

# MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS: UMA REVISÃO

## Summary

IMMUNOCHEMICAL METHODS FOR ANALYSIS OF PESTICIDE RESIDUES: A REVIEW. Immunoassay techniques provide simple, powerful and inexpensive methods for analysis of environmental contaminants, including pesticides. In this paper, special attention is given for the concepts related to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) formats used as basic methods for the development of commercially available kits for pesticide analysis. A list of main commercial kits for detection of some priority pesticides is given in order to help analysts. Others formats, such as flow-injection immunoassay analysis (FIIA), immunoassay chromatography and immunosensors are also cited as emerging and complementary techniques.

**Keywords:** immunoassays, EIA, ELISA, pesticides analysis

Gilvanda Silva Nunes

Universidade Federal do Maranhão  
Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP), Departamento de Tecnologia Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Correspondência:  
Av. Portugueses, s/n  
65080-040. São Luís. MA  
E-mail: vandasn@terra.com.br

## Introdução

Devido à grande difusão do uso dos pesticidas para controle de pragas na agricultura, existe hoje uma grande preocupação com relação à contaminação ambiental e também à presença de resíduos destes compostos nos alimentos. Esta preocupação tem levado a inúmeros estudos visando ao desenvolvimento de técnicas e de metodologias analíticas para a análise rápida dos resíduos de pesticidas.

Métodos uni ou multiresíduos envolvendo a cromatografia a gás (GC) e a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) têm sido usados durante anos para a determinação de pesticidas (1). Em geral, tais métodos apresentam elevada sensibilidade e comprovada confiabilidade, através dos estudos de validação. Contudo, existem alguns fatores que são considerados fortes inconvenientes para a utilização destes métodos, a saber: o alto custo das análises; a necessidade de demorado treinamento de pessoal; o tratamento das amostras que, na maioria das vezes, não é tão simples, sobretudo para matrizes complexas como de alimentos, e o uso de solventes orgânicos, que acabam por resultar em um problema ambiental, pela produção de grandes volumes de resíduos químicos tóxicos.

Por essas razões, têm-se verificado uma crescente demanda por métodos mais rápidos e econômicos, principalmente para os casos de monitoramentos de resíduos em alimentos e no ambiente, cujos resultados se constituem, em muitos casos, ponto de partida para tomadas de decisões oficiais. Entre esses métodos, destacam-se aqueles que envolvem as técnicas bioanalíticas, como os imunoenaios e os biosensores, que representam, em alguns casos, uma alternativa aos métodos tradicionais.

Até algum tempo atrás, os imunoenaios tinham seu maior êxito no campo da química clínica (2-4). Em meados da década de 70, foi desenvolvido o primeiro ensaio biológico para pesticidas (aldrin e dieldrin), baseado na marcação radioativa, que coincidiu

com o surgimento dos *imunoenaios radioativos* (do inglês, *radioimmunoassay, RIA*) (5). A partir daí, e mais precisamente no início dos anos 80, começou-se a discutir as possibilidades que estes tipos de métodos analíticos poderiam oferecer na detecção de contaminantes, em especial de pesticidas, tanto em amostras ambientais como de alimentos (6-9). Começou-se a utilizar, então, a marcação enzimática, que engloba os *ensaaios imunoenzimáticos* ou *imunoenaios* (do inglês, *enzymatic immunoassays, EIA*), que proporcionam menores riscos e apresentam sensibilidades similares (6,8-12).

Avanços nas técnicas imunológicas, como o desenvolvimento de anticorpos altamente seletivos, o surgimento de novos formatos de ensaios e a harmonização nos protocolos de validação, têm possibilitado o uso cada vez mais crescente dos EIAs para a determinação de traços de pesticidas em diferentes matrizes (13,14). Tais avanços são sentidos quando se verifica que algumas agências regulamentadoras, como a EPA (*US Environmental Protection Agency*), que antes eram reticentes quanto a essas técnicas, já aceitam diversos imunoenaios como métodos oficiais de separação de amostras positivas (*screening methods*), que serão então destinadas a posteriores análises empregando técnicas convencionais. Algumas agências já admitem, inclusive, a adoção de alguns desses métodos para fins quantitativos (15).

Os métodos imunológicos envolvem o uso de anticorpos, que são os componentes-chave de todos os imunoenaios, sendo caracterizados por sítios de reconhecimento específicos, presentes nas suas estruturas, que possibilitam interações altamente específicas com os antígenos. A geração de anticorpos para moléculas pequenas, como é o caso dos pesticidas, é extremamente difícil, porque estas não são hábeis na produção de respostas imunológicas. Esta é, certamente, a principal razão pela qual os métodos imunológicos foram primeiramente

introduzidos para trabalhos no campo clínico (16). Por outro lado, têm-se observado, nas duas últimas décadas, grandes progressos no desenvolvimento racional dos anticorpos para moléculas mais simples (17). Problemas de reatividade cruzada (do inglês, *cross reactivity*, CR), que é a capacidade que alguns compostos têm de responder positivamente ao EIA, desde que possuam estruturas similares à do analito, têm sido verificados e minimizados pelas alterações dos formatos dos ensaios (18). Além dessa característica – intrínseca do ensaio –, podem-se também encontrar outras características próprias da matriz, que podem interferir com a técnica, comumente denominadas *efeito matriz*. Como os imunoenaios são formados por uma reação *in vitro*, as condições do meio, tais como pH, força iônica, temperatura, tempo de reação, entre outras, afetarão de forma significativa a eficiência destes.

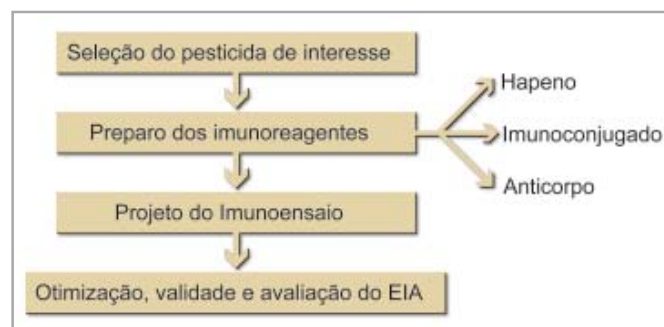
Este trabalho tem por objetivos: *i*) apresentar, abreviadamente, as etapas para desenvolvimento de um EIA para análise de pesticidas; *ii*) discutir os principais avanços no desenvolvimento de imunoenaios para determinação de pesticidas, e algumas das suas aplicações em estudos de monitoramentos ambientais e de alimentos; *iii*) mostrar alguns problemas relacionados com o efeito de matriz e reatividades cruzadas, na aplicação dos EIAs para determinação de pesticidas de diferentes classes, e *iv*) apresentar algumas técnicas hífenadas, como aquelas utilizando EIA/cromatografia e EIA/FIA.

## Desenvolvimento de um EIA para Pesticida

O desenvolvimento de um imunoensaio para análise de um pesticida (em geral, de baixo peso molecular) compreende quatro fases bem diferenciadas, esquematizadas na Figura 1.

Durante a seleção do analito, a estrutura química do composto, a sua estabilidade e os diferentes produtos de degradação, caso existam, são fatores que terão de ser considerados. Uma grande parte dos pesticidas dá origem a produtos de degradação, sob determinadas condições do meio (pH, temperatura, etc.); estes, por sua vez, podem ou não interferir com o imunoensaio.

O desenvolvimento de um EIA requer, como já mencionado, a produção de anticorpos para o analito. Uma vez que as moléculas dos pesticidas são pequenas, estas deverão ser



**Figura 1.** Etapas básicas para desenvolvimento de um imunoensaio

Haptenos	Sensibilidade do imunoensaio	Referências
Herbicidas		
alaclor	10 ppb	32
2,4-D	100 ppb*	33
atrazina	100 ppb	34
	0,3 ppb	35
cianazina	0,5 ppb	36
captan	1 ppb	37
dicamba	10 ppb	38
glifosato	1 ppm	39
metalaclor, alaclor, acetoclor	0,06-0,4 ppb	40
paraquat	0,1 ppb	41
picloram	10 ppb	42
bensulfuron metílico	0,002 ppb	43
ciclohexanediona	0,1 ppb	44
fluoroxipir, triclopir	10 ppb	45
metosulam	0,1 ppb	46
trifluralina	1 ppb	47
Inseticidas		
adcarb	0,03 ppb	48
azadiractin	0,5 ppb	49
carbofuran	0,3 ppb	50
etofenproxi	1 ppb	51
fenitroton	0,3 ppb	52
fenoxicarb	0,5 ppb	53
benzofenilureia-flufenoxiron	IC <sub>50</sub> = 2,4 ppb	54
organofosforados	0,1 ppb	55
	0,1 nM	56
esfenvalerato	3 ppb	57
cloronicotinil-imidaclopride	IC <sub>50</sub> = 17,3 ppb	58
	IC <sub>50</sub> = 35 ppb	59
Fosalone	20 ppb	60
Fungicidas		
tiabendazol	9 ppb	61
tiram	30 ppb	62

Quando a sensibilidade não é apresentada como IC<sub>50</sub>, trata-se do limite de detecção.

**Tabela 1.** Alguns imunoenaios do tipo ELISA desenvolvidos a partir de anticorpos policlonais para análise de pesticidas

acopladas a moléculas maiores, em geral proteínas. Contudo, nem sempre o analito apresenta grupamentos químicos capazes de possibilitar este acoplamento, e por isso devem ser sintetizados os *haptenos*, que nada mais são do que moléculas miméticas do analito, contendo grupamentos como carboxila (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>), hidroxila (-OH) ou sulfidríla (-SH) (19-21). Os haptenos estão, então, aptos a se ligar covalentemente às moléculas de proteínas [em geral, albuminas provenientes de soro bovino (BSA), de soro humano (HSA), de ovo de galinha (OVA), da

Haptenos	Sensibilidade do imunoensaio	Referências
Herbicidas		
2,4-D	0,1 ppb	63
atrazina	0,1 ppb	64
	1 nM	65
Isoproturon	20 ppb	66
paraquat	1 ng	67
metalaclor, alaclor	0,06-0,4 ppb	40
paraquat	0,1 ppb	41
picloram	10 ppb	42
terbutilazina	IC <sub>50</sub> = 0,13 ppb	68
ciclohexanediona	4 ppb	44
diclobenil e prod. Degradação	0,02 ppb	69
imazetapir	3-30 ppb	70
terbutrina	IC <sub>50</sub> = 0,13 ppb	68
Inseticidas	IC <sub>50</sub> = abaixo de nM	71
azinfos metílico	IC <sub>50</sub> = 6,5 nM	72
propoxur	0,1 ppb	73
carbaril	IC <sub>50</sub> = 0,74 ppb	72,74,75,76
carbofuran	10 ppb	55
clorotalonil	IC <sub>50</sub> = 6 nM	77
ditiofosfato-azinfos	10 ppb	78
metílico	300 ppb	51
etofenproxi	0,1 ppb	79
flucitrinato	1 ppb	80
imazalil		55
organofosforados	0,05 ppb	
Fungicidas		73
tiabendazol		

Quando a sensibilidade não é apresentada como IC<sub>50</sub>, trata-se do limite de detecção.

**Tabela 2. Alguns imunoensaios do tipo ELISA desenvolvidos a partir de anticorpos monoclonais para análise de pesticidas**

tiroglobulina (TG) ou da hemocianina (KLH)], dando origem aos *imunoconjugados* (20-22). Estes últimos são utilizados para induzir a produção de anticorpos em cobaias, que podem ser camundongos, ratos, coelhos, e até animais de grande porte, como suínos, eqüinos e caprinos (23-29).

Os anticorpos gerados durante uma reação imunológica podem unir-se a uma área específica da molécula do antígeno, chamada *epítipo*. Se o antígeno é muito grande, uma população heterogênea de diferentes anticorpos pode ser formada durante a imunização. Cada grupo de células B geneticamente idênticas (*clones*) e estimuladas produz seu anticorpo característico, porém todos os anticorpos produzidos pelo mesmo clone são idênticos. Uma vez que não se podem separar os anticorpos de clones diferentes, o anti-soro resultante é, por natureza, *policlonal*, isto

é, os anticorpos são gerados por diferentes clones de células (30). Os anticorpos policlonais são os mais fáceis de se produzir; por outro lado, a biotecnologia possibilitou a produção de anticorpos *monoclonais*, a partir da fusão de células B únicas com células tumorais (31).

Nas duas últimas décadas, diversos ensaios imunológicos foram desenvolvidos para análise de diferentes grupos de pesticidas, alguns apresentando excelentes limites de detecção, tanto com anticorpos policlonais (Tabela 1), quanto com monoclonais (Tabela 2). Dependendo do formato do EIA, que define, entre outras coisas, a sua seletividade, este pode ser usado somente como técnica de *screening* ou como um método quantitativo.

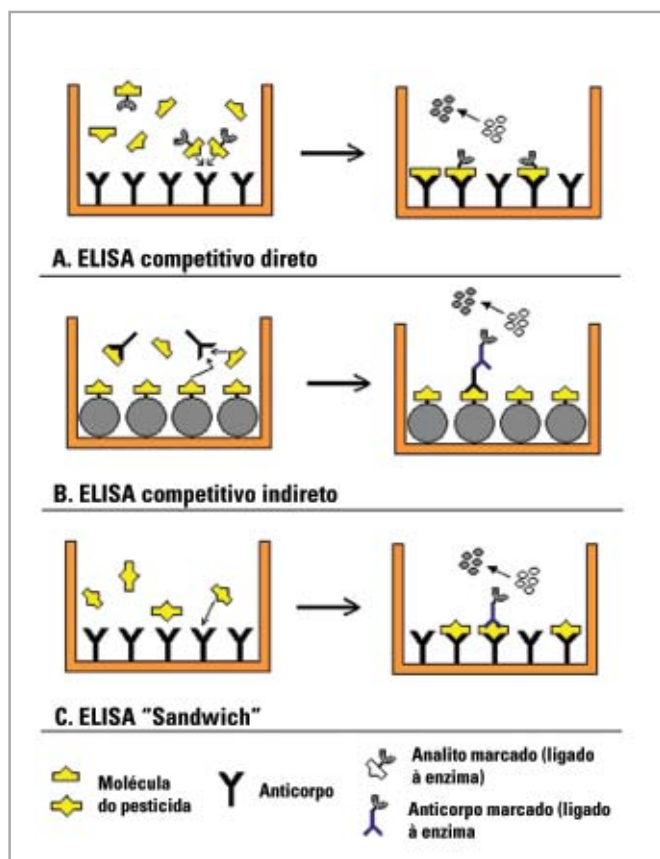
A interação específica do anticorpo com o seu analito é quantificável, graças à utilização de marcadores. Os diferentes tipos de marcadores incluem os radioisótopos (31), as enzimas (31), a fluorescência (81), a fosforescência (81,82), a quimioluminescência (31,81) e a bioluminescência (83). Os métodos mais utilizados utilizam enzimas e substratos colorimétricos, como aqueles utilizados pela primeira vez por Miles e Hayes (83), e posteriormente aplicados a ensaios imunológicos (18). Os marcadores enzimáticos mais empregados são a peroxidase (*horseradish peroxidase*, *HRP*) e a fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*, *AP*) (84,85), que apresentam uma série de requisitos indispensáveis (elevada pureza, alta atividade específica, substrato estável, facilmente conjugável, etc.) (86).

### Formatos de Imunoensaios

Nos formatos de EIAs mais simples – e mais usuais – o anticorpo pode ser acoplado ao antígeno em placas de poliestireno irradiadas ou em tubos contendo partículas magnéticas (87). Como se tratam de ensaios conduzidos em suportes sólidos, estes são denominados ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os fabricantes mais conhecidos dessas placas são as empresas *Millipore*, *ImmunoSystem* e *Quantix*. Alguns formatos também admitem a união covalente dos anticorpos em partículas magnéticas de 1µm, que funcionam também como suportes sólidos. A Ohmicron Systems é a empresa que possui tradição na fabricação das partículas magnéticas.

Os EIAs podem ser de dois tipos: a) *heterogêneos*, nos quais, durante o ensaio, ocorre separação dos reagentes unidos dos não-unidos, e b) *homogêneos*, nos quais essa etapa de separação é suprimida. Os ensaios heterogêneos têm sido os mais utilizados em análises de pesticidas, e compreendem dois tipos: os *ensaios não-competitivos*, também chamados 'sandwich', e os *ensaios competitivos* (14). A diferença do formato de ELISA tipo 'sandwich' é que neste o sinal gerado é inversamente proporcional à concentração do analito (21,86).

O EIA competitivo envolve a medida dos sítios não-ocupados, a partir do uso de uma concentração limite do anticorpo. A Figura 2 apresenta um esquema dos EIAs heterogêneos, tanto com anticorpos (Figura 2A) quanto com antígenos (Figura 2B) imobilizados. Na Figura 2A, as moléculas do analito presentes



**Figura 2. Alguns tipos de imunoenaios. (A) EIA competitivo à anticorpos immobilizados (concentração conhecida do anticorpo) e adição dos analitos (ou antígenos) e dos analitos marcados à solução; (B) EIA competitivo à antígenos immobilizados e adição dos analitos e dos anticorpos (concentração conhecida) à solução; (C) EIA não-competitivo à anticorpos immobilizados não-marcados e adição dos analitos e de um excesso de anticorpos marcados. (Reprodução permitida, com modificações, da ref. 14)**

na amostra e as moléculas marcadas do analito competem pelos sítios de ligação com o anticorpo no suporte sólido. Após uma etapa de lavagem, na qual são removidas as moléculas livres (que não se uniram ao anticorpo) tanto do analitos quanto do analito marcado, a concentração do antígeno ligado é medida por um traçador. No ELISA competitivo indireto, os antígenos são immobilizados no suporte sólido e os anticorpos marcados são adicionados ao meio, junto com os analitos a serem determinados. Na Figura 2B, as moléculas immobilizadas do analito competem, com as moléculas do analito provenientes da amostra, pelos anticorpos não-marcados. A concentração dos anticorpos unidos às moléculas immobilizadas do analito é determinada pela adição de anticorpos marcados, que podem reconhecer especificamente os anticorpos (14).

EIAs não-competitivos são representados na Figura 2C. Eles são baseados na medida dos sítios de ligação não-ocupados, através da adição de um excesso conhecido do anticorpo. Anticorpos não-marcados são immobilizados, enquanto que os

anticorpos marcados são adicionados livres ao meio de reação. Esta configuração só pode ser conduzida quando o analito possui pelo menos dois sítios de ligação, sendo, portanto, não-apropriado para pesticidas cujas moléculas são muito pequenas (14).

### **Kits comerciais para análise de pesticidas**

A maioria dos EIAs comerciais para pesticidas (*Kits* de análises) apresentam a configuração competitiva indicada na Figura 2A. O traçador consiste no analito marcado, que é adicionado ao sistema. Como já comentado, embora os marcadores fluorescentes e quimiluminescentes sejam altamente sensíveis, os marcadores à base de enzimas, como a HRP e a AP, têm sido os preferidos para aplicações analíticas. O antígeno marcado, na maioria das aplicações, possui a denominação *imunocjugado*.

A Tabela 3 apresenta alguns dos *kits* de imunoenaios para análise de pesticidas. A grande vantagem da sua utilização, além da rapidez e da sensibilidade, é a possibilidade de se efetuar medidas *in situ* com uma grande quantidade de amostras, em um mesmo dia. Contudo, apesar dessas vantagens, a aceitação da aplicação desses métodos rápidos em monitoramentos depende de vários fatores, incluindo a demonstração da qualidade dos dados analíticos – que leva em consideração parâmetros como repetibilidade e reprodutibilidade, e da sua validação, mediante comparação de resultados com aqueles obtidos com o uso de técnicas convencionais. Uma revisão crítica sobre o desenvolvimento e a aplicação desses *kits* comerciais para análise de pesticidas foi apresentada por Gabaldón *et al.* (88).

## **Imunoenaios por Grupos de Pesticidas: desenvolvimento e aplicações**

### **a) Herbicidas**

Os herbicidas são o grupo de pesticidas mais utilizado em todo o mundo (cerca de 65% do montante total) e, por essa razão, resíduos desses compostos têm sido frequentemente encontrados no ambiente (89). São, portanto, esses compostos que lideram na lista dos EIAs desenvolvidos; os herbicidas do grupo das triazinas têm sido os mais estudados (34,35,64,65,90-97), seguido do grupo das acetanilidas (32,40,98-100). Avanços nas técnicas de produção dos anticorpos têm permitido a obtenção e a purificação de anticorpos monoclonais altamente seletivos para detecção das *s*-triazinas. Bruun *et al.* (91) sintetizaram e caracterizaram sete haptenos, a partir dos herbicidas atrazina, deisopropilatraxina hidroxiatrazina, simazina, hidroxisimazina, cianazina e terbutilazina, para obtenção dos correspondentes anticorpos. Estudos de reatividade cruzada foram também conduzidos.

Entre os herbicidas pertencentes ao grupo das acetanilidas, os mais estudados são o alaclor, o metolaclor e o acetoclór, que

Composto detectado	Fabricante
Acetanilidas	EnviroLogix (P)
Acetochlor	Millipore (P)
alachlor	Baker (T), Millipore (P, T), Quantix (P)
aldicarb	Baker (T), Millipore (P, T), EnviroLogix (P)
atrazina (triazinas)	Baker (T), Millipore (P, T), R-Biopharm (P),
benomyl (MBC)	EnviroLogix (P)
captan	Quantix (P), EnviroLogix (P)
carbaryl	Baker (T)
carbendazim	Baker (T)
carbendazim/benomil	Baker (T)
carbendazim/MBC	Millipore (T), EnviroLogix (P)
cianazina	Millipore (P)
ciclodienos	EnviroLogix (P)
clordane	EnviroLogix (P)
clorpirifos	Millipore (T)
2,4-D	Baker (T), EnviroLogix (P)
DDT	Baker (T), Millipore (P, T)
fenitroton	Millipore (P), EnviroLogix (P)
fluometuron	Millipore (P, T)
fluridona	EnviroLogix (P)
glifosato	EnviroLogix (P)
imidaclopride	EnviroLogix (T)
isoproturon	EnviroLogix (P)
metalaxil	Millipore (P), EnviroLogix (P)
metolaclor	EnviroLogix (P)
metopreno	Baker (P), Quantix (P)
paraquat	EnviroLogix (P)
paration	Baker (T), Millipore (P), EnviroLogix (P)
paration/paration metílico	EnviroLogix (P)
triazinas	Millipore (P), EnviroLogix (P)
trifluralina	EnviroLogix (P)
triclopir	Quantix (P)
herbicidas urea	Baker (T)
piretroides sintéticos	Millipore (P)
screening para inseticidas	EnviroLogix (P)
anticolinesterases	EnviroLogix (P)
screening para inseticida	
organoclorados	EnviroLogix (P)
inseticidas piretróides	EnviroLogix (P)

P = kit em placa; T = kit em tubo

**Tabela 3. Alguns kits de imunoenaios comerciais para análise de pesticidas**

já possuem protocolos validados, sendo que, desde 1995, alguns kits de EIAs são considerados métodos oficiais para *screening* de amostras de água (100). Tais métodos são baseados em um ELISA competitivo, desenvolvido em um formato que utiliza

placas de poliestireno, e apresentam elevadas sensibilidade ( $IC_{50}$  variando de 0,75 a 2500 ppb e limites de detecção na faixa de 0,05 a 1,3 ppb) e reprodutibilidade (coeficientes de variação das curvas dose-resposta variando, geralmente, entre 5,7 e 17,8%). As empresas Ohmicron, Millipore e Quantix são as principais fabricantes dos kits de EIAs para metolaclor e alaclor (Tabela 3).

O herbicida 2,4-D pertence ao grupo dos compostos clorofenoxi e tem sua aplicação não somente na agricultura, mas também em nível doméstico, na preservação de jardins de casas, clubes e locais de recreação (101). Nos mamíferos, quando assimilado, esse composto é totalmente excretado via urina sem maiores biotransformações (102, 103), o que permite a sua dosagem direta em estudos epidemiológicos (104-107). Alguns EIAs bastante sensíveis foram empregados para dosagem de 2,4-D na urina, e o único tratamento da amostra consistiu no ajuste do pH com o próprio tampão do ensaio (33,102,108). O ensaio é extremamente fácil e, em alguns casos, foi possível identificar uma contaminação em trabalhadores rurais, não só do 2,4-D como também do seu principal produto de degradação, o (4-cloro-2-metilfenoxil)-ácido acético (MCPA), mediante a análise de urina e de sêmen, diretamente correlacionada com o tempo de exposição do trabalhador ao agrotóxico (109).

Muitas das vezes a própria matriz trata de realizar a degradação do pesticida, como é o caso do herbicida diclobenil que, no ambiente, é rapidamente transformado em 2,6-diclorobenzamida (BAM), através de uma combinação de processos bióticos e não-biológicos, em geral no hidrosolo. Deste modo, torna-se impossível a determinação direta do composto-pai sem grandes perdas na recuperação. Bruun *et al.* (110) desenvolveram um EIA altamente seletivo (reatividades cruzadas variando entre < 0,0002 e 10,8 %) e sensível ( $IC_{50}$  de 0,2 ppb) para dosagem indireta do herbicida na forma de BAM.

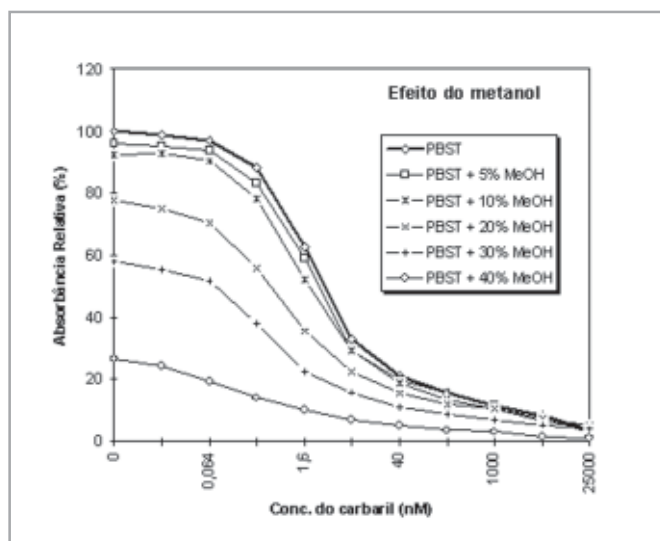
Trifluralina, um importante herbicida seletivo pré-emergente que apresenta elevada capacidade de ser absorvido pelo solo, também tem sido determinado por um ELISA empregando um anticorpo monoclonal, com limite de detecção de 0,1 ppb (111)

## b) Inseticidas

### Organoclorados (OCs)

Embora a sua utilização tenha sido proibida em todo o mundo, diversos estudos visando ao monitoramento de resíduos de OCs ainda vêm sendo conduzidos, devido à elevada persistência desses compostos e de seus produtos de degradação no ambiente. Entre os OCs de maior ocorrência, destaca-se o 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, mais conhecido como DDT. Diversos problemas endócrinos e neurológicos em humanos têm sido relacionados com a contaminação desse composto e do seu principal metabólito, o 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno (DDE) (112).

Poucos EIAs foram desenvolvidos para OCs, devido às dificuldades durante a preparação dos haptenos. Recentemente,



**Figura 3. Efeito do teor do metanol no tampão PBST sobre a conformação das curvas concentração-resposta do ELISA desenvolvido para análise do inseticida carbaril**

Anfossi *et al.* (112) desenvolveram um EIA não-competitivo baseado no método original descrito por Eremenko *et al.* (113) para a determinação do DDT. Este método baseia-se na separação entre os complexos analito-anticorpo e os anticorpos livres por meio de uma fase cromatográfica. Brevemente, um excesso do anticorpo (monoclonal) específico é inicialmente misturado ao analito para formar o complexo, e a remoção dos anticorpos que não se uniram ao analito é feita mediante o uso de uma coluna de bioafinidade, na qual um analito análogo encontra-se imobilizado. O complexo passará pela coluna, sem ser fixado a esta, podendo então ser detectado. Não obstante à sua simplicidade, o método mostrou-se bastante sensível (limite de detecção de 8 ng.L<sup>-1</sup>), tendo sido observada maiores reatividades cruzadas com seus análogos *p,p'*-DDD e *p,p'*-DDE (RCs de 90 e 75%, respectivamente).

Um outro imunoenensaio foi desenvolvido para DDT, mas com detecção por quimiluminescência (114), tendo sido depois aplicado na análise de amostras ambientais e de alimentos (115).

#### ***N-Methylcarbamatos (NMCs) e Organofosforados (OPs)***

Esses inseticidas foram primeiramente introduzidos como uma alternativa aos OCs, por apresentarem persistência no ambiente e potencial de bioacumulação relativamente baixos, além de um espectro de atuação bastante amplo (116,117). Os princípios ativos pertencentes a essas classes de inseticidas são inibidores da enzima acetilcolinesterase, que participa nos processos de transmissão de impulsos nervosos. Devido à atual intensa aplicação desses compostos, sua monitorização é de fundamental importância, sobretudo para a garantia de vida nos ecossistemas.

Diversos EIAs têm sido desenvolvidos para detecção e

quantificação dos inibidores de colinesterases, a maioria deles baseados em anticorpos monoclonais (55,71-76,78,116-119). Protocolos mais antigos e menos sensíveis empregavam anticorpos policlonais (48,50,53,55,56). Contudo, recentemente foram desenvolvidos também anticorpos policlonais que possibilitaram o projeto de ELISAs altamente seletivos e sensíveis para análise de OPs (120,121). Algumas aplicações em estudos ambientais têm sido relatadas (122-125).

A aplicação direta dos imunoenaios em amostras reais algumas vezes é difícil, pois, dependendo da natureza da amostra, um forte efeito de matriz pode ser observado. Nós desenvolvemos um estudo de validação do protocolo de um EIA para o inseticida carbaril, através da comparação dos resultados obtidos mediante um método cromatográfico oficial (119). Para a comparação dos resultados, o mesmo extrato metanólico, contendo uma quantidade conhecida do inseticida, foi analisado pelas duas técnicas, sendo que, para a aplicação do EIA, foi necessária uma diluição do extrato com o próprio tampão do ensaio (PBST). A Figura 3 mostra que o anticorpo policlonal utilizado no estudo resistiu a um teor máximo de 10 % de metanol na amostra analisada. Uma excelente correlação foi encontrada entre os dois métodos. Este mesmo EIA foi aplicado posteriormente para análise direta em sucos de frutos (118), e o tratamento da amostra consistiu de uma simples diluição do suco em PBST, seguida de um prévio ajuste do pH para um valor próximo ao do tampão do ensaio. A Figura 4 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos com amostras de sucos de limão tratadas e não-tratadas.

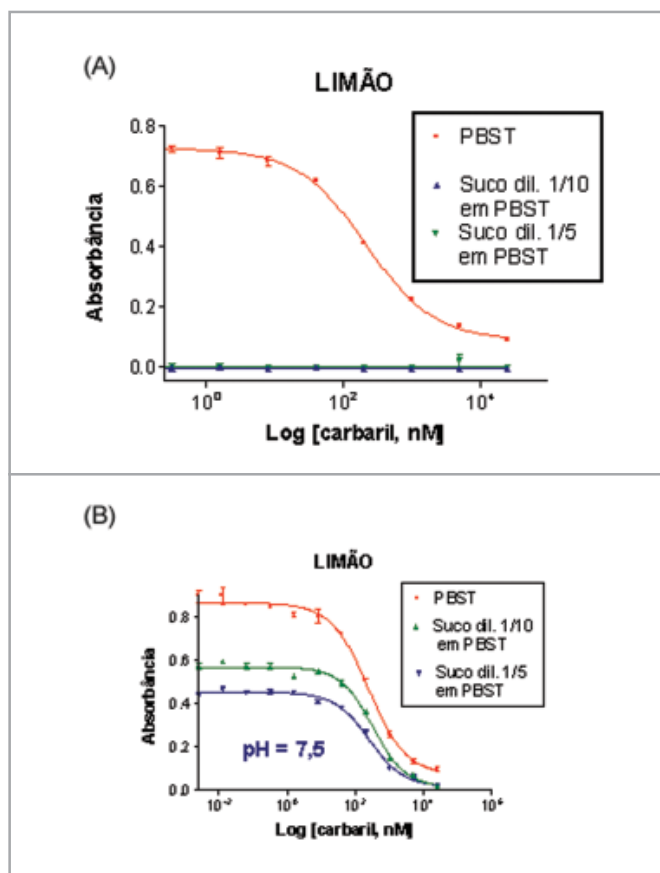
#### ***Triazinas e Piretróides***

Samsonova *et al.* (94) desenvolveram anticorpos mono e policlonais para determinação de inseticidas piretróides e triazinas. Elevadas sensibilidades foram encontradas para os métodos desenvolvidos com tais anticorpos; contudo, a técnica de detecção (quimiluminescência) não se mostrou muito simples. Watanabe *et al.* (126) desenvolveram e validaram um ELISA relativamente sensível (IC<sub>50</sub> ~ 22,5 ppb) para análise do inseticida piretróide permetrina, tendo sido determinadas as reatividades cruzadas para seus compostos análogos (*trans*-permetrina, fenotrina, resmetrina, bioresmetrina, cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, fenvalerato e fluvalinato). Menor reatividade cruzada (0,004 %) foi verificada para fluvalinato, e maior (30,2 %) para *trans*-permetrina.

#### ***Outros inseticidas***

Para determinação específica do inseticida sistêmico imidaclopride, foi desenvolvido um ELISA bastante sensível (IC<sub>50</sub> = 6,2 nM) baseado em anticorpos monoclonais (127,128).

O inseticida regulador de crescimento dos insetos fenoxicarb pode ser determinado pelos ELISAs competitivos baseados em anticorpos policlonais (129); este imunoenensaio foi aplicado a análises rápidas em plantações de maçã pulverizadas com o pesticida (130).



**Figura 4.** Efeito do pH e da diluição com tampão PBST, sobre o imunoenensaio ELISA aplicado à análise de carbaril em sucos de limão. (A) suco com pH natural (~2,08); (B) suco com pH ajustado a 7,5 com gotas de NaOH 2mol.L<sup>-1</sup>

Um teste rápido foi desenvolvido para diflubenzuron, um inseticida do grupo dos compostos feniluréias (131).

### c) Fungicidas

De todas as classes de pesticidas, os fungicidas têm sido menos estudados, com relação ao desenvolvimento de imunoenaios. Em geral, é muito difícil sintetizar os haptenos para as suas moléculas, mas alguns *kits* de análise rápida podem ser encontrados no mercado, já tendo sido aplicados para no monitoramento de resíduos do fungicida procimidona em amostras vegetais (132).

## Principais Avanços no Campo dos EIAs para Análise de Pesticidas

Os avanços mais recentes na área dos métodos imunocímicos incluem: o desenvolvimento de novos formatos de ensaios (14,133), inclusive envolvendo detecção por técnicas altamente sofisticadas, como é o caso da polarização fluorescente

(134); projetos de ensaios multiresiduais; o surgimento de diversos métodos envolvendo cromatografia por imunoafinidade (133); o desenvolvimento de imunoenaios hifenados com FIA (*Flow Injection Analysis*) (135, 136) e a Cromatografia por Bioafinidade (117).

Uma grande atenção tem sido devotada aos *kits* de imunoenaios para detecção/quantificação de resíduos de pesticidas, principalmente os de última geração, cuja polaridade varia de mediana a alta, e que têm sido frequentemente encontrados nos ambientes aquáticos, na biota e também nos alimentos. Na maioria dos casos, em menos de uma hora de análise pode-se ter uma resposta, sendo que a grande vantagem do uso desses *kits*, além da rapidez, é a possibilidade de se analisarem inúmeras amostras ao mesmo tempo.

Imunossensores automatizados e, na maioria dos casos, operando em FIA, têm sido também desenvolvidos para análise de pesticidas, e uma nova categoria de sistemas analíticos foi descrita pela primeira vez em 1992, dando origem aos sistemas de imunoenalises por injeção em fluxo (do inglês, *Flow-Injection Immunoanalysis Systems, FIIA*) (137). Em geral, os biossensores dispensam o tratamento da amostra, principalmente se esta for líquida ou pastosa, sendo ainda muito mais rápidos e sensíveis que os métodos convencionais. Contudo, o desenvolvimento de imunossensores em fluxo não tem sido uma tarefa fácil, e várias pesquisas têm sido conduzidas visando ao melhoramento dos sistemas em FIIA (138-141).

## Conclusões

Entre os métodos analíticos para detecção e quantificação de pesticidas, os imunoenaios têm merecido destaque, pois combinam características altamente satisfatórias para a sua utilização em programas de monitoramento, tais como simplicidade operacional e elevadas sensibilidade e rapidez.

Este artigo apresenta alguns dos avanços atuais no desenvolvimento de imunoenaios para análise de pesticidas, dando ênfase aos métodos imunocímicos baseados na marcação enzimática (ELISAs). Técnicas de preparo *online* de amostras, denominadas, por sua eficiência ecológica, como “environmentally friendly analytical techniques”, que empregam a microextração em fase sólida (SPME) e a extração por sorção em barra magnética (SBSE), podem vir a solucionar problemas de seletividade, de sensibilidade e de efeitos de matriz, em formatos para os quais foram desenvolvidos anticorpos ainda não totalmente seletivos. Certamente, pesquisas futuras estarão voltadas para essa direção, e também para o aperfeiçoamento das técnicas de acoplamento covalente das enzimas à fase sólida, no desenvolvimento específico da cromatografia por bioafinidade.

## Agradecimentos

A autora agradece o apoio do CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico-Tecnológico) pelo suporte financeiro.

## Referências

1. AOAC - Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**, 18<sup>th</sup> edn., AOAC International, Arlington, USA, 1995.
2. Thienpont LM, Van Uutfanghe K, Leenheer AP. **Clin. Chim. Acta** 2002, 323, 73.
3. Lamari F, Anastassiou ED, Dimitracopoulos G, Karamanos NK. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2000, 23, 939.
4. Stead DA. **J. Chromatogr. B** 2000, 747, 69.
5. Langone JJ, Nvunakis H. **Res. Comm. Chem. Path. Pharm.** 1975, 10, 163.
6. Nistor C, Emnéus J. **Waste Manag.** 1999, 19, 147.
7. Hammock BD, Mumma RO. In: **Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology**, J. Harvey, Z. Zweig (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. 1980, 321.
8. Sherry JP. *Environmental Chemistry: The Immunoassay Option*. In: **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**. Coleman DM, Coleman PB. (Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1992, 23, 276.
9. Wie SI, Hammock BD. **J. Agric. Food Chem.** 1992, 30, 949.
10. Behnisch PA, Hosoe K, Sakai S.-I. **Environ. Int.** 2001, 27, 413.
11. Krämer PM, Marco MP, Hammock BD. **J. Agric. Food Chem.** 1994, 42, 934.
12. Yau KYF, Lee H, Hall CJ. **Biothecnol. Adv.** 2003, 21, 599.
13. Hammock BD, Gee SJ, Harrison RO, Jung F, Goodrow MH, Li QX, Lucas AD, Szcakás A, Sundaram S. In: **Immunochemical Methods for Environmental Analysis**, M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, D. W. Roberts (Eds.). American Chemical Society, Washington, D.C. 1990, 112.
14. Hennion MC, Barceló D. **Anal. Chim. Acta** 1998, 36, 3.
15. US Environmental Protection Agency. *Test Methods for Evaluation of Solid and Aqueous Waste: Physical-Chemical Methods*. 3<sup>rd</sup> Ed., US-EPA, Washington, DC, 1996.
16. Thienpont LM, Van Uutfanghe K, Leenheer AP. **Clin. Chim. Acta** 2002, 323, 73.
17. Spinks CA. **Trends Food Sc. Technol.** 2000, 11, 210.
18. Ercegovich CD. *Analysis of Pesticide Residues: Immunological Techniques*, J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. 1991, 162.
19. Harrison RO, Goodrow MH, Gee SJ, Hammock BD. In: **Immunoassay for Trace Chemical Analysis**, M Vanderlaan, L. Stanker, B. Watkins, D. Roberts (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. 1990.
20. Goodrow LW, Sanborn JR, Stoutamire DW, Gee SJ, Hammock BD. In: **Immunoanalysis of Agrochemicals**, J. O. Nelson, A. E. Karu, R. B. Wong (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. 1995.
21. Burrin J, Newman DJ. In: **Principles and Practice of Immunoassay**, C. P. Price, D. J. Newman, (Eds.), Stockton Press, New York. 1991, 19.
22. Wong SS. **Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking**, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. 1993.
23. Dresser DW. In: *Handbook of Experimental Immunology. Immunochemistry*, D. M. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1986.
24. Tout NL, Yau KYF, Trevors JT, Lee H, Hall JC. **J. Agric. Food Chem.** 2001, 49, 3628.
25. Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Junghbluth AA. **J. Biol. Chem.** 2000, 275, 13668.
26. Saini, S. S.; Hein, W. R.; Kaushik, A. **Mol. Immunol.** 1997, 34, 641.
27. O'Brien PM, Aitken R, O'Neil BW, Campo MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 640.
28. Muyldermans S. **Rev. Mol. Biotechnol.** 2001, 74, 277.
29. Tanha J, Xu P, Chen Z, Ni F, Kaplan H, Narang SA. **J. Biol. Chem.** 2001, 276, 24774.
30. Gosling JP. *Enzyme Immunoassay*, In: **Immunoassay**, Academic Press, Inc., New York. 1996, 283.
31. Benjamini IE, Leskowitz S. **Immunology: a short course**, 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-Liss, New York, 1991.
32. Feng PC, Wratter SJ, Horton SR, Sharp CR, Logusch EW. **J. Agric. Food Chem.**, 1990, 38, 159.
33. Hall JC, Deschamps RJA, Krieg KK. **J. Agric. Food Chem.** 1989, 37, 981.
34. Krämer K, Lepschy J, Hock B. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** 2001, 84, 150.
35. Jaeger LL, Jones AD, Hammock BD. **Chem. Res. Technol.** 1998, 11, 342.
36. Lawruk TS, Kachman CE, Jordan SW, Fleeker JR, Herzog DP, Rubio FM. **J. Agric. Food Chem.** 1993, 41, 747.
37. Yeung JM, Newsome WH. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** 1993, 76, 1225.
38. Clegg BB, Stephenson GR, Hall JC. **J. Agric. Food Chem.** 2001, 49, 2168.
39. Clegg BB, Stephenson GR, Hall JC. **J. Agric. Food Chem.** 1999, 47, 5031.
40. Casino P, Morais S, Puchades R, Maquieira A. **Environ. Sci. Technol.** 2001, 35, 4111.
41. Spinks CA, Wang B, Mills ENC, Morgan MRA. **Analyst** 1999, 124, 847.
42. Deschamps RJA, Hall JC. *Polyclonal and monoclonal immunoassays for picloram detection*. In: Van Emon, J. M ; Mumma, R. O. (Eds.). **Immunochemicals methods for environmental analysis**. ACS Symposium Series. 1990, 442, 66.
43. Lee JK, Ahn KC, Park OS, Ko YK, Kim DW. **J. Agric. Food Chem.** 2002, 50, 17.
44. Webb SR, Hall JC. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** 2001, 84, 143.
45. Johnson BD, Hall JC. **J. Agric. Food Chem.** 1996, 44, 488.
46. Parnel JS, Hall JC. **J. Agric. Food Chem.** 1998, 46, 152.
47. Riggle B. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 1991, 46, 404.
48. Braddy JF, Fleeker JR, Wilson RA, Mumma R. **O. Am. Chem. Soc. Symp. Ser.** 1989, 382, 262.
49. Hemalatha K, Venugopal NB, Rao BS. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** 2001, 84, 1001.
50. Jourdan SW, Scutellaro AM, Fleeker JR, Herzog DP, Rubio FM, **J. Agric. Food Chem.** 1995, 43, 2784.
51. Miyake S, Hayashi A, Kumeta T, Kitajima K, Kita H, Ohkawa H. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 1998, 62, 1001.
52. Watanabe E, Kanzaki Y, Tokumoto H, Hoshino R, Kubo H, Nakazawa H. **J. Agric. Food Chem.** 2002, 50, 53.
53. Szurdoki S, Szcákás A, Le HM, Hammock BD. **J. Agric. Food Chem.** 2002, 50, 29.
54. Wang S, Allan RD, Skerritt JH, Kennedy IR. **J. Agric. Food Chem.** 1999, 47, 3416.
55. Alcocer MJ, Doyen C, Lee HA, Morgan MR. **J. Agric. Food Chem.** 2000, 48, 335.
56. Schmidt P, Kuhlmann R, Losch U. **Z. Naturforsch** 1988, 43,

- 167.
57. Shan G, Wang W, Gee SJ, Buchholz BA, Vogel JS, Hammock BD. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2000, *97*, 24.
58. Lee JK, Ahn KC, Park OS, Kang SY, Hammock BD. **J. Agric. Food Chem.** 2001, *49*, 2159.
59. Li K, Li QX. **J. Agric. Food Chem.** 2000, *48*, 3378.
60. Issert V, Lazaro R, Lamaty F, Rolland V, Besancon P, Caporiccio B. **Amino Acids** 1999, *17*, 377.
61. Bushway RJ, Young BE, Paradis LR, Perkins LB. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.** 1994, *77*, 1243.
62. Gueguen F, Boisdé F, Queffelec AL, Haelters JP, Thouvenot D, Corbel B. **J. Agric. Food Chem.** 2000, *48*, 4492.
63. Gerdes M, Meusel M, Spener F. **Anal. Biochem.** 1997, *252*, 198.
64. Choi MJ, Jo C, Choi J, Kang C.-Y, Han CT. **J. Immunoass.** 1999, *20*, 57.
65. Skládal P. **Biosens. Bioelectron.** 1999, *14*, 63.
66. Liegeois E, Dehon Y, De Brabant B, Perry P, Portetelle D, Copin A. **Sci. Total Environ.** 1992, *123*, 17.
67. Nagao M, Takatori T, Wu B, Tarazawa K, Gotoudam H, Akabane H. **J. Immunoass.** 1989, *10*, 1.
68. Holthues H, Pfeifer-Fukumura U, Hartmann I, Baumann W. **Fresenius' J. Anal. Chem.** 2001, *371*, 897.
69. Bruun L, Koch C, Pedersen B, Jakobsen MH, Aamand J. **J. Immunol. Met.** 2000, *240*, 133.
70. Chin TE, Wong RB, Pont JL, Karu AE. **J. Agric. Food Chem.** 2002, *50*, 3380.
71. Mercader JV, Montoya A. **J. Agric. Food Chem.** 1999, *47*, 1276.
72. Moreno MJ, Abad A, Montoya A. **J. Agric. Food Chem.** 2001, *49*, 72.
73. Abad A, Moreno MJ, Pelegri R, Martínez MI, Saez A, Gamon M. et al. **J. Agric. Food Chem.** 2001, *49*, 1707.
74. Abad A, Moreno MJ, Pelegri R, Martínez MI, Saez A, Gamon M. et al. **J. Chromatogr. A.** 1999, *833*, 3.
75. Abad A, Montoya A. **Anal. Chim. Acta**, 1995, *311*, 365.
76. Abad A, Moreno MJ, Montoya A. **Anal. Chim. Acta**, 1997, *347*, 103.
77. Jahn C, Schwack W. **J. Agric. Food Chem.** 2001, *49*, 1233.
78. Sardinha JP, Gil MH, Mercader JV, Montoya A. **J. Immunol. Met.** 2002, *260*, 173.
79. Nakata M, Fukushiman A, Ohkawa H. **Pest Manag. Sci.** 2001, *57*, 269.
80. Watanabe E, Watanabe S, Ito S, Hayashi M, Watanabe T, Yuasa Y. **J. Agric. Food Chem.** 2000, *48*, 5124.
81. Erlanger BF. **Methods Enzymol.** 1980, *70*, 85.
82. Manson MM. (Ed.), **Immunochemical protocols**, Humana Press, Totowa, New Jersey. 1992, 480.
83. Miles LE, Hayes CN. **Nature** 1968, *219*, 188.
84. Van Weeman BK, Schuur AH. **FEBS Lett.** 1974, *43*, 215.
85. Johannsson A. In: **Principles and practice of immunoassay**, C. P. Price, D. J. Newman (Eds.), Stockton Press, New York. 1991, 295.
86. Tijssen P. **Practice and Theory of Enzym Immunoassays**, Elsevier, Amsterdam. 1985.
87. Price CP, Newman DJ. In: **Principles and Practice of Immunoassays**, C. P. Price, D. J. Newman (Eds.), Stockton Press, New York. 1991, 78.
88. Gabaldón, J. A.; Maquieira, A.; Puchades, R. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.** 1999, *39*, 519.
89. Stevens, J. T.; Summer, D. D. Herbicides. In: **Handbook of Pesticide Toxicology**, vol. 3. Hayes, W. J.; Laws, E. R. (Eds.). Academic Press, New York, 1991, p. 1.
90. Fischer-Durand N, Vessières A, Heldt, J.-M, Le Bideau F, Jaouen G. **J. Organom. Chem.** 2003, *668*, 59.
91. Bruun L, Koch C, Jakobsen MH, Pedersen B, Christiansen M, Aamand J. **Anal. Chim. Acta** 2001, *436*, 87.
92. Bruun L, Koch C, Jakobsen MH, Aamand J. **Anal. Chim. Acta** 2000, *423*, 205.
93. Stöcklein WFM, Rohde M, Scharte G, Behrsing O, Warsinke A, Micheel B, Scheller FW. **Anal. Chim. Acta** 2000, *405*, 255.
94. Samsonova JV, Rubtsova MY, Kiseleva AV, Ezhov AA, Egorov AM. **Bios. Bioelectron.** 1999, *14*, 273.
95. Keay RW, McNeil CJ. **Bios. Bioelectron.** 1998, *13*, 963.
96. Kim SY, Jo Y, Choi J, Choi MJ. **Microchem. J.** 2001, *68*, 163.
97. Starodub NF, Dzantiev BB, Starodub VM, Zherdev AV. **Anal. Chim. Acta** 2000, *424*, 37.
98. Yakovleva J, Zherdev AV, Popova VA, Eremin AS, Dzantiev BB. **Anal. Chim. Acta** 2003, *491*, 1.
99. Gabaldón JÁ, Cascales JM, Maquieira A, Puchades R. **J. Chromatogr.** 2002, *963*, 125.
100. Striley CAF, Biagini RE, Mastin JP, MacKenzie BA, Robertson SK. **Anal. Chim. Acta** 1999, *399*, 109.
101. U.S. Environmental Protection Agency. *Review of Existing Immunoassays Kits for Screening of Acetochlor and Other Acetanilides in Water. Acetochlor Registration Partnership*, US-EPA, Delaware, 1995. 11 p.
102. Lyubimov AV, Garry VF, Carlson RE, Barr DB. **J. Lab. Clin. Med.** 2000, *136*, 116.
103. Kohli JD, Khanna RN, Gupta B. N. Shar MM, Tandon JS, Sircar KP. **Xenobiotica** 1974, *4*, 97.
104. Sauerhoff MW, Braun WH, Blau GE, Gehring PJ. **Toxicology** 1997, *8*, 3.
105. Lerda D, Rizzi R. **Mutant Res.** 1991, *262*, 47.
106. Smith JG, Christophers AJ. **Br J. Cancer** 1992, *65*, 442.
107. Hill RH, Head SL, Baker S, Gregg M, Shealy DB, Bailey SL. **Environ. Res.** 1995, *71*, 99.
108. Knopp D, Nuhn P. **Arch. Toxicol.** 1985, *58*, 27.
109. Ar buckle TE, Scharader SM, Cole D, Hall JC, Bancej CM, Turner LA, Claman P. **Reprod. Toxicol.** 1999, *13*, 421.
110. Bruun L, Koch C, Pedersen B, Jakobsen MH, Aamand J. **J. Immunol. Met.** 2000, *240*, 133.
111. Hegedüs G, Bélai I, Székács A. **Anal. Chim. Acta** 2000, *421*, 121.
112. Anfossi L, Giraudi G, Tozzi C, Giovannoli C, Baggiani C, Vanni A. **Anal. Chim. Acta** 2004 (*in press*).
113. Eremenko AV, Bauer CG, Makover A, Kanne B, Baumgarten H, Scheller FW. **Anal. Chim. Acta** 1998, *358*, 5.
114. Botchkareva AE, Fini F, Eremin SA, Mercader JV, Montoya A, Girotti S. **Anal. Chim. Acta** 2002, *453*, 43.
115. Botchkareva AE, Eremin SA, Montoya A, Manclús JJ, Mickova B, Rauch P, Fini F, Girotti S. **J. Immunol. Met.** 2003, *283*, 45.
116. Mickova B, Zrostlikova J, Hajslova J, Rauch P, Moreno MJ, Abad A, Montoya A. **Anal. Chim. Acta** 2003, *495*, 123.
117. Nunes GS, Barceló D. **Trends Anal. Chem.** 1999, *18*, 99.
118. Nunes GS, Marco M.-P, Farré M, Barceló D. **Anal. Chim. Acta** 1999, *387*, 245.
119. Nunes GS, Marco M.-P, Ribeiro ML, Barceló D. **J. Chromatogr.** 1998, *823*, 109.
120. Kim YJ, Cho YA, Lee H.-S, Lee YT. **Anal. Chim. Acta** 2003, *494*, 29.

121. Kim YJ, Cho YA, Lee H.-S, Lee YT, Gee SJ, Hammock BD. **Anal. Chim. Acta** 2003, 475, 85.
122. Zaruk D, Comba M, Struger J, Young S. **Anal. Chim. Acta** 2001, 444, 163.
123. EXTOTOXNET, Oregon State University, USDA, National Agricultural Pesticide Impact Program, 1996. home page: [ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/diazinon.htm](http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/diazinon.htm).
124. Zaruk D, Cancilla D, Crosbie B, Chow-Frazer P. *Immunoassays at the National Laboratory for Environmental Testing: A Canadian Perspective*. In: **Proceedings of the Immunochemistry**, Summit V, First national Convention, Las Vegas, NV, 1996.
125. Beasley HL, Skerritt JH, Hill AS, Desmarchelier JM. **J. Stor. Prod. Res.** 1993, 29, 357.
126. Watanabe T, Shan G, Stoutamire DW, Gee SJ, Hammock BD. **Anal. Chim. Acta**, 2001, 444, 119.
127. Kim HJ, Shelver WL, Li QX. **Anal. Chim. Acta**, 2004 (*in press*).
128. Watanabe S, Ito S, Kamata Y, Omoda N, Yamazaki T, Munakata H, Kaneko T, Yuasa Y. **Anal. Chim. Acta** 2001, 427, 211.
129. Székács A, Le HTM, Szurdoki F, Hammock BD. **Anal. Chim. Acta** 2003, 487, 15.
130. Giovannoli C, Giraudi G, Baghiani C, Tozzi C, Anfossi L, Dolci M. **Anal. Chim. Acta** 2003, 478, 271.
131. Wang S, Hill AS, Kennedy IR. **Anal. Chim. Acta** 2002, 468, 209.
132. Fernandez-Alba AR, Valverde A, Agüera A, Contreras M, Rodriguez D. **Anal. Chim. Acta** 1995, 311, 371.
133. Nunes GS, Toscano IA, Barceló D. **Trends Anal. Chem.** 1998, 17, 79.
134. Eremin AS, Ryabova IA, Yakovleva JN, Yazynina EV, Zherdev AV, Dzantiev BB. **Anal. Chim. Acta** 2002, 468, 229.
135. Bjarnason B, Chimuka L, Önnertjord P, Eremin S, Jönsson, J.-A, Johansson G, Emnéus J. **Anal. Chim. Acta** 2001, 426, 197.
136. Fránek M, Deng A, Kolar V. **Anal. Chim. Acta** 2000, 412, 19.
137. Gonzalez-Martínez MA, Puchades R, Maquieira A. **Trends Anal. Chem.** 1999, 18, 204.
138. Chiang JC, Van Emon JM, Chou Y.-L, Junod N, Finegold JK, Wilson NK. **Anal. Chim. Acta**, 2003, 486, 31.
139. Mosiello L, Laconi C, Del Gallo M, Ercole C, Lepidi A. **Sensors. Actuators B** 2003, 95, 315.
140. Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, Gauglitz G, Barcelo D. **Anal. Chim. Acta** 2001, 426, 209.
141. Dzantiev BB, Yazynina EV, Zherdev AV, Plekhanova YU, Reshetilov AN, Chang S.-C, McNeil CJ. **Sensors. Actuators B** 2004 (*in press*).

# Nova Ética, qualidade que você precisa.

Freezer -20° C  
modelo 415D

Durômetro de Comprimidos com  
Medidor de Espessura e Diâmetro  
modelo 298-ED



Estufa para  
Esterilização  
modelo 400D



Nova Ética  
Rua Francisca Manoel Oliveira, 500  
06730-000 - Vargem Grande Paulista - SP

Tel.: (11) 4158-2525  
e-mail: [novaetica@novaetica.com.br](mailto:novaetica@novaetica.com.br)  
[www.novaetica.com.br](http://www.novaetica.com.br)



**Nova Ética**  
Qualidade e Precisão no seu Laboratório