultaria numa grande dificuldade no processo de dessorção do pesticida na fibra.

A Figura 1.7 apresenta exemplos de cromatogramas obtidos com amostras reais fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de 0,1; 0,2 e 1,0 mg.Kg⁻¹.

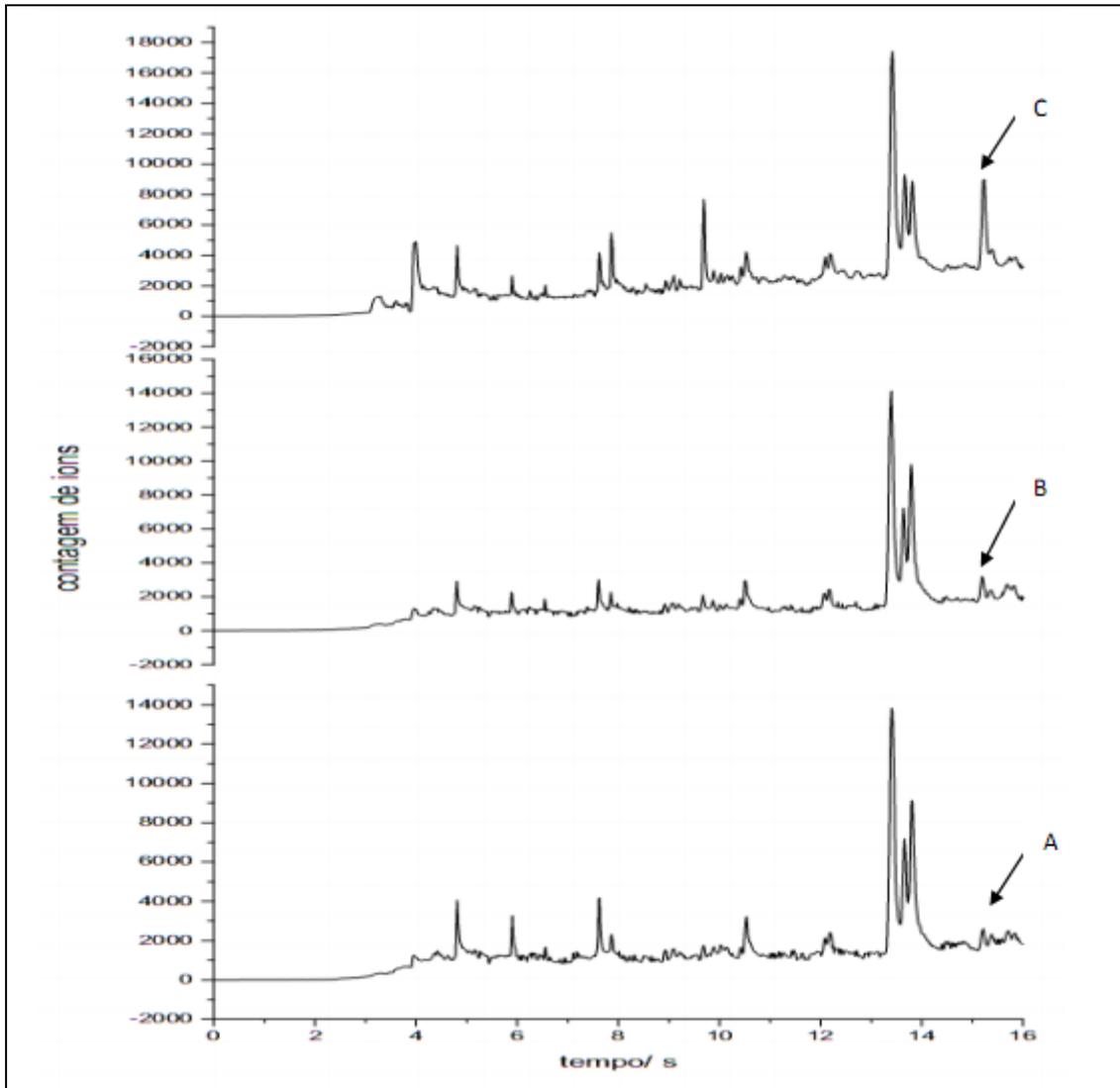


Figura 1.7: Cromatogramas obtidos de amostras de arroz polido fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A), $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (C). Condições operacionais conforme Figura 1.5.

De acordo com a Figura 1.7, o pesticida pôde ser identificado distintamente sem interferência de co-extrativos; estes foram eluídos antes do tempo de retenção do pesticida. Observou-se que, durante a corrida cromatográfica, apareceram vários picos de compostos co-extraídos, não apontando qualquer outra estrutura semelhante ao organofosforado em estudo. Dentre os compostos co-extrativos, podemos citar o silano (derivado do silício, provavelmente obtido da fibra de PDMS utilizada) $t_r = 4,21 \text{ min}$; o 1,4-naftalenodiono ($t_r = 7,83 \text{ min}$); o metil 2-formilamido- 4,5-metileno dioxibenzoato ($t_r = 7,95 \text{ min}$) e o 1,1-bifenil ($t_r = 9,72 \text{ min}$). Estes

últimos compostos foram confirmados pela biblioteca do sistema cromatográfico e são provavelmente compostos voláteis presente na amostra de arroz.

1.5.2 Exatidão do Método: Resultados das Recuperações

Os resultados das recuperações (Tabela 1.2) em três níveis de concentração foram menores para concentrações mais elevadas do pesticida. Uma possível explicação para tal fenômeno talvez resida no processo de limpeza e dessorção da fibra adsorvente, entre uma análise e outra, que provavelmente não ocorreu por completo. Outra justificativa estaria no fato de que, em amostras em que o analito está mais diluído, sua interação com a matriz é menor, o que facilita a absorção/adsorção pela fibra. Logo, em concentrações mais altas possivelmente ocorre maior interação do analito com a amostra, dificultando o processo de dessorção da fibra.

Tabela 1.2. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz polido

Níveis de fortificação (mg.Kg ⁻¹)	Recuperação média* (%)	Coefficiente de variação (%)
0,1	90,0	22,4
0,2	79,0	8,3
1	73,2	6,1

*n = 7

De acordo com Tabela 1.2 pode-se considerar aceitável o coeficiente de variação de 22,4 % em relação ao nível de fortificação em uma concentração em nível de traço (0,1 mg.Kg⁻¹).

Resumidamente, de acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método aplicado para análise do inseticida paration metílico em amostras de arroz por HS-SPME-GC/MS foi adequado, tendo em vista a dificuldade de se trabalhar com a microextração em fase sólida, principalmente em matrizes complexas. O arroz integral analisado forneceu resultados de recuperações mais baixos, em comparação às demais amostras de arroz (polido e com casca), que não geraram problemas na etapa de extração. O método otimizado

apresentou-se rápido e prático, apresentando resultados satisfatórios quanto à linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão. De acordo com sensibilidade, o método pode ser considerado adequado, pois o limite de detecção apresentou-se baixo ($0,026 \text{ mg.Kg}^{-1}$), em relação ao limite máximo recomendado que é $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para arroz.

O método mostrou-se adequado para análise direta do inseticida em arroz polido e com casca com resultados satisfatórios quanto à linearidade (coeficiente de correlação: 0,9985), sensibilidade (LD e LQ: $0,026$ e $0,078 \text{ } \mu\text{g/Kg}$) respectivamente, precisão (coeficientes de variação entre 6,1 e 22,4%) e exatidão (recuperações variando de 73,2 a 90%) para amostras de arroz polido e (coeficientes de variação entre 8,8 e 32,5%) e exatidão (recuperações variando de 88,7 a 89,5%) para amostras de arroz com casca. Deste modo, a metodologia atende aos requisitos mínimos para controle de resíduos do inseticida em amostras de arroz destinadas ao consumo humano.

Chai e Tan (2009), analisando resíduos de pesticidas organofosforados e organoclorados em frutas e vegetais, obtiveram recuperações na faixa de 71 a 97 % e na faixa de 76 a 98 % para amostras de frutas e de hortaliças, respectivamente. Os autores usaram a mesma fibra empregada neste trabalho. Costa e colaboradores (2008), utilizando fibra de poliacrilato (PA 85 μm), obtiveram melhores resultados, quando comparados aos encontrados com fibras PDMS (75 μm) e CW/DVB (65 μm). Foram encontradas recuperações nas faixas de 75,4 a 116,9 %; de 76,1 a 106,7 % e de 96,2 a 103,9 %, para os herbicidas alacloro, atrazina e propanil, respectivamente, durante a análise de arroz.

Djavanshir e Ebrahimi (2008) produziram uma fibra, mediante copolimerização da mistura ácido metacrílico-dimetacrilato de etilenoglicol, impressa com atrazina especialmente para análises de herbicidas triazinas em amostras de água, arroz e cebola, tendo sido atingidos limites de detecção na ordem de partes por trilhão. Infelizmente, este sistema não pode ser utilizado para análises de inseticidas organofosforados, devido às diferenças de polaridades destes compostos.

Capobiango e Cardeal (2005) também empregaram a fibra de polidimetilsiloxano para a análise por SPME-GC/MS de sete pesticidas organofosforados em amostras de água, peixe, batata, goiaba e café. Para todas as amostras, os teores encontrados de pesticidas estavam abaixo do limites permitidos, de acordo com a legislação brasileira. Vale mencionar, contudo, que embora este método tenha sido rotineiramente utilizado para análise direta de organofosforados, por apresentar boa sensibilidade, recuperações mais baixas foram encontradas para o inseticida paration metílico nas amostras de alimentos analisadas.

Dos resultados encontrados no presente trabalho, considerados satisfatórios, do ponto de vista de análise de resíduos, pode-se propor um procedimento geral de HS-SPME que pode ser proposto para determinação do inseticida paration metílico em amostras de arroz que inclua o uso de fibra de PDMS, adição de 10 a 15% de sal para amostra que contem água, aquecimento da amostra de 70 a 75 °C, com um tempo de extração de 45 a 60 min.

No presente trabalho, testes feitos com amostras de arroz com casca apresentaram recuperações próximas às obtidas com amostras de arroz polido. A Figura 1.8 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de arroz com casca nos três níveis de fortificação estudados.

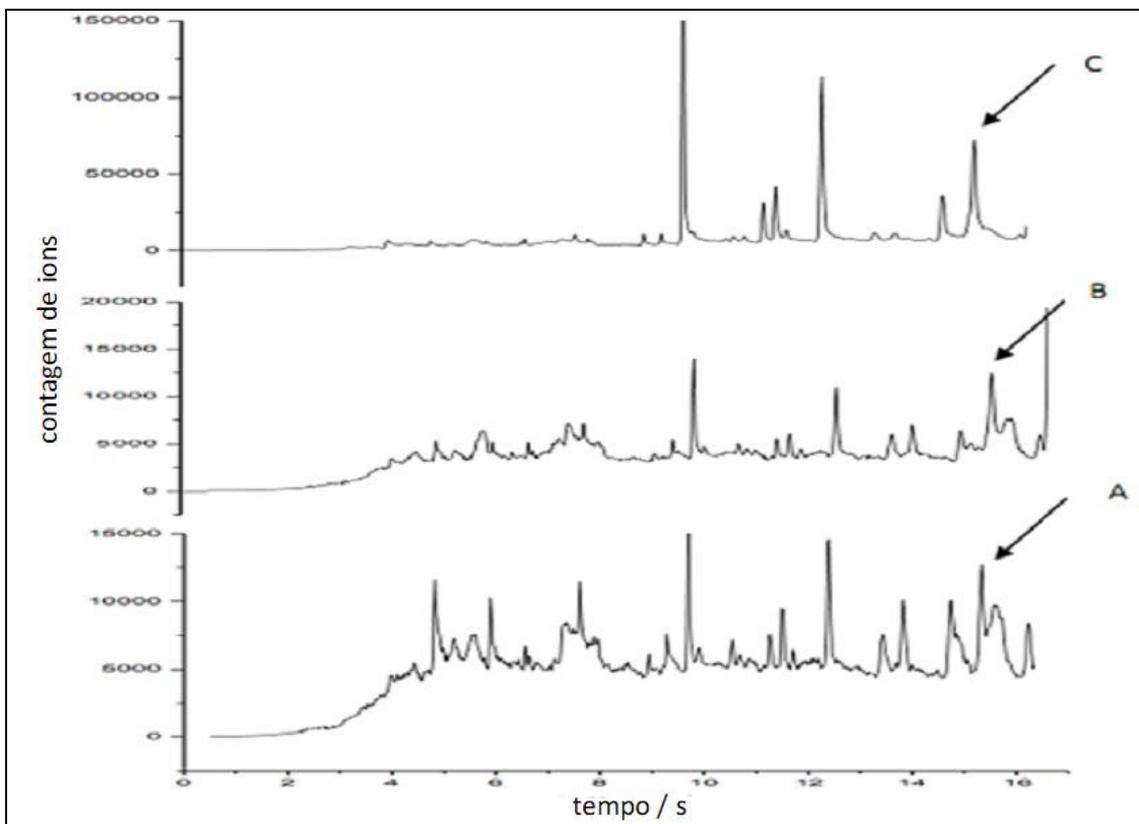


Figura 1.8: Cromatogramas obtidos de amostras de arroz com casca fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A), $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (C). Condições operacionais conforme Figura 1.5.

Foi observado, nos testes com amostras de arroz com casca que o método usado foi capaz de extrair o analito sem grandes interferências, ou seja, a casca do arroz não adsorveu grande quantidade do pesticida e o processo de dessorção foi quase completo.

Lambropoulou *et al* (2003), usando fibra de polidimetilsiloxano 100 μm na análise de resíduos de inseticidas organofosforados em morangos e cerejas, obtiveram recuperações na faixa de 74 a 91% para todos os inseticidas estudados, empregando também a técnica de HS-SPME. Entretanto, convém mencionar que no preparo do recipiente; o autor usou pequena quantidade de solvente orgânico juntamente com água para aumentar a capacidade de extração neste tipo de matriz.

A Tabela 1.3 mostra as recuperações obtidas nos três níveis de fortificação estudados, para amostras de arroz casca.

Tabela 1.3. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz com casca

Níveis de fortificação (mg.Kg ⁻¹)	Recuperação média* (%)	Coefficiente de variação (%)
0,1	89,5	32,5
0,2	88,9	7,7
1	88,7	8,8

*n = 7

Testes feitos com amostras de arroz com casca apresentaram valores de recuperações bem próximos, quando comparados aos mesmos níveis de recuperações obtidos com amostras de arroz polido, cujas recuperações médias variam de 88,7 a 89,5%. A Figura 1.9 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de arroz integral nos três níveis de fortificação estudados.

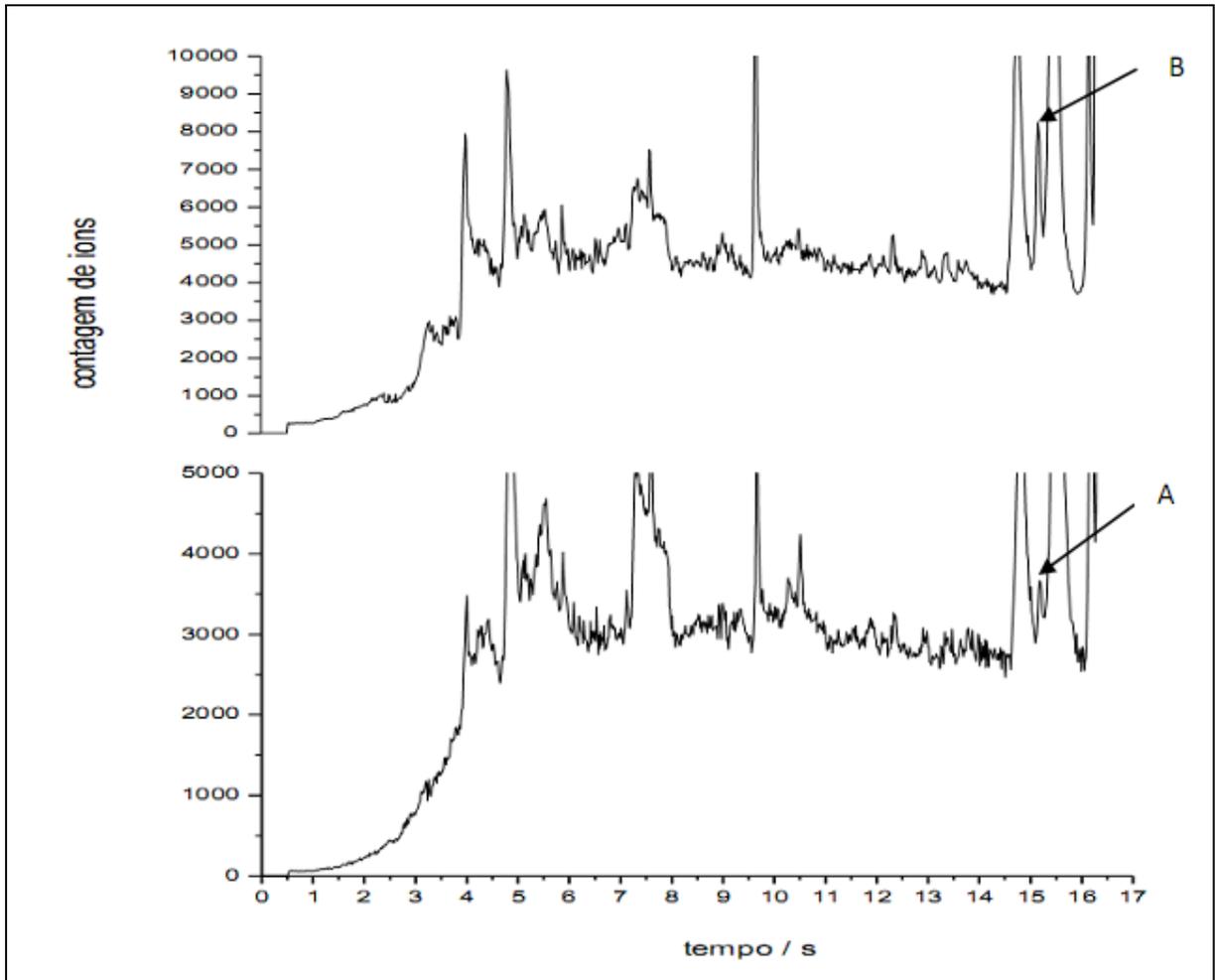


Figura 1.9: Cromatogramas obtidos de amostras de arroz integral fortificadas com o inseticida paration metílico em níveis de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A) e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B). Condições operacionais conforme Figura 1.5.

Nos testes com amostras de arroz integral, ficou evidente que a composição da matriz afetou o processo de extração pela fibra, ou seja, que matrizes com teor de gordura elevado dificultaram o processo de extração. A Tabela 1.4 mostra os resultados de recuperações obtidos na análise das amostras de arroz integral.

Tabela 1.4. Recuperações médias para o método de extração e análise do pesticida paration metílico por HS-SPME-GC/MS em amostras de arroz integral

Níveis de fortificação (mg.Kg ⁻¹)	Recuperação média* (%)	Coefficiente de variação (%)
0,1	N.D	N.D
0,2	60,6	24,6
1	59,5	19,7

*n = 7. N. D= não detectado.

O arroz integral consiste em grãos intactos, privados apenas de sua casca, preservando a película e o gérmen, onde se encontra a maior parte dos nutrientes deste alimento. Assim, matrizes gordurosas como a soja, o milho e o próprio arroz integral podem resultar em uma dificuldade no processo analítico. Os testes feitos com amostras de arroz integral fortificadas apresentaram recuperações mais baixas que as obtidas para arroz polido e com casca, devido sua elevada complexidade da matriz. Com isso, ajustes nos parâmetros de extração e preparo do recipiente (*vial*) poderiam favorecer os ensaios e promover um melhor processo de extração pela fibra, pois de acordo com o método usado não foi possível uma extração eficaz neste tipo de matriz.

Menezes, Santos e Pereira (2010), analisando resíduos de pesticidas em mangas por SPME-GC/MS, obtiveram recuperações na faixa de 71,6 a 117,5% para a mais baixa concentração (33,3 µg.Kg⁻¹) e de 52,2 a 86% para a maior concentração (333,3 µg.Kg⁻¹). Esses autores também afirmam que em amostras mais diluídas a interação do pesticida com os constituintes da matriz é atenuada, aumentando sua disponibilidade para a fase sólida da fibra. A saturação da fibra pode ocorrer quando as amostras estão mais concentradas. O aumento na força iônica reduz a interação entre o analito e a matriz, facilitando deste modo sua extração pela fibra.

Convêm mencionar que os resultados das recuperações obtidos por esses autores tiveram a mesma tendência dos obtidos para as amostras de arroz integral analisadas no presente trabalho, ou seja, recuperações altas para concentrações baixas e recuperações baixas para níveis altos de concentração.

Fytianos *et al* (2006), analisando organofosforados em frutas por HS-SPME-GC/NPD, obtiveram recuperações na faixa de 0,3% (paration metílico) a 3,1 % (diazinon), sendo que no estudo os principais resíduos encontrados foram Diazinon e o Paration. No estudo, foi avaliado também o processo de lavagem e de corte das cascas das frutas. Assim os autores

observaram que aproximadamente 18% da quantidade de pesticida podem ser removidos com lavagem e que descascar as frutas pode remover mais que 85% da quantidade do pesticida nas frutas *in natura*.

1.6 CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica de microextração em fase sólida já é bastante utilizada para análise de diversos tipos de matrizes, tais como frutas, vegetais, grãos e dos compostos voláteis presentes nessas matrizes. A microextração em fase sólida do *headspace* é a mais empregada nestes tipos de testes, já que a microextração em fase sólida no modo direto tem seu uso restrito a matrizes menos complexas, submetidas a processo prévio de purificação.

Uma das grandes vantagens da técnica por microextração em fase sólida para determinação de pesticidas em alimentos, além da rapidez, é a não-utilização de grandes volumes de solvente, o que a torna uma técnica analítica viável e ecologicamente limpa. A metodologia desenvolvida neste trabalho, utilizando a técnica de SPME, tornou o trabalho mais simples e prático, oferecendo um ganho de tempo na etapa de preparo da amostra, com vantagem adicional da não-utilização de solventes orgânicos.

A principal vantagem de se trabalhar com um procedimento automatizado é a redução dos custos na análise, além de se obter um ganho de tempo na etapa de extração das amostras, já que este procedimento é feito no próprio recipiente de análise.

Neste trabalho, um método por SPME-GC/MS foi adaptado para análise do pesticida paration metílico em amostras de arroz (em casca, integral e polido). O método apresentou-se sensível, com limites de detecção próximo a $0,03 \text{ mg.Kg}^{-1}$, e reprodutível com coeficientes de variação entre 6,1 e 32,5%, sendo que a maior variabilidade foi observada em níveis menores de fortificação. Em relação à eficiência, o método apresentou boa exatidão, com recuperações variando de 73,2 a 90% para amostras de arrozes em casca e polido, e de 59,5 a 60,6%, para amostras de arroz integral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxico e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-30, 2007.

Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2145-2148, 1990.

ALAVANJA, M. C.; HOPPIN, J. A.; KAMEL, F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annual Review of Public Health**, v. 25, p. 155-97, 2004.

AMORIM, M. A. et al. Intoxicação exógena por carbamato conhecido popularmente como “chumbinho”. In: X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação- Universidade Vale do Paraíba. 2005, São José dos Campos. **ANAIS...** São Paulo, out, 2006. Disponível em: <http://www.univap.br/univap/pro_reitorias/cultura_divulgacao/revista/RevistaUnivap24.pdf> acesso em: 19 jul. 2010.

ABRAHAM, M. H.; POOLE, C.F.; POOLE, S. K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n.1-2, p. 79-114, 1999.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Agróxicos no cultivo do arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo- Circular técnica n° 67. **Embrapa**, Goiás, 2004.

BAIRD, C. **Environmental Chemistry**, 2nd edition, Freeman: Houndmills, 2000.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Avaliação do risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-37, 2000.

CAI, L. S. et al. Vinyl crown ether as a novel radical crosslinked sol-gel SPME fiber for determination of organophosphorus pesticides in food samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 89-96, 2006.

CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; HERRERO HERNANDEZ, E. Determination of triazines and dealkylated and hydroxylated metabolites in river water using a propazine-imprinted polymer, **Journal of Chromatography A**, v. 108, p. 199-206, 2005.

CAPOBIANGO, H. L.V.; CARDEAL, Z. L. A solid phase microextraction method for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in fish, potatoes, guavas and coffee. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p. 907-914, 2005.

CARERI, M.; BIANDEI, F.; CORRADINI, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food- related analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 3-64, 2002.

CHAI, M.K.; TAN, G.H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 117, p. 561-567, 2009.

CHANG, S.M.; DOONG, R.A. Concentration and fate of persistent organochlorine pesticides in estuarine sediments using headspace solid-phase microextraction. **Chemosphere**, v. 384, p. 810-6, 2006.

CHUSAKSRI, S.; SUTTHIVAIYAKIT, S.; SUTTHIVAIYAKIT, P. Confirmatory determination of organochlorine pesticides in surface waters using LC/APCI/ tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1236-45, 2006.

CORTÉS-AGUADO, S. et al. Fast screening of pesticides residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1314-1325, 2008.

COSTA, L. L. F. et al. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, v.31, p. 79-83, 2008.

DJAVANSHIR, D.; EBRAHIMI, B. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p.152-159, 2008.

DJAVANSHIR, D.; MEHRDAD, M.; EBRAHIMI, B. Preparation and binding study of solid-phase microextraction fiber on the basis of ametryn-imprinted polymer. Application to the selective extraction of persistent triazine herbicides in tap water, rice, maize and onion. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2211-2219, 2009.

ECOBICHON D. J.; JOY R. M. **Pesticides and neurological diseases**. In: Cassarett, L. J.; Doll, J. Toxicology the basic science of poisons. Boca Raton: CRC Press; p.565-622, 1991.

EICEMAN, G. A. et al. Gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, p.2771-2780, 2002.

EMBRAPA- Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: 22 Ago. 2002.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; AMAN, C. S.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIÁ, M. Microwave- assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p.73-78, 2004.

EXTOXNET. Pesticide Management Program, Cornell University, US, 1994.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v.7, n. 2, p. 112-114, 2004.

FYTIANOS, K. et al. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits. **Chemosphere**, v. 65, p. 2090-2095, 2006.

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetables matrices: A review. **Talanta**, v. 77, p. 109-128, 2008.

GRINBERG, P. et al. Solid phase microextraction capillary gás chromatography combined with furnace atomization plasma emission spectrometry for speciation of mercury in fish tissues. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 58, p. 427-441, 2003.

Howard, P. H., **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Pesticides**, v. 3, Chelsea, MI: Lewis Publishers, 1989.

KÖRBES, D. et al. Alteração no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 15, n.1, p. 146-152, 2010.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v.15, p.161-166, 1992.

LAMBROPOULOU, D. A. et al. Single drop microextraction for the analysis of organophosphorus insecticides in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 516, p. 205-211, 2004.

LAMBROPOULOU, D. A.; PSILLAKIS, E.; ALBANIS, T. A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gás chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticides residues in strawberries and cherries. **Journal of Chromatography A**, v. 993, p. 197-203, 2003.

LAMBROPOULOU, D. A., KONSTANTINOY, I. K., ALBANIS, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques, for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 70. 2007.

LEMOS, R.; ABDELGHANI, A. Chlorpyrifos: an unwelcome pesticide in our homes. Review. **Environmental Health**, v. 15, n. 4, p. 421-33, 2000.

LIMA, F. J. C. **Método rápido para análise do inseticida metamidofós em soja e determinação final por cromatografia gasosa**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Maranhão, São Luís – Ma, 2002.65p.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n.153, 2000.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Sistema de Agrotóxicos e Fitossanitários - AGROFIT*, versão 03, 2006, Brasília, DF.

MATUO, Y.K.; LOPES, J.N.C.; MATUO, T. **Contaminação do leite humano por organoclorados DDT, BHT e Ciclodienos**. Jaboticabal: Editora da FUNEP, 1990.

MENEZES FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticides residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, 2010.

MENEZES FILHO, A. M.; SANTOS, F.N.; PEREIRA, P.A.P. Development, validation and application of method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. **Microchemical Journal**, v.96, p. 139-145, 2010.

MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 267, 2000.

NETO, F.; NUNES, D. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Interciência: Rio de Janeiro, 2003.

NGUYENA, T. D. et al. A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.619, p.67-74, 2008.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, n.4, p. 646-654, 2005.

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**, 1st Ed., Wiley-VCH: New York, 1997.

PAWLISZYN, J. **Applications of Solid Phase Microextraction**, Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.

PICÓ, Y. et al. Current trends in solid phase based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environmental. **Journal of Biochemical and Biophysical. Methods**, v.70, p. 117-131, 2007.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na Microrregião de Dourado, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21 n. 3, p. 804-14, 2005.

SANCHES, S. M. et al. Pesticida e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, jan./dez.2003.

SANTISTEBAN, A. M. G. **Caracterização do ácido húmico extraído de vermicomposto e estudo de adsorção/ dessorção deste e outras matrizes com o herbicida atrazina**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999. p. 13.

SAMPEDRO, M. C. et al. Solid phase microextraction for the determination of systemic and non-volatile pesticides in the river water using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron-capture detection. **Journal of Chromatography**, v.893, p.347-358, 2000.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L.; CARVALHO, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM. **Química Nova**, v. 22, p.197-200, 1999.

SILVA, G. A.; **Utilização de métodos quimiométricos em cromatografia gasosa com microextração em fase sólida.** Tese (Doutorado em Química Analítica)- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007, 160 p.

SILVA, C. L. **Análise da vulnerabilidade ambiental aos principais pesticidas recomendados para os sistemas de produção de algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, citros, milho e soja.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004. 135 p.

Tadeu, J. L. et al. Analysis of herbicides residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175, 2000.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G. J. **Journal of Chromatography B**, v.745, p. 49, 2000.

TOMLIN, C., The Pesticide Manual, tenth edition, BCPC/ **Royal Society of Chemistry**, p. 771, 1994.

TSOUTSI, C.; HELA, K. I.; ALBANIS, T. A. **Analytica Chimica Acta**, v. 216, p. 573-574, 2006.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v.23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VIÑAS, P. et al. Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 140-146, 2009.

YAO, Z. et al. Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorous pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame photometric detector. **Talanta**, v. 55, n. 55, p. 807-814, 2001.

Zhang, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 847A, 1994.

ZHU, F. et al. Application of solid-phase microextraction for determination of organophosphorus pesticides in textiles by gas chromatography with mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, p. 202-206, 2009.

Parte 2:

DETECÇÃO DO INSETICIDA PARATION METILICO
EM EXTRATOS DE ARROZ *IN NATURA* EMPREGANDO
BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

PARTE 2

DETECÇÃO DO INSETICIDA PARATION METILICO EM EXTRATOS DE ARROZ IN NATURA EMPREGANDO BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

2. 1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são amplamente usados ao redor do mundo, são altamente tóxicos e permanecem no ambiente, causando sérios problemas, devido ao longo tempo de exposição. Entre os pesticidas, os organofosforados e os carbamatos representam uma importante classe de compostos tóxicos. Sua toxicidade é baseada na inibição da enzima acetilcolinesterase. Apesar do fato de tais compostos não serem persistentes no ambiente quando comparados aos inseticidas organoclorados, seu intenso uso tem levado a contaminação de águas e alimentos (Rawn *et al*, 2004; Blasco *et al*, 2003).

Os métodos de referência para detecção de pesticidas têm sido baseados em separação por cromatografia. Essas técnicas têm notáveis limites de detecção e seletividade, mas são caras e tomam muito tempo. Além disso, não são técnicas adaptadas à detecção de poluentes *in situ* (Campàs *et al*, 2005).

Nas últimas décadas, biossensores baseados na enzima acetilcolinesterase (AChE) têm emergido como uma técnica promissora para investigações de toxicidade, monitoramento ambiental, controle de qualidade de alimentos e investigações militares. A principal aplicação de biossensores baseados nas AChE's tem sido para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos por inibição enzimática (Sinha *et al*, 2010).

Os biossensores representam, portanto, uma alternativa viável a ser utilizada durante estudos envolvendo monitoramento ambiental, porque sua execução inclui relativamente uma alta sensibilidade e seletividade, rápida resposta, baixo custo, além de um fácil manuseio (Dondoi *et al*, 2006).

Com a finalidade de sintetizar enzimas artificiais, para fins de construção de biossensores eletroquímicos, muitas configurações têm sido propostas. Pesquisadores têm utilizado desde a modificação de coenzimas ou cofatores naturais das enzimas, até a síntese de compostos que se apresentam como modelos enzimáticos (Sotomayor e Kubota, 2002).

No primeiro caso, realiza-se a modificação de cofatores ou coenzimas, que normalmente são solúveis em meio aquoso, com a finalidade de torná-los hidrofóbicos e criar um ambiente mais adequado para a interação com o substrato. Entre esses cofatores, pode-se mencionar as vitaminas B₁, B₆ e B₁₂, o anel hemina (enzima inibidora derivada da hemoglobina), o NADH (coenzima que apresenta dois estados de oxidação) e as flavinas (Kajiki *et al*, 1999).

No segundo caso, as enzimas são simuladas, fazendo-se uso da química supramolecular, com a qual catalisadores baseados neste tipo de estruturas podem executar os mesmos processos realizados pelas enzimas, sem seguir estritamente o caminho pelo qual as enzimas realmente o fazem. Sendo assim, esta química pode desenvolver compostos que efetuem processos altamente eficientes e seletivos em condições nas quais as enzimas desnaturam. Dentre esses compostos usados na síntese de enzimas têm-se os ciclofanos, as ciclodextrinas, as micelas e as bicamadas moleculares (Jairam, Potvin e Balsky, 1999).

Uma análise baseada na inibição de um biossensor enzimático consiste na quantificação da diminuição da resposta do biossensor, depois da incubação direta na amostra ou no extrato da amostra. A diminuição do sinal é correlacionada com a concentração do inibidor (Dondo *et al*, 2006).

Biossensores à base de enzimas acetilcolinesterase (AChE) são baseados na inibição enzimática por um pesticida ou outro inibidor qualquer. Quando a enzima AChE é imobilizada na superfície do eletrodo, há interação com o substrato, produzindo uma espécie eletroativa. Nessa estratégia, acetiltiocolina pode substituir o substrato original da AChE, a acetilcolina. Assim, o novo substrato (acetiltiocolina) é hidrolisado da mesma forma como o substrato original, produzindo tiocolina e o ácido carboxílico correspondente (ácido acético, no caso). Os elétrons gerados durante a reação eletroquímica são coletados, e a corrente final é a medida quantitativa da atividade da enzima (Nunes, Jeanty e Marty, 2004). As reações que ocorrem na superfície do biossensor com a enzima acetilcolinesterase são resumidas na Figura 2.1.

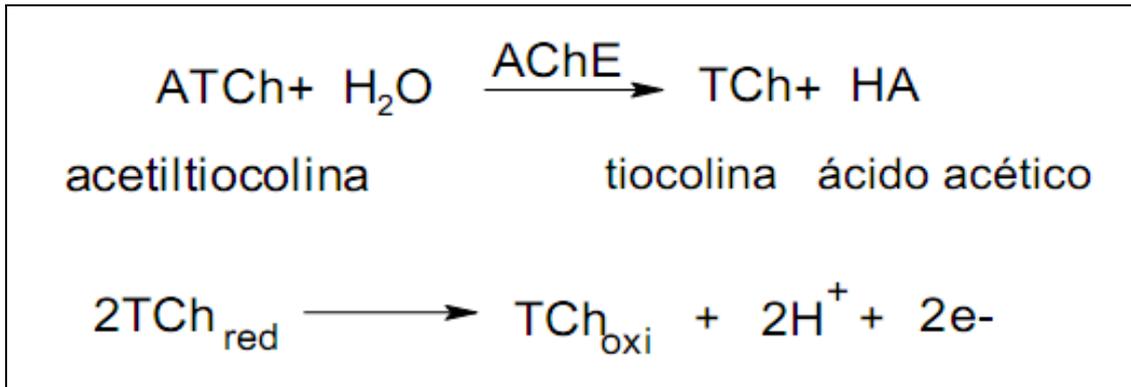


Figura 2.1: Reação da acetiltiocolina (substrato) com a enzima AChE, com a formação da tiocolina.

Tanto os organofosforados como os carbamatos atuam na inibição da enzima acetilcolinesterase, que catalisa a hidrólise da acetiltiocolina, gerando colina e acetato. A acetilcolina por sua vez, é um neurotransmissor natural sintetizado pela célula transmissora ou pré-sináptica. Ela é armazenada em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas (Sousa e Rebelo, 2008).

Nesta parte do trabalho, enzimas acetilcolinesterase comerciais e geneticamente modificadas obtidas da *Drosophila Melanogaster* foram imobilizadas em um eletrodo de pasta de grafite modificada com TCNQ, originando biossensores altamente sensíveis ao inseticida organofosforado paration metílico. Alguns dos biossensores foram, então, utilizados na detecção do pesticida em extratos de arroz dopados, tendo sido avaliada a eficiência do método de detecção, em função da sua reprodutibilidade e exatidão.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1. Geral

Desenvolver uma metodologia para detecção do inseticida paration metílico em extratos de arroz *in natura*, empregando biossensores amperométricos previamente otimizados.

2.2.2. Específicos

- a) otimizar o procedimento de imobilização enzimática, de forma a resultar em menor perda de atividade da enzima acetilcolinesterase;
- b) construir sensores de vidro contendo a enzima AChE e o mediador (TCNQ), a partir do preparo de uma pasta de grafite;
- c) avaliar as respostas eletroquímicas dos biossensores e determinar os potenciais de trabalho;
- d) realizar ensaios de inibição enzimática, a partir de soluções do padrão de paration metílico;
- e) construir curvas de inibição e determinar a sensibilidade de biossensores construídos a partir de enzimas AChE de diferentes fontes (comerciais e geneticamente modificadas);
- f) aplicar os sensores na detecção do paration metílico em extratos de arroz.

2.3 REVISÃO DE LITERATURA

A investigação de pesticidas depara-se com problemas analíticos complexos, ocasionados pela gama de substâncias existentes a serem determinadas em distintos produtos agrícolas, possivelmente presentes em níveis de traços. Métodos baseados em espectrofotometria e cromatografia a líquido ou a gás têm sido validados, apresentando-se muito sensíveis e sendo cada vez mais usados neste tipo de análise (Li *et al*, 2004).

Os biossensores surgiram como métodos analíticos alternativos. São arranjos que apresentam, em geral, elevadas sensibilidades e seletividade, com tempo de resposta bastante curto e mínimo tratamento da amostra (Fatibello e Capelato, 1992; Janata Josowicz e Devaney, 1994). Na área de controle ambiental, principalmente para controle de pesticidas, vários biossensores eletroquímicos a base de enzimas colinesterase (AChE) foram desenvolvidos para a detecção de pesticidas em matrizes ambientais. Esses sistemas baseiam-se no princípio de inibição enzimática para determinação/quantificação desses inibidores (Marques *et al*, 2004). Biossensores do tipo serigrafado (*screen printed*), têm sido estudados como instrumentos para investigação confirmatória/alarme, buscando economia de tempo e de investimentos. São empregados para detectar amostras potencialmente positivas em análise previa de controle do ambiente (Zhang e Yang, 2000).

Inibição de enzimas colinesterase podem ser detectadas em amostras de alimentos e ambiente por uma variedade de métodos cromatográficos padronizados, tais como por HPLC (do inglês, High Performance Liquid Chromatograph), GC/MS, ou ensaios

espectrofotométricos que são baseados em inibição das colinesterases (Lacorte e Barcelo, 1996).

Os multissensores à base de enzimas acetilcolinesterase representam um novo princípio em detecção de vários analitos. Um aumento na eficiência do biossensor pode ser possível por recombinação com enzimas AChE mutantes com propriedades relevantes. Em particular, específica e alta constante de inibição para análise dos analitos são usados para melhorar a capacidade do sensor em termos de tempo gasto nos ensaios, aumento da sensibilidade e faixa de concentração dos analitos. Estudos recentes com AChE mutantes são empregadas para determinar as propriedades das enzimas e os mecanismos hidrolíticos (Vellom *et al*, 1993; Ashani *et al*, 1995; Faerman *et al*, 1996; Masson *et al*, 1996).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de eletroanalítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ/UNESP) sob supervisão das professoras doutoras Hideko Yamanaka e Maria Del Pillar Sotomayor.

2.4.1 Reagentes

Acetilcolinesterases (AChE's extraídas de enguia elétrica e do eritrócito bovino), cloreto de acetiltiocolina (ATChCl), glutaraldeído 25% (v/v), proteína soro albumina bovina (BSA 10% (v/v), 5,5- ditiobis (2-acido nitrobenzóico) (DTNB), solução tampão fosfato pH 7,5 e pó de grafite foram todos obtidos da Sigma Aldrich (Amystang, Alemanha). Óleo mineral (nujol) foi obtido no comércio local. O padrão do pesticida paration metílico foi obtido também da Sigma-Aldrich.

Enzimas geneticamente modificadas, obtidas da *Drosophila Melanogaster* (Dros), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jean-Louis Marty, do Laboratório BIOMEM, da Universidade de Perpignan, França, tendo sido obtidas do Laboratório de Química Orgânica, liderado pelo Dr. Didier Founier, da Universidade de Toulouse, na França.

2.4.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram feitas em um potenciostato/galvanostato (MicroAutolab tipo III da Metrohm). As medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro da Hewlett Packard, modelo HP 8433.

2.4.3 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da enzima foi medida espectrometricamente antes de cada imobilização. Resumidamente, foi tomado um volume de 50 μL da enzima a ser analisado, e misturado a 200 μL de 5,5- ditiobis (2-acido nitrobenzoico) (DTNB) $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 350 μL de solução tampão fosfato (PB) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e, por último, 200 μL de solução do substrato cloreto de acetiltiocolina (ATChCl) 2mM, em uma célula espectrofotométrica. Soluções estoques das enzimas foram preparadas diretamente nos frascos com NaCl 0,9%; soluções de trabalho foram preparadas por dissolução destas em tampão fosfato salino (PBS) e pequenas alíquotas foram guardadas em freezer a -18°C . A medida da atividade enzimática foi relacionada à formação do composto 5-tionitrobenzoato que absorve à 412 nm, de acordo com o esquema da Figura 2.2 (Método Elman citado por Bachmann *et al*, 2000). Medidas espectrofotométricas do branco foram feitas sem a presença de enzima em 412 nm.

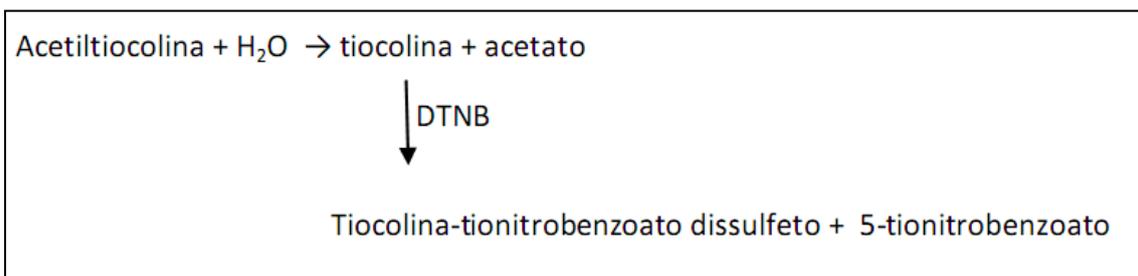


Figura 2.2: Reação da acetiltiocolina até a formação do composto 5-tionitrobenzoato (Método de Elman).

2.4.4 Imobilização Enzimática

A otimização de qualquer sistema com biossensor amperométrico tem sido focado principalmente em dois aspectos: o primeiro para aperfeiçoar a habilidade e aumentar a transferência de elétrons através da modificação do eletrodo de trabalho, proporcionando um potencial baixo; o segundo, testando diversas formas de imobilização enzimática, de modo a não perder a atividade enzimática e obter sensores de elevada sensibilidade.

Uma variedade de métodos de modificação têm sido empregados, tais como aqueles que empregam a ftalocianina de cobalto e o tetracianoquinodimetano (TCNQ), dentre outros mediadores. Variações nas técnicas de imobilização enzimática têm como objetivo prover maior eficiência do sensor e melhorar a sua resposta (Sun e Wang, 2010).

O processo de imobilização é a etapa fundamental no estudo de qualquer biossensor. Neste trabalho, foi testado o método de imobilização com glutaraldeído em sensor com pasta de carbono. A pasta da enzima para imobilização continha tampão fosfato (pH= 7,5), enzima (carga enzimática previamente medida), glutaraldeído na proporção de 25% (v/v) e soro albumina bovina (BSA) à 10% (v/v). Após homogeneização em Vortex, um volume de 5 μL da mistura foi usado no preparo do biossensor.

2.4.5 Preparo do Biossensor

A pasta de carbono modificada foi preparada misturando-se 45 mg de pó de grafite com 5 mg do mediador TCNQ (7,7,8,8-tetracianoquinodimetano), 1 mL de tampão fosfato (pH 7,5) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e 5 μL da enzima com atividade relativa de 10 U/mL, totalizando 20 mU de enzima em cada sensor. Depois de seca a pasta em temperatura ambiente por aproximadamente 24 h, um volume de 100 μL de óleo mineral foi adicionado, a fim de dar consistência a esta. A pasta foi então colocada dentro de uma cavidade na extremidade de um eletrodo de vidro (área geométrica $0,071 \text{ cm}^2$) e o sensor foi então polido em papel sulfite. Em seguida, o biossensor foi imerso em solução tampão fosfato pH 7,5 por aproximadamente 20 min, antes do uso.

2.4.6 Preparo das Amostras de Arroz

Inicialmente, certa quantidade de arroz foi triturada e homogeneizada. Em seguida pesou-se com precisão 1g da amostra e fortificou-se com concentrações do inseticida paration metílico em três níveis (1×10^{-2} , 1×10^{-3} e 5×10^{-4} mg.Kg⁻¹) de acordo com a curva analítica obtida nos testes de calibração, mantendo o pesticida em contato com a amostra por 30 min. Após esse tempo, foi feita a extração do pesticida da amostra de arroz por agitação constante por cerca de 20 min, utilizando 5 mL de solução tampão pH 7,5. Em seguida, procedeu-se nova agitação em vortex e finalmente a amostra foi centrifugada, onde o sobrenadante foi usado nos testes de inibição enzimática empregando os sensores preparados conforme item 2.4.5.

2.4.7 Medidas Amperométricas e Ensaio de Inibição

Para as medidas amperométricas, o biossensor foi imerso em uma célula contendo 5 mL de tampão PBS pH 7,5 com substrato ATChCl (cloreto de acetilcolina) 2 mmol.L⁻¹. Inicialmente, a medida foi realizada por voltametria de pulso diferencial. O potencial de trabalho obtido por voltametria (ponto máximo) foi fixado para as medidas cronoamperométricas. A célula foi lavada com tampão entre uma medida e outra.

A análise do biossensor e os testes de inibição enzimática com o pesticida paration metílico foram feitos de acordo com o procedimento que se segue: a resposta inicial (corrente inicial, I_0) do biossensor foi medida em solução tampão PBS em presença de cloreto de acetilcolina, após 35 s, onde se verificou a estabilização da corrente. Então, o biossensor foi incubado por 10 min em 5 mL de solução padrão do inseticida, preparado em água destilada ou mesmo em 5mL do extrato (incubação de enzima com o inibidor). Terminado o tempo de incubação, o sensor foi novamente lavado, e nova medida eletroquímica foi feita em solução tampão contendo cloreto de acetilcolina, obtendo-se um novo sinal (I). A inibição relativa (IR) foi determinada pela seguinte fórmula: $IR\% = [(I_0 - I)/I_0] \times 100$ e então relacionada à concentração do inibidor.

Para os ensaios de recuperação, as amostras de arroz foram fortificadas em três níveis de concentração e então submetidas a um procedimento de extração de acordo com o item 2.4.6.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Estudo Eletroquímico para Seleção do Potencial de Trabalho

Na etapa otimização das medidas amperométricas, testes com voltametria de pulso diferencial foram efetuados para se determinar o potencial de trabalho do sistema e realizar as medidas cronoamperométricas. Definido o potencial, foram realizadas corridas cronoamperométricas em potencial fixo de 180 mV vs Ag/AgCl. A Figura 2.3 mostra o voltamograma gerado pelo sistema.

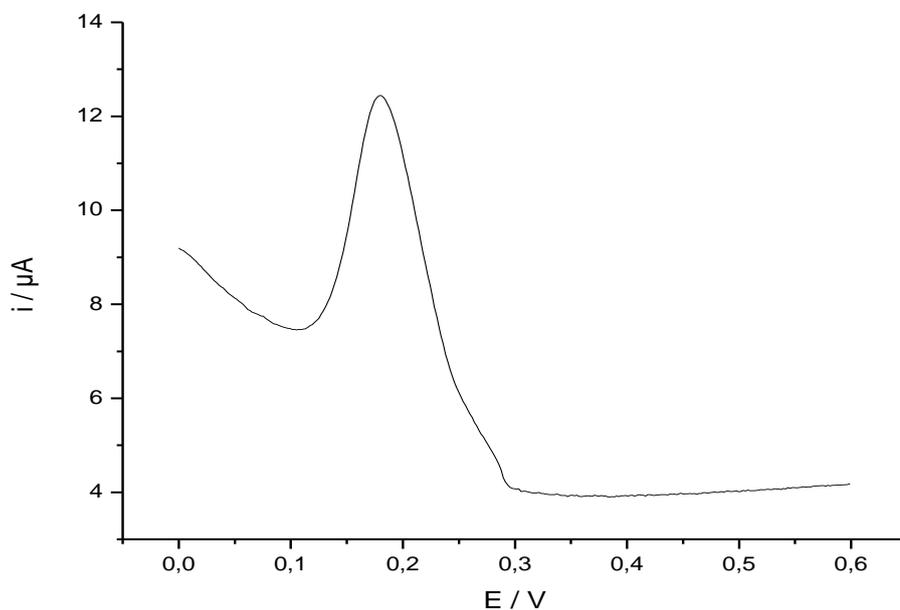


Figura 2.3. Voltamograma gerado nos testes de otimização do sistema empregando biossensores. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3 s; tempo de modulação: 0,05 s; intervalo entre medidas: 0,5 s; potencial inicial= 0; potencial final: 0,6 V; amplitude da modulação: 0,05055 V.

2.5.2 Otimização do Procedimento de Imobilização Enzimática

O processo de imobilização enzimática em sensor de pasta de carbono foi feito com ligação cruzada com glutaraldeído e soro albumina bovina, na proporção de 5% (v/v) e de 2% (v/v), respectivamente.

O principal problema durante o processo de imobilização enzimática pode ser a perda parcial ou total da atividade enzimática, que pode ser atribuída às condições experimentais.

No desenvolvimento do trabalho foi tomado o devido cuidado no manuseio das enzimas e demais reagentes no preparo do sensor.

2.5.3 Otimização dos Ensaio de Inibição

O processo de inibição depende da carga enzimática. De acordo com os testes realizados com diferentes cargas de enzimas, utilizou-se o valor de 20 mU/mL de carga enzimática para os ensaios de inibição.

2.5.4 Construção de Curvas Analíticas e Determinação da Sensibilidade do Método

As curvas analíticas foram construídas com base no processo de inibição enzimática das enzimas acetilcolinesterases. Os ensaios foram realizados pela imersão do biossensor em solução de substrato (ATChCl) em pH 7,5, sendo o sensor lavado com solução tampão entre as medidas. Inicialmente, foi feita a medida por voltametria de pulso diferencial. O potencial de trabalho obtido por voltametria (ponto máximo) foi fixado para as medidas cronoamperométricas.

A análise do biossensor e os testes de inibição enzimática com o pesticida paration metílico seguiram os procedimentos já padronizados (Marques e Yamanaka, 2008). A partir desses ensaios de inibição, curvas de calibração podem ser construídas, já que concentrações crescentes do pesticida ocasionam percentuais de inibição enzimática também crescente. Este princípio pode, portanto, oferecer alternativa de análise qualitativa (a diminuição da corrente já indica a presença do inibidor de AChE) e até mesmo quantitativa, já que se pode extrapolar a inibição relativa (IR%) encontrada com a concentração do inibidor.

A Figura 2.4 mostra a curva analítica do paration metílico, construída a partir dos ensaios de inibição relativa do pesticida, tendo sido testados quatro tipos de enzimas.

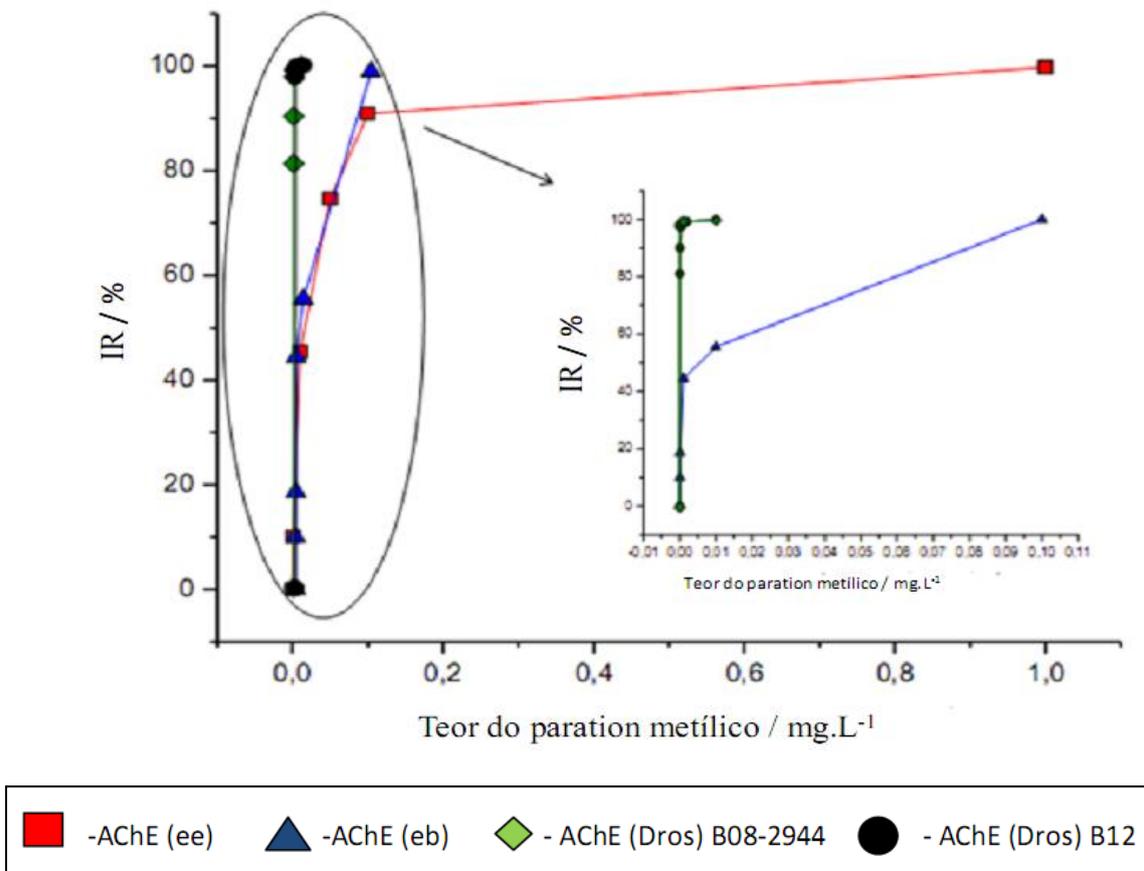


Figura 2.4: Curvas de inibição relativa (IR) para as enzimas AChE ee (enguia elétrica), AChE eb (eritrócito bovino), AChE (Dros) B08-29-44 e B12, usando biossensor de pasta de carbono com 10 U/ml de enzima. Em destaque, a faixa linear para as inibições.

De acordo com as curvas de analíticas obtidas para os quatro tipos de enzimas pôde-se notar que houve uma maior sensibilidade das enzimas geneticamente modificadas: AChE (Dros) B08-29-44 e AChE (Dros) B12, onde foi possível chegar a níveis de inibição de aproximadamente 99% usando uma concentração de 0,01 mg.L⁻¹ do inibidor.

Em trabalhos anteriores, Nunes *et al* (2005) empregaram AChE provenientes da *Drosophila Melanogaster* (Dros), imobilizados em sensores serigrafados, e encontraram resultados similares, isto é, verificaram que, para muitas enzimas geneticamente modificadas, a sensibilidade aumenta em relação a certos pesticidas inibidores, em comparação com a enzima original, e até mesmo em comparação com enzimas comerciais, como por exemplo as obtidas de eritrócito bovino e enguia elétrica. De fato, este é um dos inúmeros benefícios que a Engenharia Genética tem fornecido, que é o de modificar enzimas, diretamente em pontos específicos da sua seqüência de DNA (sítios apresentados no nome da enzima, ex: B-08-29-

44), a fim de melhorar a sua sensibilidade frente a determinados contaminantes, sejam eles ambientais ou de alimentos.

2.5.5 Análise Direta do Inseticida Paration Metílico em Amostras de Extrato de Arroz

Como mostra a Tabela 2.1 o biossensor preparado com pasta de carbono apresentou diferentes limites de detecção, de acordo com as enzimas imobilizadas, indicando diferentes sensibilidades destas frente ao inibidor. O limite de detecção foi determinado como sendo a concentração do pesticida necessária para se obter 10% de inibição enzimática, de acordo com procedimentos previamente estabelecidos (Nunes *et al*, 1999).

Tabela 2.1. Faixa linear, limite de detecção e dados da curva de calibração das enzimas

Enzimas	Faixa de trabalho (mg.L^{-1})	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)*	r^2
AChE (ee)	0,1 a 1	10	0,999
AChE (eb)	0,001 a 0,1	0,05	0,999
AChE (Dros)B08-29-44	0,001 a 0,01	0,001	0,972
AChE (Dros)B-012	0,0005 a 0,01	0,001	0,992

*LD= limite de detecção ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

De acordo com a Tabela 2.1 pode-se notar que houve uma maior sensibilidade das enzimas geneticamente modificadas frente ao inibidor, o que justifica a faixa de concentração usada nos ensaios de inibição e preparo das curvas analíticas destas enzimas.

Sensibilidades idênticas (mesmo LD) ambas as enzimas mutantes podem ser usadas, sendo que a sensibilidade de ambas esta na ordem de partes por trilhão, o que é muito importante para detecções rápidas em amostras reais, incluindo água.

2.5.6 Exatidão do Método

Os ensaios de recuperação foram feitos em triplicata para cada nível de fortificação (1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} mg.Kg^{-1}), escolhidos com base na curva analítica de cada enzima. A

Tabela 2.2 mostra os resultados de eficiência dos biossensores, quando utilizados para determinação das concentrações do inseticida paration metílico em extratos de arroz.

Tabela 2.2. Recuperações obtidas empregando-se os biossensores amperométricos construídos com diferentes enzimas.

Enzima acetilcolinesterase*	Níveis de fortificação	Concentração (mg.Kg ⁻¹)	Recuperação (%)	C.V (%)
AChE (ee)	1	5x10 ⁻⁴	99,8	10,9
	2	1x10 ⁻³	100	4,3
	3	10 ⁻²	112	10,9
AChE (eb)	1	10 ⁻³	100	18,3
	2	10 ⁻²	100	15,7
	3	2x10 ⁻²	103	11,4
AChE Dros (B08)	1	10 ⁻³	104,2	13,7
	2	2x10 ⁻³	102,6	5,7
	3	10 ⁻²	100,3	17,7
AChE Dros (B12)	1	5x10 ⁻⁴	112,0	7,6
	2	1x10 ⁻³	104,1	8,1
	3	10 ⁻²	100,7	13,8

* AChE= enzimas acetilcolinesterase obtidas de enguia elétrica (ee), eritrócito bovino (eb), e enzimas geneticamente modificadas obtidas da *Drosophila Melanogaster* (Dros).

De acordo com os resultados apresentado na Tabela 2.2, pôde-se verificar que o extrato obtido das amostras de arroz fortificadas com o pesticida paration metílico resultou em forte inibição da enzima B08, gerando recuperações variando de 100,3 a 104,2 %. O método de detecção, tanto com as enzimas comerciais quanto mutantes, mostraram elevada eficiência, com recuperações na faixa de 99,8 a 112,0 %, e valor médio de 103,2 %. Esse valor de recuperação denota uma excelente correlação entre a concentração do pesticida na amostra e a inibição provocada na enzima AChE.

Convém mencionar que a inibição baseada em biossensores enzimáticos requer uma boa estabilidade operacional para várias medidas de substrato, para assim quantificar a atividade enzimática e manter a resposta depois da imersão em solução tampão por um específico período de tempo para assegurar que a resposta seja devido à inibição enzimática e não a um vazamento da enzima (Dondoi *et al*, 2006). A corrente produzida é relacionada com a atividade da imobilização enzimática, que pode ser usada como um indicador da quantidade medida dos organofosforados. (Gong, Wang e Zhang, 2009).

A Figura 2.5 mostra os sinais cronoamperométricos obtidos nos ensaios de recuperação usando-se o biossensor preparado com a enzima AChE (Dros) B08 após um

tempo de incubação de 10 min. A estabilização da resposta do sensor, durante a reação enzimática com o substrato, deu-se em um tempo de aproximadamente 30 s.

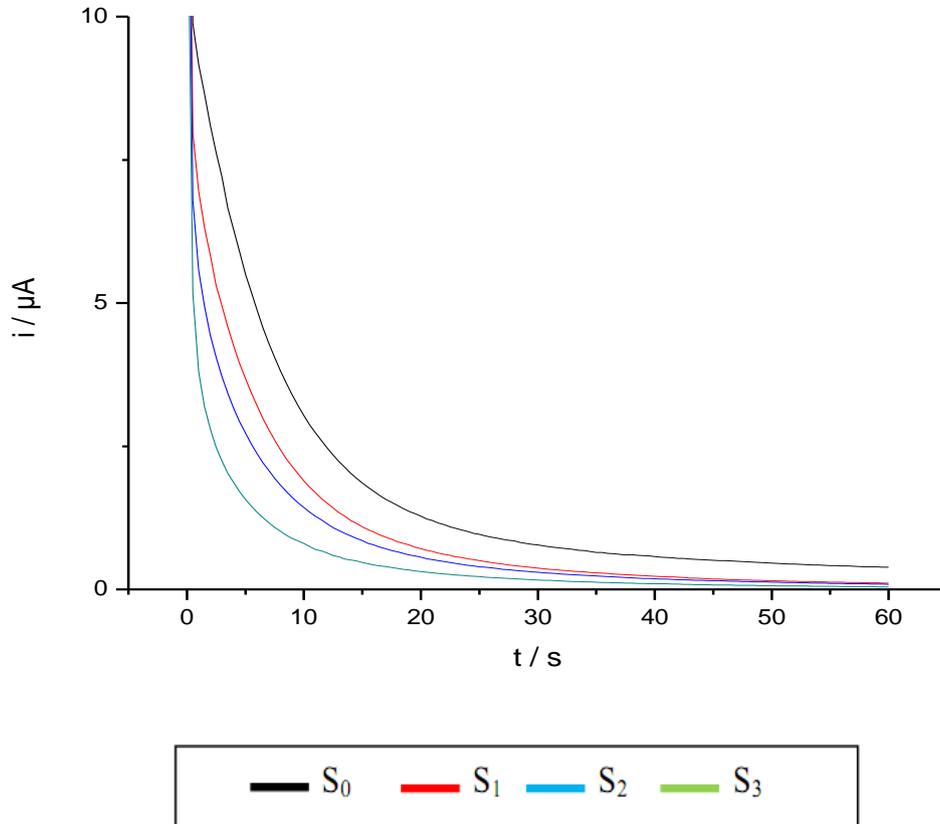


Figura 2.5: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (Dros) B08. S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 minutos com o pesticida em concentrações de 10^{-3} , 2×10^{-3} , 10^{-2} mg.L^{-1} respectivamente. Condições dos ensaios: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh) na célula: 2mM em tampão fosfato pH 7,5.

Os ensaios cronoamperométricos realizados com o extrato obtido da amostra de arroz mostraram que o extrato obtido foi capaz de inibir a enzima, mostrando a sensibilidade observada nos ensaios de inibição na etapa de construção das curvas analíticas.

Entretanto, convém mencionar que certas impurezas obtidas durante o preparo da amostra, no caso, particulados do pó de arroz, podem ter gerado sinais amperométricos mais altos e conseqüentemente recuperações elevadas, já que não houve um processo de filtração na etapa de extração do pesticida.

A corrente gerada diminui consideravelmente com o aumento do tempo de incubação em solução dos pesticidas organofosforados. Quando o tempo de incubação foi maior que 10

min, a curva tendeu a manter um valor estável, isto indica que houve uma interação com grupos ativos alvos na enzima que podem atingir a saturação (Sun e Wang, 2010).

A Figura 2.6 mostra os sinais cronoamperométricos obtidos durante a reação da enzima mutante B12 com o substrato acetilcolina, após inibição durante um tempo de 10 min.

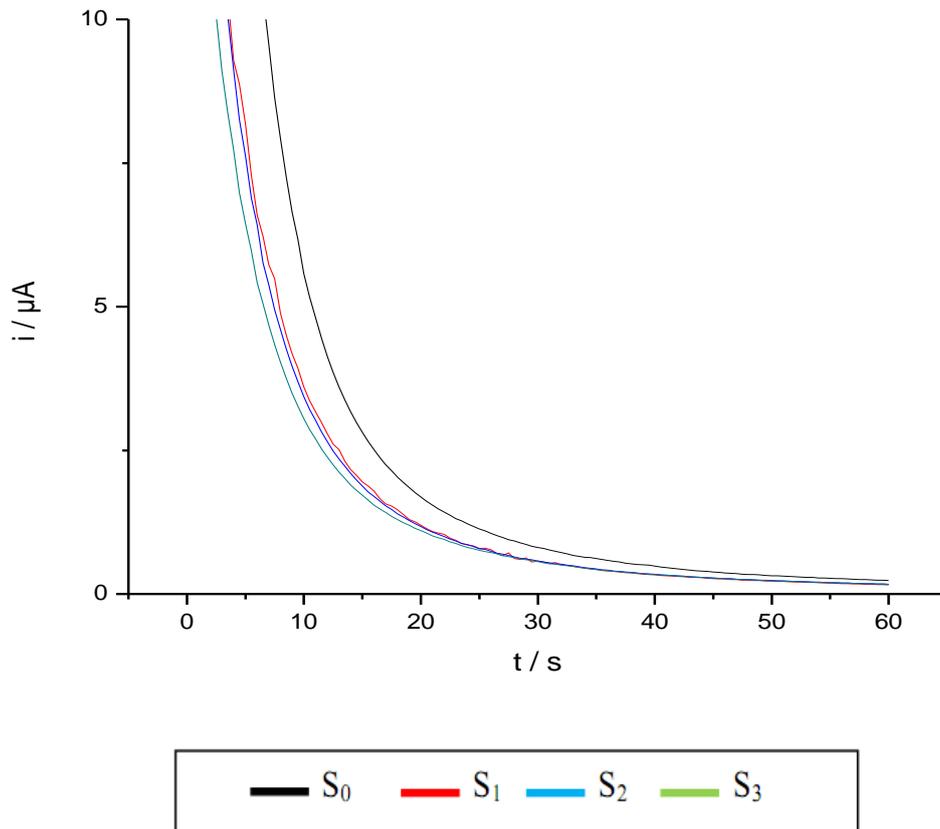


Figura 2.6: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (Dros) B12. S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 minutos com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 10^{-2} mg.L^{-1} respectivamente. Condições dos ensaios: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh) na célula: 2mM em tampão fosfato pH 7,5.

Os ensaios cronoamperométricos foram feitos aplicando-se potencial 180 mV obtido por voltametria de pulso diferencial. Os ensaios de recuperações feitos testando-se a enzima B12 foram satisfatórios, tendo em vista os níveis de recuperação alcançados (100,3 a 104,2 %) e coeficientes de variação satisfatórios para níveis de traços (entre 7,6 e 13,8 %).

O biossensor preparado com pasta de carbono modificada com a enzima AChE (Dros) B012 foi sensível na análise do paration metílico e forneceu boas recuperações, com coeficientes de variação na faixa de 7,64 a 13,79 %.

Nunes *et al* (2005), avaliando resíduos de inseticida carbamatos em alimentos infantis, obtiveram recuperações na faixa de 80 a 88% e 56 a 63%, para carbaril e carbofuran respectivamente, empregando eletrodos do tipo serigrafado. Os autores realizaram uma prévia extração dos compostos da matriz do alimento, empregando extração em fase sólida.

A Figura 2.7 mostra os sinais cronoamperométricos obtidos durante a reação enzimática, e após os ensaios de recuperação, usando-se biossensor preparado com a enzima AChE (ee).

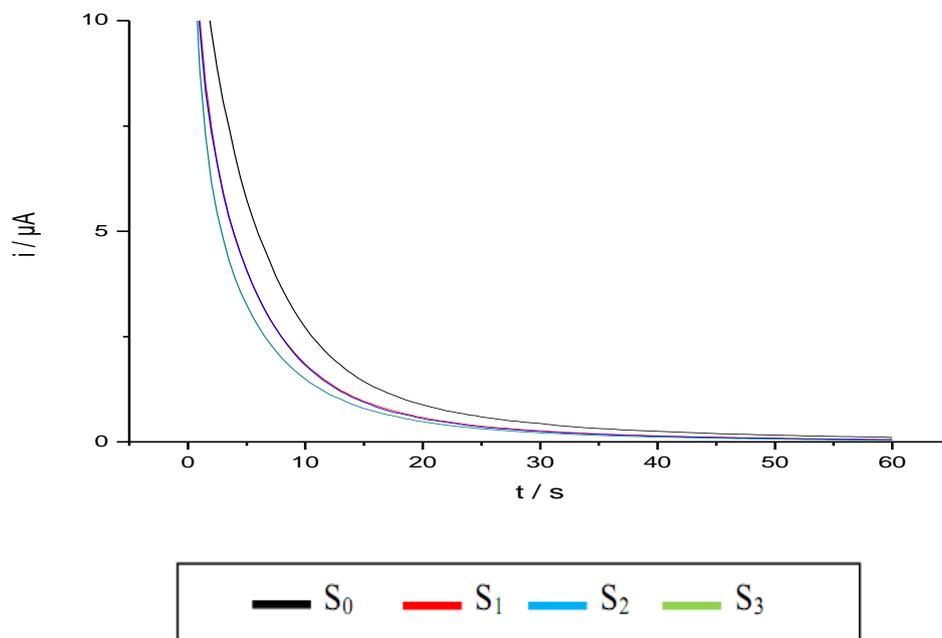


Figura 2.7: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (ee). S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 minutos com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 10^{-2} mg.L^{-1} respectivamente. Condições dos ensaios: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh) na célula: 2mM em tampão fosfato pH 7,5.

De acordo com os ensaios cronoamperométricos, pôde-se verificar uma boa eficiência no método, que forneceu recuperações na faixa de 99,8 a 112%, mostrando que o biossensor preparado com a enzima AChE (ee) foi capaz de quantificar o paration metílico.

Dondoi *et al* (2006), empregando sensores do tipo serigrafado e imobilização com hidroxietil celulose (HEC), verificaram que comparando o efeito inibidor dos inseticidas

paration metílico e paraoxon, o paration metílico tem baixo efeito inibidor da AChE, quando comparado ao paraoxon quando se utiliza de um biossensor à base de acetilcolinesterase. O biossensor incubado por 10 min em solução $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de paration metílico preparado em tampão PBS, não forneceu efeito sobre a atividade enzimática, enquanto que o biossensor incubado com $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de paraoxon provocaram uma total inibição da enzima. Para os autores, este caso exemplifica a necessidade de se oxidar certos átomos para aumentar a sensibilidade dos inseticidas organofosforados; entretanto, a oxidação do inseticida tem que ser feita com cuidado para evitar a desnaturação da enzima e também a degradação do inseticida.

A Figura 2.8 mostra os sinais cronoamperométricos obtidos nos ensaios de recuperação usando-se biossensor preparado com a enzima AChE (eb), durante a reação enzimática após inibição com o inseticida.

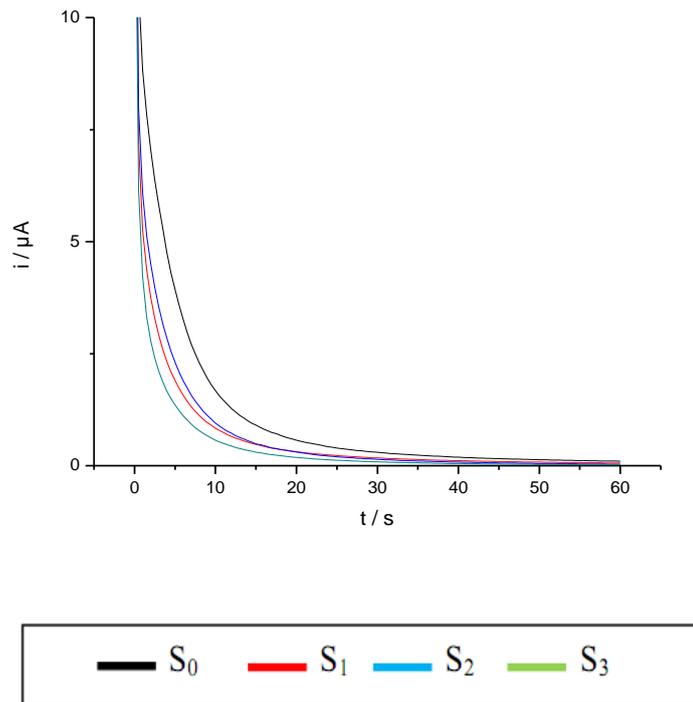


Figura 2.8: Respostas cronoamperométricas obtidas para o biossensor preparado com pasta de carbono modificada com enzima AChE (eb). S_0 = sinal inicial medido; S_1 , S_2 e S_3 sinais obtidos após incubação por 10 minutos com o pesticida em concentrações de 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , $10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente. Condições dos ensaios: temperatura ambiente; concentração de substrato (ATCh) na célula: 2mM em tampão fosfato pH 7,5.

Shi e co-autores (2005), analisando água do mar e empregando um sensor do serigrafado, obtiveram recuperações na faixa de 77 a 98% em relação ao inseticida

organofosforado diclorvos. Os autores utilizaram um tempo de 15 min durante a inibição enzimática, tendo padronizado esse tempo para todos os ensaios de inibição. O método aqui exposto foi mais rápido, pois o tempo de incubação utilizado foi de 10 min e mais eficiente com recuperações acima de 100%.

O tempo de inibição é um dos parâmetros mais influentes na análise de pesticidas. Com o aumento do tempo de imersão na solução de paration metílico normalmente ocorre uma diminuição considerável no sinal da corrente gerada (Gong, Wang e Zhang, 2009), e o valor final pode estar no nível de ruído do aparelho, o que aumentará consideravelmente o erro analítico.

Dondo *et al* (2006), analisando uma mistura de água e acetonitrila, obtiveram recuperações na faixa de 87 a 116% e 80 a 141% , para os inseticidas organofosforados diclorvos e paraoxon, respectivamente. Os autores utilizaram biossensores impressos à base de enzima AChE (ee). Em comparação, o trabalho aqui desenvolvido apresentou resultados semelhantes, com boas recuperações. Contudo, convém ressaltar que a matriz em questão (arroz) possui características diferentes daquela utilizada pelos autores.

Caetano e Machado (2008), analisando o pesticida carbaril em amostras de tomate *in natura*, por meio da inibição da enzima AChE (eb), obtiveram recuperação de 83,4%. Neste caso, o biossensor foi imerso diretamente na polpa do tomate, durante as medidas eletroquímicas. Tal análise mostrou que, embora o carbaril tenha maior probabilidade de ser encontrado na pele e não na polpa do tomate, o experimento mostrou que não houve interferência significativa da matriz nas medidas, em virtude da correlação entre as inibições obtidas com soluções do pesticida e com as amostras fortificadas com mesmo teor do inibidor.

O mesmo foi verificado no presente estudo, contudo com extratos do arroz. Os autores afirmam, ainda, que se a análise fosse realizada a partir do extrato obtido de amostras de tomate fortificadas, a reprodutibilidade dos resultados das recuperações certamente dependeria da etapa de extração do analito da amostra de tomate.

Comparando esta metodologia com a aplicada neste trabalho, pode-se dizer que o sistema tem melhor eficácia na análise de vegetais e frutas em geral, sendo que para a análise de grãos tal metodologia não seria tão adequada.

CONCLUSÕES PARCIAIS

Este trabalho mostrou a eficiência de um biossensor preparado com pasta de carbono na determinação do inseticida organofosforado paration metílico, através da inibição enzimática. O biossensor preparado com quatro tipos de enzimas mostrou-se bastante sensível para análise do pesticida em amostras de arroz *in natura*, apresentando grande exatidão nos ensaios de recuperação com enzimas AChE's geneticamente modificadas obtidas da *Drosophila Melanogaster*.

A técnica de imobilização utilizada foi de fundamental importância, pois proporcionou uma boa estabilidade da enzima, reduziu custos e diminuiu o tempo para o procedimento de fixação da enzima no sensor. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados nos procedimentos de imobilização. O eletrodo de pasta de carbono é uma composição de pó de grafite e de um líquido orgânico imiscível em solução aquosa. Esse eletrodo oferece versatilidade, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície, o que em outros eletrodos não é possível.

Os limites de detecção encontrados mostraram que as enzimas geneticamente modificadas foram mais sensíveis ($LD = 0,001 \mu\text{g.L}^{-1}$) em relação às enzimas AChE (ee) e AChE (eb), que apresentaram limites de detecção de 10 e $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A faixa linear verificada foi de 0,01 a 1; 0,001 a 0,1; 0,001 a 0,001 e 0,0005 a 0,01 mg.L^{-1} , para as enzimas AChE (ee), AChE (eb), AChE (Dros) B08 e B12. De acordo com a exatidão, o método apresentou recuperações médias de 103,9%; 101 %; 102,3% e 105,6 % para os sensores preparados com as enzimas AChE (ee), AChE (eb), AChE (Dros) B08 e B12 respectivamente, comprovando a eficiência do método de detecção do inseticida paration metílico em extratos de arroz.

Pode-se concluir, finalmente, que a metodologia aplicada foi prática e rápida, permitindo que o biossensor construído com pasta de carbono modificada com enzimas à base de acetilcolinesterases pudesse ser usado na determinação do inseticida paration metílico em amostras de grãos. Outros tipos de matrizes podem ser também testadas empregando o mesmo sistema biossensor, e selecionado as enzimas que fornecem melhores resultados, no caso as AChE's mutantes.

REFERÊNCIAS

- ASHANI, Y. et al. Amino acid residues controlling reactivation of organophosphoryl conjugates of acetylcholinesterase by mono- and bis-squaternary oximes. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 6370-6380, 1995.
- BACHMANN, T. T. et al. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. **Biosensors & Bioelectronics** v. 15, p. 193-201, 2000.
- BLASCO, C.; FERNANDEZ, M.; PENA, A.; LINO, C.; SILVEIRA, M.I.; FONT, G.; PICO, Y. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.27, p. 8132, 2003.
- CAETANO, J.; MACHADO, S. A. S. Determination of carbaryl in tomato “*in natura*” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p.40-46, 2008.
- CAMPÀS, M. et al. Towards the protein phosphatase-based biosensor for microcystin detection. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 20, p.1520, 2005.
- DONDOI, M. P. et al. Organophosphorus insecticides extraction and heterogeneous oxidation on column for analysis with an acetylcholinesterase (AChE) biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v.578, p. 162-169, 2006.
- ELLMANN, G. L. et al. A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-92, 1961.
- FAERMAN, C. et al. Site-directed mutants design to test back-door hypotheses of acetylcholinesterase function. **FEBS Lett.** v.386, p.65-71, 1996.
- FATIBELLO, F. O.; CAPELATO, M. D. Biosensores. **Quimica Nova**, v.15, n.1, p.28-39, 1992.
- GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. **Biosensors & Bioelectronics**, v.24, p. 2285-2288, 2009.
- JANATA, J.; JOSOWICZ, M.; DEVANEY, M. Chemical sensors. **Analytica Chemistry**, v.66, n.12, p.207-228, 1994.
- JAIRAM, R.; POTVIN, P. G.; BALSKEY, S. Zn²⁺ inclusion complexes of endodentate tripodands as carbonic anhydrase-inspired artificial esterases. Part 2. Micellar systems. **Journal Chemical Society, Perkin Trans.** v. 2, n. 2, p. 363, 1999.
- KAJIKI, T. et al. Functionalized flavin receptors. Regulation of redox properties of 6-azaflavin via hydrogen bondings with melanine derivatives bearing guanidium ion(s) in organic solvents. **Journal of Organic Chemistry**, v.64, p.9679, 1999.
- MARQUES, P.R.B.O. et al. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila Melanogaster*: application in

amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v.20, n. 4, p. 825-832, 2004.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1791-1799, 2008.

MASSON, P. et al. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. **European Journal Biochemistry**, v.235, p. 36-48, 1996.

LACORTE, S.; BARCELO, D. Determination of parts per trillion levels of organophosphorus pesticides in groundwater by automated on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using positive and negative ion modes of operation. **Analytica Chemistry**, v.69, p.2464-2470, 1996.

LI, H. et al. Simultaneous determination of carbamates in workplace by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Talanta**, v.63, n. 3, p.547-553, 2004.

NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J. L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v.523, p. 107-115, 2004.

NUNES, G. S. et al. Determinação de resíduos de inseticidas carbamatos em alimentos infantis utilizando biossensores amperométricos à base de enzimas acetilcolinesterase mutantes. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 13, n. 2, p. 1-7, 2005.

NUNES, G. S.; **Análise de Inseticidas N-metilcarbamatos em Amostras Vegetais, empregando Técnicas Cromatográficas, Imunoensaio (ELISA) e Biossensores Amperométricos**. 1999. Tese de doutorado- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, 1999.

RAWN, D. F.; ROSCOE, V.; KRAKALOVICH, T.; HANSON, C. N- methyl carbamate concentrations and dietary intake estimates for apple and grape juices available on the retail market in Canada. **Food Additives Contaminants**, v.21, n. 6, p. 555, 2004.

SHI, M.; JINGJING, X.; ZHANG, S.; LIU, B.; KONG, J. A mediator-free screen-printed amperometric biosensor for screening of organophosphorus pesticides with flow-injection analysis (FIA) system. **Talanta**, v. 68, p.1089-1095, 2006.

SINHA, R.; GANESAMA, M.; ANDREESCU, S.; STANCIU, L. AChE biosensor based on zinc oxide sol-gel for detection of pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 195-199, 2010.

SOUSA, S. C. A.; REBELO, M. J. F. Acetylcholinesterase- Choline Oxidase Biosensor for Pirimicarb determination. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v.26, p. 65-75, 2008.

SOTOMAYOR, M. D. P. T; KUBOTA, L. T. *Enzymeless biosensors*: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 123-128, 2002.

SUN, X.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on Prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorus pesticides. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25 p. 2611-2614, 2010.

VELLOM, D. et al. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. **Biochemistry**, v.32, p. 12-17, 1993.

ZHANG, S.; YANG, G. W. Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors & Bioelectronics**, v.15, n. 5-8, p. 273-282, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em comparação, os métodos cromatográfico e amperométrico apresentam vantagens distintas para análise do inseticida paration metílico em amostras de arroz. Como exemplo, o fato de ser possível a análise do composto em níveis de concentração mais baixos entre uma metodologia e outra. Os métodos cromatográficos são os mais usados para detecção de pesticidas em diversas matrizes, entretanto os sistemas cromatográficos exigem diversos equipamentos, tais como detectores específicos, colunas, etc, a fim de se conseguir eficiência nos testes, o que torna a técnica mais cara e em alguns casos não atendem a todos os propósitos investigativos.

Contudo, a técnica de microextração em fase sólida é uma alternativa para os métodos de extração, pois é mais prática e se adapta ao equipamento para automatização, o procedimento se torna mais rápido, e ainda se diminui o contato do analista no preparo da amostra.

Os biossensores amperométricos, por sua vez, são uma alternativa para os métodos cromatográficos, considerando-se os quesitos custo e eficiência, já que os meios de detecção são baseados em sensores produzidos com material de custo reduzido e sua aplicação é adaptada a uma grande quantidade de matrizes. Além disso, os biossensores podem ser facilmente portáteis.

Assim, de acordo com os resultados do presente trabalho, podem-se direcionar tais técnicas a outros tipos de matrizes, tendo em vista que a metodologia que emprega HS-SPME é eficiente em uma faixa de concentração maior que os biossensores amperométricos, ou seja, na matriz estudada, os biossensores foram mais sensíveis, mas requer um maior cuidado por parte do analista na etapa de manuseio dos sensores, enzimas e demais biorreagentes.