

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 09/03/2020.

Núbia Fernanda Marinho Rodrigues

**Desenvolvimento de sensor bioinspirado em
hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para
detecção de pesticidas.**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

R696d Rodrigues, Núbia Fernanda Marinho
Desenvolvimento de sensor bioinspirado em
hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para detecção
de pesticidas / Núbia Fernanda Marinho Rodrigues. –
Araraquara : [s.n.], 2018
121 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Hideko Yamanaka

Coorientador: Flávio Santos Damos

1. Pesticidas. 2. Eletroquímica. 3. Nanopartículas.
4. Materiais biomiméticos. 5. Inibidores de colinesterase.
I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de sensor bioinspirado em hexapeptídeo de enzimas acetilcolinesterase para detecção de pesticidas"

AUTORA: NÚBIA FERNANDA MARINHO RODRIGUES

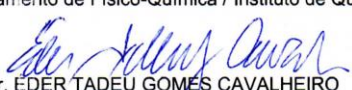
ORIENTADORA: HIDEKO YAMANAKA

COORIENTADOR: FLÁVIO SANTOS DAMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.ª. Dr.ª HIDEKO YAMANAKA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. CECILIO SADAO FUGIVARA
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. EDER TADEU GOMES CAVALHEIRO
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos


Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP - Botucatu


Profa. Dra. SILVIA HELENA PIRES SERRANO
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química - USP - São Paulo

Araraquara, 09 de março de 2018

Em especial...

À minha mãe Júlia, por sua dedicação, amor e sacrifícios feitos por mim.

À minha querida avó Maria, por sua presença constante.

Ao meu esposo Jimmy pelo apoio, carinho e por estar sempre ao meu lado.

À minha eterna e amada irmã Shirley (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida, dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria. A Ele toda honra e toda glória, pois todas as conquistas e vitórias alcançadas em minha de vida é para glorificar seu nome.

À minha família, em especial a minha avó Maria, minha mãe Júlia e minha irmã Shirley (in memoriam) pelo apoio incondicional, companheirismo, amor e dedicação.

Às minhas tias Paixão, Luzanira, Vitória e Lourdes pela compreensão, incentivo e apoio em todas as etapas de minha formação pessoal e profissional, contribuindo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu amigo, companheiro e esposo, Jimmy, por sua paciência, carinho, incentivo, dedicação e amor.

À Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka, pela confiança depositada, pela amizade, apoio, incentivo, ensinamentos, dedicação, compreensão e orientação enriquecedora durante todas as etapas deste trabalho. Sou extremamente grata.

Ao Laboratório de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos (LabS) na Universidade Federal do Maranhão / UFMA, em nome do Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela co-orientação, colaboração, ensinamentos e realização de parte deste trabalho. À Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Silva Luz pelos ensinamentos. E aos integrantes do grupo pela imensa ajuda, amizade.

À Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin Zanoni, Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto por todo auxílio e ensinamentos.

À Universidade Federal do Maranhão - UFMA/Campus de Pinheiro pelo afastamento necessário para à realização deste trabalho.

Às minhas amigas Geyse Adriana, Paulina Carvalho e Thatyara Masen que sempre tiveram as palavras certas para os momentos difíceis. Agradeço a Deus todos os dias por colocar pessoas como vocês em meu caminho. Obrigada pelo apoio, dedicação e amizade.

Em especial à Bárbara Camila, Lucas Silva e Rafael Fonseca pelo companheirismo, amizade, momento de descontração e principalmente pelo auxílio durante esses anos no laboratório.

Aos meus eternos amigos do grupo de pesquisa GEAr, João Ângelo, Lilian, Juliana, Rafael Pupin, Alysson, Juliano, Mariana, Sabir, Tamires, Marina, Felipe, Lívia, Bruna, Kallyni e Zé Luís pela amizade e momentos de descontração na hora do cafezinho. Conviver com vocês foi maravilhoso e onde quer que eu vá vou levar vocês no coração.

Ao Instituto de Química da UNESP pela infraestrutura e acolhida durante esses anos.

Jesus, obrigada por tudo!

RESUMO

Os pesticidas estão entre os poluentes mais preocupantes, devido à toxicidade e presença significativa no ambiente. A sua toxicidade é baseada na capacidade de inibir irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE) que é chave na transmissão de impulsos nervosos. Este trabalho descreve o desenvolvimento de sensor contendo hexapeptídeo, bioinspirado em enzima acetilcolinesterase, para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos. A sequência peptídica (NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-) foi imobilizada sobre nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) previamente sintetizadas, modificadas com quitosana e posteriormente funcionalizadas com 1,12-diaminododecano. As condições experimentais de imobilização do peptídeo foram otimizadas, sendo estas: concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de incubação de 30 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O grupo carboxílico presente na sequência peptídica foi ativado com o uso de agentes de acoplamento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidróxisuccinimida (NHS). A razão de concentração otimizada de EDC/NHS foi de 18,6/12,5 mmol L^{-1} , respectivamente, e tempo de ativação de 60 minutos. O sinal eletroquímico do peptídeo foi monitorado pelo pico de oxidação da histidina, cujo valor é diminuído ao interagir com o pesticida. O perclorato de sódio (NaClO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5 foi selecionado como eletrólito suporte. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada foram otimizados (frequência de 100 Hz, amplitude de 90 mV e incremento de varredura de 6 mV) utilizando uma matriz de planejamento fatorial. O tempo de pré-concentração do peptídeo com o pesticida foi fixado em 5 minutos. O sensor apresentou resposta linear nas faixas de concentração estudadas, com limites de detecção de $6,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para carbofurano e clorpirifós, respectivamente. O armazenamento na geladeira a $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ possibilitou 85% de estabilidade do peptídeo imobilizado após um período de 60 dias. O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais de batata e tomate, sendo obtido um percentual de recuperação no intervalo de 95 a 100%. O método cromatográfico de análise (HPLC/UV) apresentou intervalo linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para carbofurano e de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para clorpirifós, com recuperação de 95 a 105%. O sensor bioinspirado, permitiu o desenvolvimento de metodologia analítica alternativa para detecção de pesticida, mostrando-se promissor e com viabilidade de substituição de métodos cromatográficos utilizados para determinação de pesticidas em amostras de alimentos.

Palavras-chave: pesticidas, sensor bioinspirado, acetilcolinesterase, eletroanalítica, nanopartículas magnéticas.

ABSTRACT

Pesticides are among the most worrying pollutants due to toxicity and significant presence in the environment. Its toxicity is based on the ability to irreversibly inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) which is key in the transmission of nerve impulses. This work describes the development of a sensor containing hexapeptide, bioinspiring enzyme acetylcholinesterase, for the detection of organophosphorus pesticides and carbamates. The peptide sequence (NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-) was immobilized on previously synthesized magnetic nanoparticles (Fe_3O_4), modified with chitosan and subsequently functionalized with 1,12 - diaminododecane. The experimental conditions of immobilization of the peptide were optimized, being: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ concentration and incubation time of 30 minutes at 25°C . The carboxyl group present in the peptide sequence was activated with the use of 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) coupling agents. The optimum concentration ratio of EDC / NHS was $18.6 / 12.5 \text{ mmol L}^{-1}$, respectively, and activation time of 60 minutes. The electrochemical signal of the peptide was monitored by the histidine oxidation peak, whose value is decreased when interacting with the pesticide. Sodium perchlorate (NaClO_4) 0.1 mol L^{-1} pH 7.5 was selected as supporting electrolyte. The parameters of the square wave voltammetry were optimized (frequency of 100 Hz, amplitude of 90 mV and increment of sweep of 6 mV) using a matrix of factorial planning. The preconcentration time of the peptide with the pesticide was fixed in 5 minutes. The sensor presented linear response in the studied concentration ranges, with detection limits of $6.0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ and $4.0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ for carbofuran and chlorpyrifos, respectively. The storage in the refrigerator at $\pm 4^\circ\text{C}$ allowed 85% stability of the immobilized peptide after a period of 60 days. The developed method was applied in real samples of potato and tomato, obtaining a percentage of recovery in the range of 95 to 100%. The chromatographic (HPLC/UV) analysis showed a linear range of 1.0×10^{-6} to $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for carbofuran and 5.0×10^{-6} to $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for chlorpyrifos, with recovery of 95 to 105%. The bio-inspired sensor allowed the development of an alternative analytical methodology for pesticide detection, showing promise and feasibility of replacement of chromatographic methods used to determine pesticides in food samples.

Keywords: pesticides, bioinspired sensor, acetylcholinesterase, electroanalytical, magnetic nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo clássico de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforado.	25
Figura 2: Mecanismo de ação da pralidoxima na reativação da AChE.	26
Figura 3: Fórmula estrutural do pesticida carbofurano.	27
Figura 4: Fórmula estrutural do pesticida clorpirifós.	28
Figura 5: Em (A) síntese e (B) hidrólise da acetilcolina.	30
Figura 6: Estrutura tridimensional da AChE obtida de <i>Torpedo californica</i> . A estrutura é apresentada como um diagrama de fita, com N-terminal no canto inferior esquerdo, e C-terminal no canto superior direito. A entrada do sitio ativo está no topo, com superfície.	31
Figura 7: Esquema do eletrodo de trabalho utilizado nas medidas.	39
Figura 8: Modificação das partículas de magnetita com quitosana.	41
Figura 9: Fluxograma representativo das etapas do método QuEChERS original (A) e adaptado neste estudo (B).	52
Figura 10: Fotos das magnetitas sintetizadas na ausência e presença de um campo magnético (ímã).	54
Figura 11: Espectro de FTIR das partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ (—) e Fe ₃ O ₄ /CS (—).	55
Figura 12: Espectro de FTIR das partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ /CS (—), Fe ₃ O ₄ /CS-DADD (—) e após imobilização da sequência peptídica (Fe ₃ O ₄ /CS-DADD-PEP) (—).	57

Figura 13: Imagens de SEM-FEG das partículas magnéticas com magnificação de 100.000 e 150.000X respectivamente.	58
Figura 14: Imagens de MET das partículas de Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ /CS e Fe ₃ O ₄ /CS-DADD com ampliação de 50 e 20 nm respectivamente.	60
Figura 15: Histograma obtido pela contagem das partículas de (A) Fe ₃ O ₄ , (B) Fe ₃ O ₄ /CS e (C) Fe ₃ O ₄ /CS-DADD, respectivamente.	61
Figura 16: Curvas de TG para Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ /CS e Fe ₃ O ₄ /CS-DADD.	63
Figura 17: Curvas de TG e DTA para (A) Fe ₃ O ₄ , (B) Fe ₃ O ₄ /CS e (C) Fe ₃ O ₄ /CS- DADD.	64
Figura 18: Difratoograma obtido para: (A) Fe ₃ O ₄ , (B) Fe ₃ O ₄ /CS-DADD-PEP e (C) Fe ₃ O ₄ /CS-DAD-PEP após oxidação do material na superfície do eletrodo.	66
Figura 19: Difratoograma da magnetita obtido na Base de Dados de Estruturas Cristalinas.	66
Figura 20: Estrutura química da sequência peptídica (SEQPEP1).	67
Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos para a solução de NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 (—) e na mesma solução de eletrólito contendo 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de SEQPEP1 (—). Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	68
Figura 22: Voltamograma de onda quadrada obtido para a SEQPEP1 em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV. Ajuste da linha de base dos voltamogramas pelo software NOVA 2.1.	69
Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,5. Parâmetros utilizados: f = 100 Hz, a = 90 mV, ΔEs = 6 mV. ET = carbono vítreo modificado com nanopartículas magnéticas conforme inserido na figura. (B) Voltamograma de pulso diferencial em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: a= 50 mV, v= 5 mV s ⁻¹ e intervalo de pulso 70 ms. P ₁ (primeiro pico) e P ₂ (segundo pico).	70

Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada para eletrodo de carbono vítreo em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Peptídeo imobilizado na superfície das partículas carboxiladas e funcionalizadas com quitosana. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV.....	71
Figura 25: Estrutura química da sequência peptídica (SEQPEP2).....	72
Figura 26: Voltamograma de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. SEQPEP2 imobilizado na superfície das partículas magnéticas carboxiladas. Concentração do peptídeo 5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV.....	72
Figura 27: Esquema da modificação da NPs com DADD (A e B) e da reação de ativação da SEQPEP1 com EDC/NHS e imobilização do peptídeo sobre as NPs- DADD (C).....	73
Figura 28: Voltamogramas de onda para eletrodo de carbono vítreo em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 na ausência e presença do peptídeo imobilizado na superfície das NPs-COOH-DADD e NPs/CS-DADD. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV.....	74
Figura 29: Esquema reacional do EDC com NHS entre o suporte e a biomolécula.	75
Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Efeito das concentrações EDC/NHS na ativação de PEP para imobilização sobre NPs/CS-DADD. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs= 5 mV. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.....	76
Figura 31: Correntes de pico de oxidação vs concentração da solução de DADD (mmol L ⁻¹). E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP. Inset: voltamograma de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV.....	77

Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada em diferentes eletrólitos, na concentração de 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.	78
Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada da solução de NaClO ₄ em pH 7,0 em diferentes concentrações do eletrólito. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.	79
Figura 34: Efeito do pH do eletrólito NaClO ₄ e potencial de pico de oxidação do peptídeo imobilizado sobre nanopartículas magnéticas.	80
Figura 35: Gráfico da corrente de pico de oxidação vs volume de solução contendo as NPs com peptídeo imobilizado. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP. Inset: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV.	81
Figura 36: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,5. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV. Inset: Gráfico da corrente de pico de oxidação vs tempo de contato das NPs com DADD. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS.	82
Figura 37: Voltamogramas de onda quadrada em meio de NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,5. Efeito do tempo de ativação do PEP. Parâmetros utilizados: f = 25 Hz, a = 20 mV, ΔEs = 5 mV. E _T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.	83
Figura 38: Gráfico de Pareto: influência das variáveis na imobilização do peptídeo sobre as partículas magnéticas. Sendo A, a concentração do peptídeo ativado, B, o tempo de incubação e AB, influência das duas variáveis juntas.	85
Figura 39: Gráfico de tendência: intensidade de corrente para o nível máximo e mínimo de cada variável.	86
Figura 40: Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial completo para três variáveis: frequência (Hz), amplitude de pulso (mV) e incremento de varredura (mV).	88

Figura 41: Gráfico de tendência: intensidade de corrente para o nível máximo e mínimo de cada variável.	89
Figura 42: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s ⁻¹) para o eletrodo de trabalho sem modificação e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I _{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (v ^{1/2}).....	90
Figura 43: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s ⁻¹) para o eletrodo de trabalho modificado com NPs/CS-DADD-PEP e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I _{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (v ^{1/2}).	90
Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada em meio de NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 da hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: f = 70 Hz, a = 50 mV e ΔEs = 2 mV. E _T = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura.....	92
Figura 45: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em meio de NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0. Reação de hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: f = 70 Hz, a = 50 mV e ΔEs = 2 mV. E _T = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura	93
Figura 46: Gráfico da intensidade de corrente em função do tempo de incubação do pesticida, em (A) carbofurano e (B) clorpirifós. Ambos na concentração de 2,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do tempo de pré-concentração.	94
Figura 47: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do peptídeo com o pesticida (—) em meio de ferri/ferro 5,0 mmol L ⁻¹ vs Ag AgCl KCl _{sat} no intervalo de potencial de -0,2 a +1,3 V com v = 50 mV s ⁻¹	95
Figura 48: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do	

peptídeo com o pesticida (—) em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs $\text{Ag|AgCl|KCl}_{\text{sat}}$ no intervalo de potencial de $-0,2$ a $+1,3 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 96

Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada da sequência peptídica imobilizada sobre NPs/CS-DADD em meio a NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ e em pH 7,5 com a separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante. 97

Figura 50: Voltamogramas de onda quadrada em meio a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 na presença de diferentes concentrações do pesticida carbofurano em solução. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. $E_T =$ carbono vítreo modificado com peptídeo. 98

Figura 51: Voltamogramas de onda quadrada em meio a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 na presença de diferentes concentrações do pesticida clorpirifós em solução. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. $E_T =$ carbono vítreo modificado com peptídeo. 98

Figura 52: Curva analítica do percentual de inibição em função do log da concentração do pesticida carbofurano. Faixa de trabalho de $0,10$ a $5,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Inset: Gráfico do percentual de inibição em função da concentração em nmol L^{-1} . 99

Figura 53: Curva analítica do percentual de inibição em função da concentração do pesticida clorpirifós. Faixa de trabalho de $1,0$ a 10 nmol L^{-1} 99

Figura 54: Fórmula estrutural dos pesticidas utilizados no teste de seletividade do sensor. 101

Figura 55: Histograma da intensidade de corrente do peptídeo imobilizado sobre NPs/CS-DADD estocado durante alguns dias na geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 103

Figura 56: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP em meio a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 para as amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida carbofurano $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ 104

Figura 57: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP em meio a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 para as amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida clorpirifós $6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ 105

Figura 58: Cromatogramas do pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B). Condições de análises: acetonitrila/água deionizada na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm 106

Figura 59: Curva analítica obtida para o pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B) empregando HPLC/UV, fase móvel acetonitrila/água 70:30 (v/v) e comprimento de onda de 230 nm 107

Figura 60: Cromatogramas obtidos por HPLC/UV das amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida carbofurano $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Condições de análise: acetonitrila/água na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm 107

Figura 61: Cromatogramas obtidos por HPLC/UV das amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida clorpirifós $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Condições de análise: acetonitrila/água na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos reagentes utilizados nesse trabalho.....	38
Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis, dois níveis e um ponto central.	46
Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis, dois níveis e um ponto central.	46
Tabela 4: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas magnetitas e magnetitas revestidas com quitosana.	56
Tabela 5: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas de magnetitas e magnetitas modificadas.	57
Tabela 6: Dados da isoterma de adsorção (BET) obtidos para as nanopartículas de Fe_3O_4 , Fe_3O_4/CS e $Fe_3O_4/CS-DADD$	62
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa Minitab® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).	84
Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa Minitab® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a otimização da SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).	87
Tabela 9: Dados obtidos a partir da curva analítica do pesticida carbofurano e clorpirifós.	100
Tabela 10: Avaliação da seletividade do sensor bioinspirado desenvolvido.	102
Tabela 11: Percentual de recuperação do pesticida carbofurano e clorpirifós em amostra de tomate e batata. Medida realizada em triplicata.....	105

Tabela 12: Comparação dos percentuais de recuperação obtidos por HPLC/UV e pelo método eletroquímico na determinação dos pesticidas carbofurano e clorpirifós em amostra de tomate e batata. Medida realizada em triplicata..... 109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ Es: Incremento de varredura

a: Amplitude de pulso

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

Ala: Alanina

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

Arg: Arginina

ATCh: Acetiltiocolina

ATChI: Iodeto de acetiltiocolina

BET: Isotermas Brunauer, Emmett e Taller

BR: Solução tampão Britton-Robinson

CS: Quitosana

DADD: 1,12-diaminododecano

DRX: Difração de raio X

DTA: Análise Térmica Diferencial

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

f: Frequência

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

His: Histidina

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD: Limite Detecção

LMR: Limite Máximo de Resíduos

LQ: Limite de Quantificação

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

SEM-FEG: Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução

NHS: N-hidróxisuccinimida

NPs: Nanopartículas magnéticas

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBS: Solução tampão fosfato

PEP: Peptídeo

Pro: Prolina

QuEChERS: Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe

SEQPEP1: Sequência peptídica 1

SEQPEP2: Sequência peptídica 2

Ser: Serina

TGA: Análise Termogravimétrica

Trp: Triptofano

CV: Voltametria Cíclica

SWV: Voltametria de Onda Quadrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Pesticidas utilizados neste trabalho	27
1.1.1	Carbofurano	27
1.1.2	Clorpirifós	28
1.2	A Enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	29
1.3	Sensores bioinspirados	32
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	Reagentes e Soluções	38
3.2	Equipamentos	39
3.3	Síntese das partículas magnéticas.....	40
3.4	Modificação da superfície das partículas de Fe ₃ O ₄ com Quitosana (CS)...	41
3.5	Imobilização do peptídeo sobre as nanopartículas magnéticas (NPs)	42
3.6	Otimização dos Parâmetros Experimentais.....	43
3.6.1	Otimização da concentração de EDC/NHS.....	43
3.6.2	Otimização da concentração 12-diaminododecano (DADD) sobre NPs/CS	43
3.6.3	Escolha do eletrólito suporte.....	44
3.6.4	Otimização do volume de NPs sobre a superfície do eletrodo	44
3.6.5	Otimização do tempo de reação do DADD com as NPs/CS	44
3.6.6	Estudo do pH e concentração do eletrólito	45
3.6.7	Tempo de ativação do peptídeo com EDC/NHS	45
3.6.8	Efeito da concentração do peptídeo ativado e tempo de incubação com as NPs/CS-DADD.....	45
3.7	Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	46
3.8	Determinação da área eletroativa do eletrodo de trabalho	47

3.9	Avaliação da sequência peptídica na catálise da acetilcolina	47
3.10	Determinação do tempo de incubação do pesticida	48
3.11	Construção da curva analítica para os pesticidas em estudo	48
3.12	Seletividade do sensor bioinspirado	49
3.13	Aplicação do sensor em amostras de tomate e batata	50
3.13.1	Análise de pesticida nas amostras de tomate e batata por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	50
3.14	Estabilidade do sensor bioinspirado	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	55
4.2	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução	58
4.3	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	59
4.4	Análise pelo método de BET	62
4.5	Termogravimetria	63
4.6	Difração de raios X	65
4.7	Resposta eletroquímica da sequência peptídica em solução	67
4.8	Imobilização do peptídeo sobre partículas magnéticas de ferro	70
4.9	Otimização dos Parâmetros Experimentais	74
4.9.1	Concentração de EDC/NHS	74
4.9.2	Otimização da concentração de DADD	76
4.9.3	Avaliação do eletrólito suporte e estudo de pH do meio	77
4.9.4	Influência da quantidade de NPs/CS-DADD-PEP sobre a superfície do eletrodo e tempo de reação do DADD com as NPs/CS.	80
4.9.5	Tempo de ativação do peptídeo com EDC/NHS	82
4.9.6	Efeito da concentração do peptídeo ativado e tempo de contato com as NPs.	83
4.9.7	Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada (SWV)	86

4.10	Determinação da superfície eletroativa do eletrodo de trabalho	89
4.11	Avaliação da sequência peptídica na catálise de acetilcolina	91
4.12	Estudo do tempo de incubação do pesticida sobre o sensor bioinspirado .	93
4.13	Componentes de corrente	96
4.14	Curva analítica para o pesticida Carbofurano e Clorpirifós	97
4.15	Estudo de seletividade do sensor	100
4.16	Estudo da estabilidade do peptídeo imobilizado em NPs/CS-DADD.	102
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1 INTRODUÇÃO

A agricultura, nos últimos anos, em virtude da crescente demanda por alimentos, induziu uma busca por meios de produção mais eficientes. Com o intuito de melhorar e aumentar sua produtividade, passou a utilizar métodos artificiais, como os fertilizantes e pesticidas químicos, manipulação genética, irrigação e hormônios para acelerar o crescimento de animais e vegetais. Dentre esses métodos artificiais, o uso de pesticidas é a estratégia de gerenciamento de pragas e pestes (animais, insetos, fungos ou mesmo plantas), mais amplamente adotada para garantir o abastecimento de alimentos em todo o mundo (1–3).

Essas pragas são intensamente combatidas com os chamados “defensivos agrícolas”, também conhecidos como agrotóxicos ou pesticidas. Segundo Sousa et al.(4) os pesticidas ajudam a aumentar a produção e a qualidade de frutas e vegetais, controlando a propagação de pragas durante o crescimento. Entretanto, estes defensivos constituem uma das fontes de contaminação ambiental, o que pode acarretar em sérios riscos para a saúde humana, podendo causar alterações nos ecossistemas com consequências 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 (5,6).

Os agrotóxicos são classificados como pesticidas, herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, entre outros. Os pesticidas são substâncias químicas naturais ou sintéticas, destinadas a exterminar, controlar ou combater de algum modo pragas, ou seja, tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem (7,8). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (9), pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. São bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis, as quais, de alguma maneira, podem interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos e produtos agrícolas em geral. Esta definição também compreende substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou quaisquer agentes preventivos à ação de vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou animais domésticos como, por exemplo: febre amarela, doença de Chagas, malária, dengue, entre outras (10,11). Por essa razão, os países em

desenvolvimento são os maiores responsáveis pelo consumo de pesticidas do mercado mundial, entre os quais o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos. Enquanto nos últimos 10 anos o mercado mundial em relação a esse setor cresceu 93%, no Brasil, esse crescimento foi de 190% (12,13)

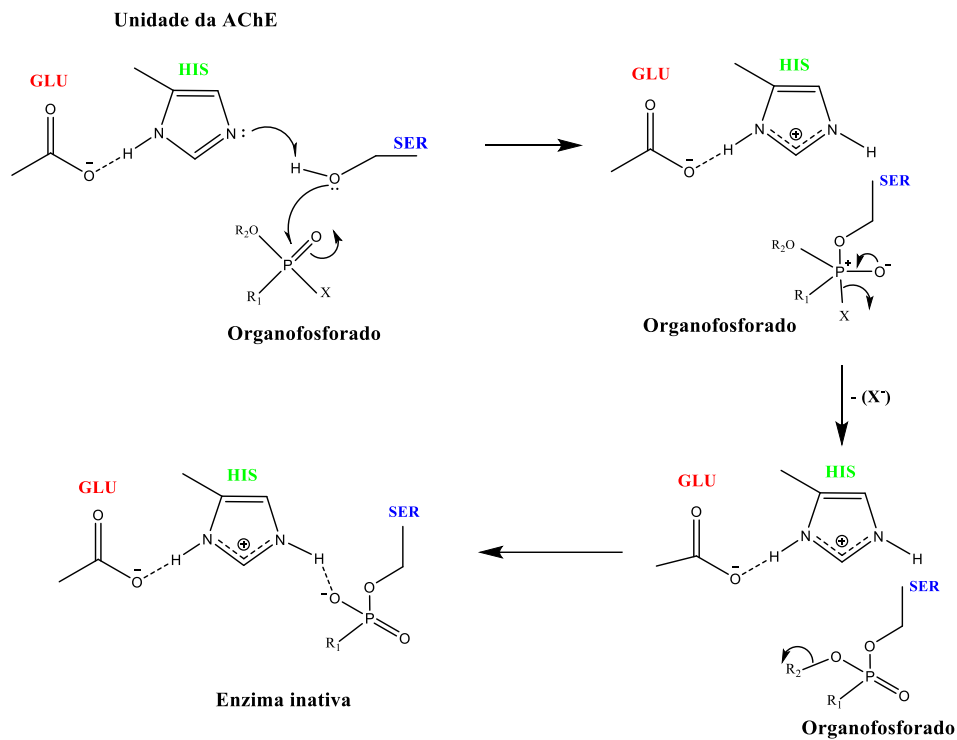
Inicialmente, os pesticidas organoclorados (como o benzeno hexaclorado, BHC, por exemplo) foram extensivamente utilizados, contudo, esses compostos são altamente tóxicos, além disso, são muito persistentes no meio ambiente, o que gerou bioacumulação de seus derivados em solos, mananciais e lençóis freáticos. Desse modo, os compostos hexaclorados foram proibidos e substituídos por outras classes de pesticidas, tais como organofosforados, carbamatos e piretróides (14,15).

Os organofosforados e carbamatos foram introduzidos mundialmente na década de 1950, como substituintes dos compostos organoclorados. Apesar de serem, de modo geral, mais tóxicos que os organoclorados, os organofosforados e carbamatos são extensamente usados na agricultura por causa de sua atividade inseticida e por apresentarem persistência relativamente baixa. Esses compostos podem ser degradados pela ação da luz, pelo O_2 do ar ou por reação com a água (16).

Os pesticidas da classe dos organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico; compreendem um grande número de compostos que variam largamente em polaridade e massa molar. Dentre os compostos mais tóxicos dessa classe estão o grupo dos nitrofosforados, tendo como maior representante o Paration e seus derivados como Metil Paration e Fenitrothion (17). Estes compostos apresentam toxicidade aguda para os insetos, bem como para o homem e demais mamíferos (18).

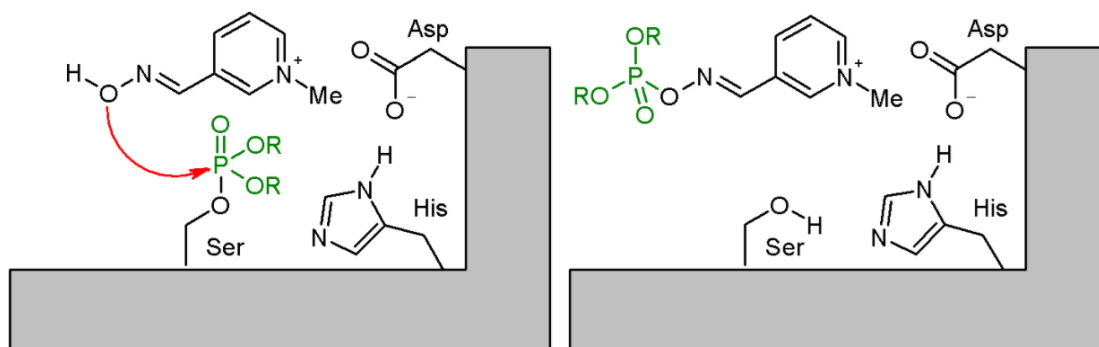
Os efeitos tóxicos dos compostos organofosforados e dos seus produtos de biodegradação estão diretamente relacionados aos processos de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) por esses compostos. Dessa forma a enzima perde sua atividade, deixando de atuar na hidrólise da acetilcolina, que é um neurotransmissor responsável pela transmissão de impulsos neuro-musculares. Como consequência, a intoxicação pode causar tremores, convulsões e até a morte, dependendo do grau de intoxicação (19). A Figura 1 mostra o esquema geral de inibição da AChE por pesticidas da classe dos organofosforado.

Figura 1: Mecanismo clássico de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforado.



Fonte: Adaptado de Santos et al (20)

Por outro lado, já existem substâncias com a finalidade de reverter a inibição da AChE por organofosforados. A pralidoxima pertence à família de compostos chamados de oximas, é muito utilizada em combate como antídoto para envenenamento por organofosforado ou inibidores da acetilcolinesterase (21–23). A pralidoxima reativa a AChE ao remover o grupo fosforil ligado ao grupo éster da proteína. Na verdade, acredita-se que o grupo hidroxila da oxima realiza um ataque nucleofílico sobre o resíduo de serina fosforilada, ou seja, a quebra da ligação fósforo-serina libera a molécula de oxima fosforilada, que após a dissociação regenera a enzima AChE na sua forma ativa (24,25). Nesta reação tanto os organofosforados como a pralidoxima são mutuamente inativados e submetidos a um rápido metabolismo, o que leva à remoção dos organofosforados. A Figura 2 mostra o mecanismo de ação da pralidoxima- desfosforilação da serina no sítio ativo da enzima.

Figura 2: Mecanismo de ação da pralidoxima na reativação da AChE.

Fonte: Adaptado de Gonsalves et al. (24)

Os compostos da classe dos carbamatos são derivados do ácido carbâmico e estão intimamente relacionados com os inseticidas organofosforados, quanto a ação biológica (inibem a colinesterase) e não são persistentes no meio ambiente. Os carbamatos são frequentemente utilizados no controle de insetos que, por alguma razão, são resistentes a compostos organofosforados. Dentre os diferentes tipos carbamatos, o grupo dos N-metilcarbamatos formam uma importante família de inseticidas, os quais, devido ao amplo espectro de atividade biológica são largamente aplicados no tratamento de sementes, solo e lavouras (26). O carbofurano e carbaril são dois N-metilcarbamatos amplamente utilizados em residências e agricultura (27).

Apesar do baixo potencial de bioacumulação (28) os carbamatos causam, além da inibição reversível da AChE, outros efeitos bioquímicos e farmacológicos, incluindo o decréscimo da atividade metabólica do fígado, alterações dos níveis de serotonina no sangue e um decréscimo da atividade da glândula tireóide (29,30).

Os organofosforados e carbamatos são atualmente os produtos mais usados na agricultura para uma diversidade de culturas. O uso indiscriminado destes compostos, torna necessário o desenvolvimento de metodologias para a quantificação e controle, de modo a minimizar os impactos ao meio ambiente e à saúde pública.

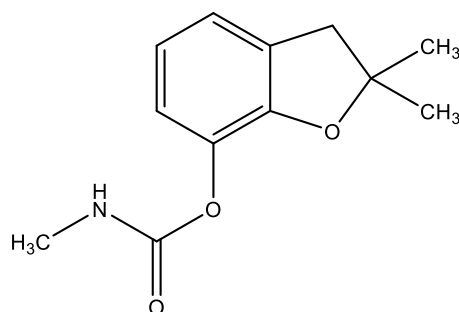
1.1 Pesticidas utilizados neste trabalho

Para o desenvolvimento do trabalho foram escolhidos os pesticidas carbofurano e clorpirifós devido sua aplicação em uma variedade de culturas, por serem extremamente tóxicos e apresentarem riscos à saúde humana e ao meio ambiente

1.1.1 Carbofurano

O carbofurano é quimicamente conhecido como (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-*N*-metil carbamato) é utilizado como inseticida, acaricida e nematicida. Sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 3. Este pesticida é utilizado em diversas culturas como: algodão, amendoim, arroz, milho, trigo, feijão, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, repolho e tomate, é um agrotóxico sistêmico, cuja absorção pelas plantas ocorre através das raízes e o distribui para todas as partes do vegetal. Instável em meio alcalino e estável em meio ácido, sua presença em alimentos tem recebido atenção mundial devido à sua solubilidade em água de 0,7 mg L⁻¹ a 25 °C (31,32).

Figura 3: Fórmula estrutural do pesticida carbofurano.



Fonte: autoria própria.

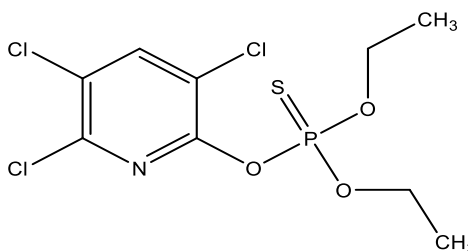
De acordo com a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) é um pesticida extremamente tóxico (classificação toxicológica I). A elevada toxicidade do carbofurano é bem conhecida, sendo reportado danos ao meio ambiente e a saúde humana, devido à sua capacidade embriotóxica, mutagênica e teratogênica (33). O

carbofurano apresenta curta persistência no ambiente, ou seja, possui meia-vida no solo de 30 a 60 dias e pequeno deslocamento em regiões adjacentes. Seu uso tem aumentado nos últimos anos, porque é um dos poucos inseticidas eficazes contra os pulgões de soja (32,34).

1.1.2 Clorpirifós

O pesticida clorpirifós é um dos principais pesticida organofosforados comercializados e atua como inseticida e acaricida. Conhecido como: O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridinil fosforotioato, é utilizado para diversas finalidades, como o controle de pragas de uma variedade de culturas alimentares e plantas ornamentais (35). A Figura 4 apresenta a fórmula estrutural do pesticida clorpirifós. Como um organofosforado, pode ser absorvido pelo organismo humano via pele, trato gastrointestinal, por vias respiratórias e membranas da mucosa (36). Já nos insetos age por contato, ingestão e fumigação (37).

Figura 4: Fórmula estrutural do pesticida clorpirifós.



Fonte: autoria própria.

Segundo a ANVISA é um pesticida moderadamente perigoso (classificação toxicológica II), com baixa solubilidade em água e alta taxa de absorção em solos. O clorpirifós é usado para aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate e trigo, aplicação localizada na cultura da banana para proteção do cacho e aplicação no solo nas culturas de batata e milho (38).

A maioria das metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de resíduos de pesticida é baseada em técnicas cromatográficas (39–46), cuja

sensibilidade é bastante elevada. Dependendo do tipo de substância a ser utilizada e o detector empregado, se pode obter concentrações que variam de μg a ng L^{-1} . No entanto, na maioria das vezes é necessária a realização de algumas etapas de preparação e pré-tratamento para remoção de interferentes da amostra. Esta etapa geralmente é longa e complexa, o que faz aumentar o tempo e o custo das análises, além do impacto ambiental devido ao uso de solventes (47).

Como alternativa, métodos de detecção com base no monitoramento de sinal eletroanalítico dos pesticidas têm sido empregados com resultados promissores (48–50). Os sensores eletroanalíticos demonstram ser uma alternativa viável na análise devido à rápida detecção, sensibilidade, alta especificidade e por apresentar muitas vezes simplicidade no desenvolvimento e custo reduzido (51). Porém, nem todos os pesticidas apresentam caráter eletroativo sob efeito de moderados valores de potencial elétrico, o que dificulta a análise direta dos mesmos eletroquimicamente. Assim, uma nova classe de eletrodos modificados tem se destacado nas últimas décadas, os denominados biossensores, que são dispositivos modificados com material biológico, nos quais o componente sensor passa responder a partir de uma reação biológica específica. Aliam-se a sensibilidade analítica com a seletividade biológica (52,53).

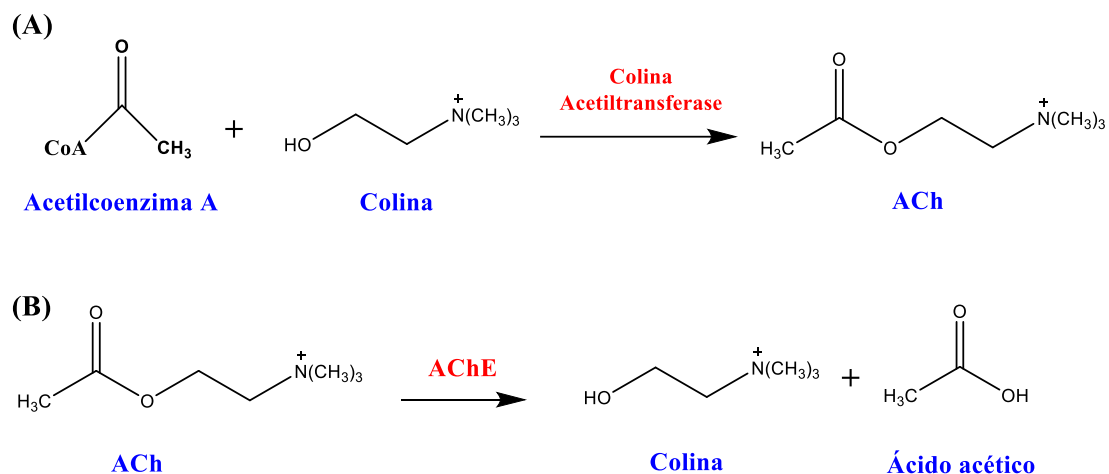
1.2 A Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas e estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua alta especificidade e poder catalítico (54). Dentre essas biomoléculas, a enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central, controlando impulsos e transmissão de estímulos nervosos (55).

Na fenda sináptica a AChE é responsável por degradar a ACh, uma molécula simples que possui um grupo éster e uma amina quaternária. No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Após sua formação (ACh), é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica, onde ela sofre hidrólise

catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina (56). A Figura 5 mostra a reação de síntese e hidrólise da ACh.

Figura 5: Em (A) síntese e (B) hidrólise da acetilcolina.



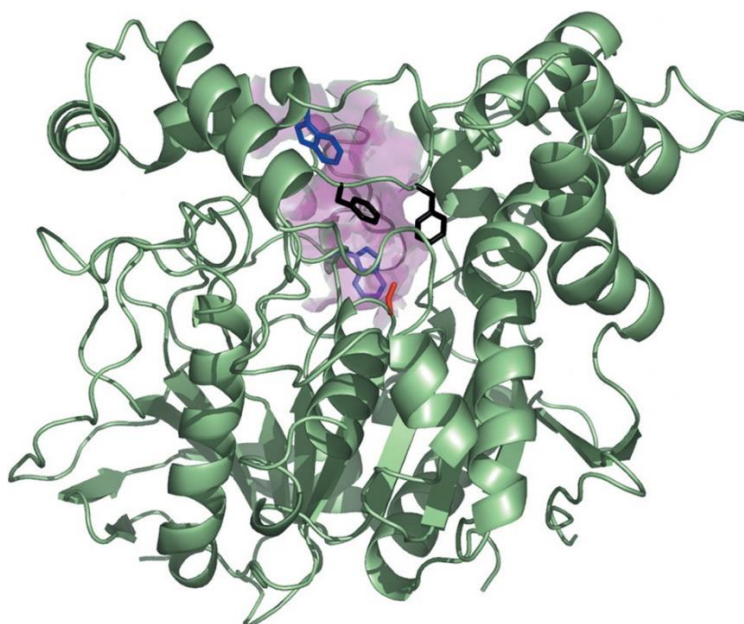
Fonte: Araújo et al.(57)

A AChE possui uma alta eficiência catalítica, com capacidade de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima, por minuto (58). O sítio ativo da AChE é constituído, entre outros, por três resíduos principais de aminoácidos, os quais estão envolvidos diretamente no processo de hidrólise da ACh, que são: a serina (Ser₂₀₀), a histidina (His₄₄₀) e o ácido glutâmico (Glu₃₂₇) (59). É composto também por dois subsítios, sendo um *esterásico* e outro de ligação de colina, que se ligam, respectivamente, ao grupo carbonílico e o amônio quaternário da ACh. O segundo sítio de ligação de colina, é chamado de *periférico*, por estar distante do sítio ativo (60). Neste último citado, existe uma região aniônica, que serve para interagir com a parte catiônica da ACh e que orienta este substrato para a posição necessária para sofrer o processo de hidrólise (61). Além do sítio “aniônico” catalítico, existe um segundo sítio aniônico, conhecido como sítio “aniônico” periférico. Este sítio, identificado com base na ligação de compostos bis-quaternários, pode estar envolvido na ação de inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato (58,62).

As propriedades bioquímicas únicas e a significância fisiológica da AChE fazem dela um alvo interessante para detalhada análise da função estrutural. As

sequências codificadas da AChE foram clonadas de uma variedade de espécies que incluem insetos, nematóides, peixes, répteis, aves e vários mamíferos, entre eles o homem. A Figura 6 apresenta o primeiro modelo cristalográfico da AChE de *Torpedo californica*, a qual permitiu a visualização, pela primeira vez à uma resolução atômica, de uma cavidade de ligação para a acetilcolina (63).

Figura 6: Estrutura tridimensional da AChE obtida de *Torpedo californica*. A estrutura é apresentada como um diagrama de fita, com N-terminal no canto inferior esquerdo, e C-terminal no canto superior direito. A entrada do sitio ativo está no topo, com superfície.



Fonte: Silman e Sussman, (58)

A inibição da AChE causa um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, levando a uma hiperestimulação colinérgica. Os sintomas provenientes dessa intoxicação vão desde enjoos, náuseas ou fraqueza, considerados leves, até sintomas mais graves como cianose, convulsão, paralisia ou coma (64). Os efeitos tóxicos dos compostos organofosforados e/ou carbamatos e seus produtos de biodegradação estão diretamente relacionados aos processos de inibição da enzima AChE.

O monitoramento do substrato enzimático pode ser feito por catálise ou por inibição, e neste último o sinal eletroanalítico monitorado tem por base a diminuição da corrente elétrica do sistema devido a ação de algum agente inibidor sobre a

atividade catalítica da enzima. Entre estes, os mais citados na literatura são os biossensores de colinesterases, que fazem uso de enzima AChE imobilizadas sobre substratos eletródicos diversos. Conseqüentemente, os biossensores a base de AChE tem sido extensivamente empregados para detecção e quantificação de pesticidas (65–67). Estes biossensores fazem uso do princípio da ligação entre os pesticidas e o sítio catalítico da enzima, o que diminui a taxa de formação de produto, conseqüentemente, diminui o sinal monitorado.

Essa diminuição de sinal de corrente é proporcional à concentração do pesticida inibidor. Contudo, um dos maiores entraves ao emprego dos biossensores enzimáticos é baixa estabilidade enzimática para uso contínuo, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que pode ser contornada usando as condições adequadas de pH, temperatura e força iônica que garantam a manutenção da atividade enzimática. Outra desvantagem é o fato delas serem caras e, algumas reações enzimáticas, requererem co-fatores que, se não forem facilmente regenerados, encarecem mais ainda o uso dos biossensores enzimáticos (68,69), o que tem estimulado vários grupos de pesquisa a explorarem os sistemas bioinspirados.

1.3 Sensores bioinspirados

Os biossensores são dispositivos analíticos que utilizam reações biológicas para detecção de analito de interesse presente em uma amostra. Tais dispositivos combinam um componente de reconhecimento biológico que interage com um substrato alvo, a um transdutor físico-químico, o qual deve ser capaz de transformar a resposta biológica em um sinal elétrico mensurável (70–73). Quando o componente biológico é substituído por uma molécula sintética que apresente características de mimetizar estruturalmente ou funcionalmente um biorreceptor, o dispositivo desenvolvido pode ser então denominado de sensor bioinspirado (74).

Os sensores bioinspirados são uma nova estratégia experimental que tem sido usada para obter sensores mais estáveis e duradouros, quando comparados aos biossensores convencionais que possuem como base materiais biológicos. No que diz respeito aos biossensores enzimáticos, estes dispositivos têm como finalidade vencer suas limitações tais como disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas; assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre

eletrodo/sítio ativo (complexo redox) / substrato, desde que nos sensores bioinspirados o “sítio ativo” encontra-se descoberto, diferente do que acontece nas enzimas, onde o sítio ativo encontra-se rodeado pela densa camada de aminoácidos residuais (75–77).

O funcionamento destes sensores baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor de forma a provocar variação em alguma propriedade físico-química interfacial que é reconhecida e medida por um transdutor adequado, e, finalmente, ocorre a amplificação e o processamento do sinal correspondente à concentração do analito na amostra (78,79). Alguns destes sensores têm por base de construção uma avaliação do sistema a partir de modelagem molecular, ou seja, processo que trabalha com a comparação de diferentes estruturas moleculares para definição de índices de similaridade com uma reação biológica, estimando uma estrutura tridimensional do complexo ligante-receptor, satisfazendo as propriedades eletrônicas e estruturais dos mesmos a partir de conformações mais estáveis (47).

Uma condição para mimetizar ou escolher uma enzima adequada para a construção de sensores bioinspirados é que a química da catálise da reação enzimática e a estrutura do sítio ativo da enzima sejam muito bem estudados e conhecidos. Em geral, os imitadores de enzimas devem possuir estruturas menos complexas, massas molares mais baixas; maior estabilidade, especialmente em altas temperaturas e melhor solubilidade em uma ampla gama de solventes (77).

No que diz respeito à enzima AChE, dois critérios fundamentais devem ser cumpridos por moléculas semelhantes a AChE: (i) a capacidade de promover catálise na hidrólise de acetilcolina ou acetiltiocolina, substrato enzimático análogo e (ii) estabelecimento de interações com pesticidas organofosforados ou carbamatos (80). Esses requisitos acima mencionados são cruciais para imitar o desempenho da AChE no desenvolvimento de biossensores com foco na detecção de pesticidas.

A literatura relata alguns trabalhos nos quais moléculas biomiméticas têm a finalidade de substituir a enzima AChE, entretanto a maioria estão relacionados com a aplicação na indústria farmacêutica (77), onde a finalidade é substituir a AChE no organismo e transportar seu substrato (acetilcolina), entre outras moléculas de interesse para o tratamento de determinadas doenças.

Mascini et al. (81) selecionaram três sequências peptídicas (His-Glu-Pro-Ser, His-Gly-Ser-Ala e Glu-Pro-Ser-Ala), as quais foram projetadas com base na configuração do sítio ativo da AChE e análises computacionais; considerando os

aminoácidos que fazem parte da tríade catalítica (glutamato, histidina e serina). O objetivo principal do estudo foi imitar o sítio ativo da AChE, com a afinidade de se ligar com pesticidas organofosforados e carbamatos. Os estudos mostraram que as sequências peptídicas apresentaram afinidade. Os peptídeos e os pesticidas, foram aplicados em cartuchos para extração em fase sólida, utilizados como ferramenta pré-analítica para isolar ou pré-concentrar esses analitos. Apenas a sequência peptídica His-Glu-Pro-Ser apresentou comportamento adequado para ser utilizado como um sorbente para extração em fase sólida.

Posteriormente, Bhattachayay et al (82), desenvolveram um biossensor eletroquímico, utilizando um composto orgânico, o ácido 4-[(1E) -etanohidrazonoil] benzóico, capaz de mimetizar o sítio ativo da AChE. A atividade catalítica do composto orgânico foi comparada com a enzima AChE pura construindo o mesmo biossensor com a enzima imobilizada no eletrodo de trabalho. Os resultados mostraram que a molécula mimética catalisou a hidrólise da acetilcolina e apresentou resultados semelhantes até 10 mmol L^{-1} de acetilcolina. Em concentrações superiores a 10 mmol L^{-1} , houve uma queda na resposta da enzima, enquanto para a molécula mimética foi observado resposta até 40 mmol L^{-1} de acetilcolina. O sensor biomimético apresentou estabilidade a temperatura ambiente, enquanto que o biossensor a base de AChE foi armazenado em temperatura abaixo de zero °C.

O trabalho realizado Sgobbi et al (83) consistiu na síntese de diferentes moléculas de hidrazona como imitadores da enzima AChE. A atuação dessas moléculas na hidrólise de acetiltiocolina foram demonstradas por medições de absorção no UV-visível. A reação nucleofílica foi caracterizada por FTIR e os produtos da reação (acetato e tiocolina) foram identificados. O comportamento mimético foi confirmado comparando a cinética da reação de hidrólise do ácido [4-(1E) etanohidrazonoil] benzóico ao de outras moléculas como hidrazona de ciclopropil metil cetona, hidrazona de 3-metil-2-butanona e hidrazina. As moléculas propostas catalisaram a hidrólise de acetiltiocolina sendo o ácido [4-(1E) etanohidrazonoil] benzóico mais rápido do que as outras moléculas em estudo. Estudos computacionais mostraram que o substrato é atraído pelo anel aromático seguido pelo ataque nucleofílico através do grupo hidrazona. Os autores sugerem que esta molécula mimética pode ser utilizada para desenvolver um sensor químico biomimético descartável, podendo ser aplicado na determinação da acetilcolina ou na determinação de pesticidas.

Recentemente, Sgobbi e colaboradores (80) estudaram o desempenho de uma poliacrilamida funcionalizada, polihidroxicamalkanoato (PHA) na hidrólise do substrato de ATCh, bem como na desfosforilação de etil-paraoxon. O PHA contém grupos hidroxâmicos e carboxílicos inseridos ao longo da sua estrutura principal, atuando como local ativo. Estudos cinéticos demonstraram o desempenho catalítico da PHA na hidrólise de ATCh com aumento significativo no valor da constante em comparação com a hidrólise espontânea. Cálculos teóricos foram realizados para avaliar as interações entre o material bioinspirado de AChE com ATCh, bem como na presença do pesticida. Os resultados mostraram que a desfosforilação de etil-paraoxon ocorreu principalmente por meio de ataque nucleofílico promovido pela fração hidroxamato. A análise vibratória validou os modelos estruturais para ATCh, etil-paraoxon e PHA. Notavelmente, a energia de adsorção de etil-paraoxon-PHA é 3 vezes maior do que a ATCh-PHA. Os resultados mostram que o etil-paraoxon inibe fortemente o sítio ativo polimérico quando comparado com ATCh devido a uma ligação covalente entre o átomo de fósforo no pesticida e o átomo de oxigênio na fração hidroxamato em PHA, liberando p-nitrofenolato.

Santos e colaboradores (47) investigaram um hexapeptídeo bioinspirado, proposto por estudos de modelagem molecular, para mimetizar o sítio ativo da AChE, como alternativa para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos. A sequência peptídica foi sintetizada pela metodologia de fase sólida e caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa. Os dados indicam uma forte interação entre o pesticida diclorvos e o hexapeptídeo (NH_3^+ -Glu – His – Gly – Gly – Pro – Ser – COO^-). Os resultados demonstram que o peptídeo apresentou limites de detecção e quantificação de $1,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,66 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores estão bem próximos ou superiores aos biossensores que utilizam a AChE imobilizada na superfície de eletrodos, apresentando vantagem de ser um peptídeo de estrutura menos complexa e com maior estabilidade que a enzima.

A imobilização de enzimas em materiais suportes tem sido uma estratégia muito comum para a maioria das aplicações e tem despertado grande interesse nos últimos anos na indústria e na pesquisa científica. Os materiais utilizados para a imobilização devem ser preferencialmente de fácil obtenção e não-tóxicos. Além disso, devem fornecer uma ampla área superficial para as reações enzimáticas. A utilização de materiais nanoestruturados pode melhorar a eficiência na imobilização

de enzimas. Portanto, é crescente o interesse da utilização de partículas magnéticas para imobilização de biomoléculas devido a biocompatibilidade e superparamagnetismo, além destas fornecerem eficiente contato entre o biocatalisador e seus substratos (84). As nanopartículas metálicas apresentam características como: relação de grande superfície para volume, atividade de reação de superfície elevada, alta eficiência catalítica, além de uma forte capacidade de adsorção, como também apresenta uma variedade de aplicações biomédicas e tecnológicas (85,86).

Desta forma as nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas como alvo de estudo para a imobilização de biomoléculas devido às suas propriedades que as tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo utilizar um peptídeo artificial que mimetiza o sítio ativo da AChE no desenvolvimento de biossensores enzimáticos para a detecção de pesticidas das classes dos organofosforado e carbamato. Para desenvolver o presente estudo, foram escolhidos os pesticidas carbofurano e clorpirifós por pertencerem às classes dos pesticidas carbamatos e organofosforados, respectivamente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da sequência peptídica constituída por (NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-) o qual mimetiza o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase permitiu o desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de pesticidas e de um sensor bioinspirado para detectar pesticidas da classe dos organofosforados, carbamatos e piretróides.

A sequência peptídica foi imobilizada sobre nanopartículas magnéticas, que foram sintetizadas e funcionalizadas com quitosana. A presença de um anel aromático na estrutura da histidina dificultou a imobilização pelo grupamento amino (sequência peptídica). A estratégia de reagir o DADD com Fe_3O_4/CS , proporcionou de fato a imobilização do peptídeo que foi comprovado por CV e SWV, onde observou-se pico de oxidação da histidina em torno de +1,0 V.

A biomolécula proposta, pode ser utilizada na catálise da hidrólise do substrato enzimático acetiltiocolina e na quantificação de pesticidas pela inibição da sua atividade catalítica, pois apresentou interação com pesticidas, como é característico do centro ativo das enzimas colinesterases. Desta forma, mostra-se adequada para substituir a enzima em biossensores para pesticidas.

A otimização dos parâmetros operacionais e experimentais, permitiram o desenvolvimento de um sensor sensível com $LD = 6,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 1,7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para o pesticida carbofurano e $LD = 4,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o pesticida clorpirifós. Estes valores estão próximos ou com desempenho superior aos biossensores que utilizam a enzima acetilcolinesterase imobilizada na superfície de eletrodos.

A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de tomate e batata fortificadas com o pesticida carbofurano e clorpirifós, com metodologia simples de preparo de amostras, quando comparadas ao método de extração QuEChERS, obtendo-se valores de percentual de recuperação aceitáveis, exigidos pela ANVISA para determinação quantitativa de pesticida em amostra de alimento.

O desenvolvimento de sensor bioinspirado apresentou vantagens, uma vez que utilizou-se um peptídeo de estrutura menos complexa e com maior estabilidade que a enzima AChE, ou seja, a sequência peptídica apresentou após imobilização

sobre nanopartículas magnéticas, estabilidade de 85%, enquanto que o biossensor da enzima AChE desenvolvido por Chauhan e Pundir (132) imobilizado sobre nanopartículas de óxido de ferro apresentou estabilidade de 40%, ambos armazenados na geladeira a ± 4 °C por 90 dias.

O sensor bioinspirado, permitiu o desenvolvimento de metodologia analítica alternativa para detecção de pesticida. A sequência peptídica pode ser utilizada na confecção de sensores bioinspirados da enzima acetilcolinesterase, uma vez que, essa molécula é estável, barata, fácil de imobilizar e, assim, pode permitir a popularização de análise de pesticidas com a viabilidade de substituição dos métodos convencionais (métodos oficiais).

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 1999, pp. 31–44.
- 2 De ALBUQUERQUE, N. C. P.; CARRÃO, D. B.; HABENSCHUS, M. D.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 89–109, 2018.
- 3 GORADEL, N.H.; MIRZAEI, H.; SAHEBKAR, A.; POURSADEGHIYAN, M.; MASOUDIFAR, A.; MALEKSHAHI, Z. V.; NEGAHDARI, B. Biosensors for the detection of environmental and urban pollutions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.119, p. 207–212, 2018.
- 4 SOUSA, E S.; PINTO, L.; ARAUJO, M. C. U. A chemometric cleanup using multivariate curve resolution in liquid chromatography: Quantification of pesticide residues in vegetables. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 131–139, 2017.
- 5 MENEZES, F. A. M.; SANTOS, F.N.; PEREIRA, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/CG-MS) for the determination of pesticides residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346–354, 2010.
- 6 COSTA, L. L. F.; SANTANA, E. S.; SUCHARA, E. A.; BENATO, V. S.; CARASEK, E. 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, n. 1, p. 79–83, 2008.
- 7 ZAMBRONE, F. A. D. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos. Perigosa família. **Ciência Hoje, São Paulo**, v. 4, n. 22, p. 44–48, 1986.
- 8 CARVALHO, M. M. X.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”. História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 1, p. 75–91, 2017.
- 9 HOLAND, P. T. Glossary of Terms Relating to Pesticides. **Pure Applied Chemistry**, v. 68, p. 1167–1193, 1996.
- 10 GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.
- 11 COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L.H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Ecotoxicologia e Meio ambiente**, v. 15, p. 64–72, 2005.
- 12 ABREU, P. H. B.; ALONZO, H. G. A. Trabalho rural e riscos à saúde: uma revisão sobre o “uso seguro” de agrotóxicos no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4197–4208, 2014.

- 13 MARINA ROSSI. O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html>. Acesso em: 29 nov. 2017.
- 14 KHALAF, K. D.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. Simple and rapid flow-injection spectrophotometric determination of carbaryl after liquid-liquid extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 280, n. 2, p. 231–238, 1993.
- 15 SOUSA, J. S.; CASTRO, R. C.; ANDRADE, G. A.; LIMA, C. G.; LIMA, L. K. MILHOME, M. A. L. NASCIMENTO, R. F. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2675–2681, 2013.
- 16 DEL CARLO, M.; MASCINI, M.; PEPE, A.; DILETTI, G.; COMPAGNONE, D. Screening of food samples for carbamate and organophosphate pesticides using an electrochemical bioassay. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 651–656, 2004.
- 17 BARCELÓ, B.; PORTE, C.; CID, J.; ALBAIGÉS, A. Determination of organophosphorus compounds in mediterranean coastal waters and biota samples using gaschromatography with nitrogen-phosphorus and chemical ionization massspectrometric detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 38, p. 199–209, 1990.
- 18 MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017.
- 19 KANDELL, E. R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T. M. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. 5.ed ed. [s.l.] AMGH Editora LTDA, 2014.
- 20 SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C.L.; COSTA, J. B.N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.
- 21 HOBBIER, B. Y. F.; PITMAN, M.; SADLER, P. W. Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterases by Pyridinium Aldoximes and Related Compounds. **Biochemical Journal**, v. 75, p. 363–372, 1959.
- 22 SIT, R. K.; RADIC, Z.; GERARDI, V.; ZHANG, L.; GARCIA, E.; KATALINIC, M.; AMITAI, G.; KOVARIK, Z.; FOKIN, V.V.; SHARPLESS, K. B.; TAYLOR, P. New Structural Scaffolds for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19422–19430, 2011.
- 23 COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D.Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315–335, 2013.
- 24 GONÇALVES, A. S.; FRANÇA, T. C. C. WILTER, A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 968–975, 2006.
- 25 CADIEUX, C. L.; WANG, H.; ZHANG, Y.; KOENIG, J.; SHIH, T. M.; MCDONOUGH, J.; KOH, J.; CERASOLI, D. Probing the activity of a non-oxime

reactivator for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 133–141, 2016.

26 NI, Y.; QIU, P.; KOKOT, S. Simultaneous voltammetric determination of four carbamate pesticides with the use of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 321–330, 2005.

27 PETROPOULOU, S. S. E.; TSARBOPOULOS, A.; SISKOS, P. A. P. A. Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography – tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, p. 1444–1456, 2006.

28 MICKOVA, B.; ZROSTLIKOVA, J.; HAJLSLOVA, J.; RAUCHA, P.; MORENO, M. J.; ABAD, A.; MONTOYA, A. Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry for the determination of N -methylcarbamate insecticides in baby food. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, p. 123–132, 2003.

29 ALLOWAY, B. J.; AYRES, D. C. **Chemical Principles of Environmental Pollution**. 2nd. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

30 PATIL, V. B.; SHINGARE, M. S. Short Communication Thin-layer chromatographic detection of carbaryl using phenylhydrazine hydrochloride. **Journal of Chromatography A**, v. 653, p. 181–183, 1993.

31 OTIENO, P. O.; LALAH, J. O.; VIRANI, M.; JONDIKO, I. O.; SCHRAMM, K.-W. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 536–544, 2010.

32 VIEIRA, E. O.; PRATES, H. T.; CRUZ, I.; RAMOS, M. M.; SILVAS, G. F. Método simplificado de determinação de resíduos de carbofuran e thiodicarb em solo com a utilização de cromatografia líquida. **Revista Ceres**, p. 659–670, 2001.

33 SANTOS, J. L. O.; LEITE, O. Avaliação do risco de contaminação de águas subterrâneas na região oeste da Bahia pelo inseticida carbofuran, empregando os modelos Attenuation Factor (AF) e Retardation Factor (RF). **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 28–35, 2016.

34 SUN, X.; DU, S.; WANG, X.; ZHAO, W.; LI, Q. Label-free electrochemical immunosensor for carbofuran detection based on a sol-gel entrapped antibody. **sensors**, v. 11, p. 9520–9531, 2011.

35 LEE, W. J.; BLAIR, A.; HOPPIN, J. A.; LUBIN, J. H.; RUSIECKI, J. A. SANDLER, D. P.; DOSEMECI, M.; ALAVANJA, M. C. R. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, p. 1781–1789, 2004.

36 PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 10, p. 37–44, 2003.

37 BOGUS, E.R.; WATSCHKE, T.L.; MUMMA, R. O. Utilization of solid-phase extraction and reversed-phase and ion-pair chromatography in the analysis of seven agrochemicals in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 142–144, 1990.

- 38 ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico/clorpirifós.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae>>. Acesso em: 22 jan. 2017.
- 39 MART, C.; GARC, D. Determination of N -methylcarbamate pesticides in environmental samples by an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 174–180, 2007.
- 40 MA, J.; XIAO, R.; LI, J.; ZHAO, X.; SHI, B.; LI, S. Determination of organophosphorous pesticides in underground water by SPE-GC-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 2, p. 110–115, 2009.
- 41 WU, C-C; WANG, Y-S.; LUR, H-S. Multiresidue method for high-performance liquid chromatography determination of carbamate pesticides residues in tea samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 44, p. 58–68, 2009.
- 42 XU, Z. X.; FANG, G. Z.; WANG, S. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. **Food Chemistry**, v. 119, p. 845–850, 2010.
- 43 PRIMEL, E. G.; MILANI, M. R.; DEMOLINER, A.; NIENCHESKI, L. F. H.; ESCARRONE, A. L. V. Determination and application of methods using SPE, HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS and GFAAS for the determination of herbicides and metals in surface and drinking water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, n. 14, p. 1048–1062, 2010.
- 44 WANG, Y.; WANG, Z. Application of pneumatic nebulization single-drop microextraction for the determination of organophosphorous pesticides by gas chromatography – mass spectrometry. p. 1880–1885, 2011.
- 45 RAJU, M. B.; RAO, C. N.; KUMAR, G. V. R.; RAO, T. B.; KRISHNA, P. M.; SREENIVASULU, V.; PRASAD, K.; VENKATESWARLU, P. Method for the determination of organophosphorous pesticide residues in okra (*ABLEMOSCHUS ESCULENTUS*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 3, p. 375–384, 2012.
- 46 SINHA, S. N.; RAO, M. V. V.; VASUDEVA, K.; ODETOKUNC, M. A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 636–646, 2012.
- 47 SANTOS, G.P. dos; SILVA, B. F.; GARRIDO, S. S.; MASCINIB, M; YAMANAKA, H. Design, synthesis and characterization of a hexapeptide bio-inspired by acetylcholinesterase and its interaction with pesticide dichlorvos. **Analyst**, v. 139, n. 1, p. 273–9, 2014.
- 48 MELO, L.C.; SOUZA, D.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Sensitive determination of diquat herbicide in fresh food samples on a highly boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 21, p. 2502–2510, 2010.
- 49 MHAMMEDI, M.A.E.; BAKASSE, M.; NAJIH, R.; CHATINI, A. A carbon paste electrode modified with kaolin for the detection of diquat. **Applied Clay Science**, v. 43, n. 1, p. 130–134, 2010.

- 50 GALLI, A.; SOUZA, D. DE; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.
- 51 WU, L.; GAO, B.; ZHANG, F.; SUN, X.; ZHANG, Y.; LI, Z. A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. **Talanta**, v. 106, p. 360–366, 2013.
- 52 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 1012–1021, 2002.
- 53 BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F.; VIEIRA, S. N.; ARIZA, R. G.; FILHO, L. R. G.; MADURRO, J. M. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 9, p. 3238–3243, 2007.
- 54 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6a Ed Artm ed. São Paulo, 2014.
- 55 ANDREESCU, S.; MARTY, J. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 1–15, 2006.
- 56 LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6a. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- 57 ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- 58 SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293–302, 2005.
- 59 SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo Califórnia: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872, 1991.
- 60 HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9031–9035, 1993.
- 61 TAYLOR, P., BROWN, J. H. **Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6° edition ed. [s.l.] Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, 1999.
- 62 NUNES-TAVARES N, NERY, M. U.; BATISTA, S. C.M; ARAÚJO, G.M.; LOURO, S. R; HASSON-VOLOCH, U. A Inibition of Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by Tricyclic Antidepressants. **The Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1071, 2002.
- 63 SOREQ; H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 294–302, 2001.
- 64 CALDAS, L. Q. **Manual sobre Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Biperidílicos e Piretróides**, 2000.

- 65 GULER, M.; TURKOGLU, V.; BASI, Z. Determination of malation, methidathion and chlorpyrifos ethyl pesticides using acetylcholinesterase biosensor based on Nafion. **Electrochimica Acta**, v. 240, p. 129–135, 2017.
- 66 LI, Y.; ZHANG, Y.; HAN, G.; XIAO, Y.; LI, M.; ZHOU, W. An Acetylcholinesterase Biosensor Based on Graphene / Polyaniline Composite Film for Detection of Pesticides. **Chinese Journal Chemistry**, v. 34, p. 82-, 2016.
- 67 SUNDARMURUGASAN, R.; GUMPU, M. B.; RAMACHANDRA, B. L.; NESAKUMAR, N.; SWAMINATHAN, S.; UMA, M. K.; RAYAPPAN, J. B. B. Simultaneous detection of monocrotophos and dichlorvos in orange samples using acetylcholinesterase – zinc oxide modified platinum electrode with linear regression calibration. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 230, p. 306–313, 2016.
- 68 AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1405–1423, 2006.
- 69 MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.
- 70 YANG, M.; TEEUWEN, R. L. M.; GIESBERS, M.; BAGGERMAN, J.; ARAFAT, A.; DE WOLF, F. A.; VAN HEST, J. C. M.; ZUILHOF, H. One-step photochemical attachment of NHS-terminated monolayers onto silicon surfaces and subsequent functionalization. **Langmuir**, v. 24, n. 15, p. 7931–7938, 2008.
- 71 ENACHE, T. A.; BRETT, A. M. O. Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1337 – 1344, 2011.
- 72 ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11–18, 2013.
- 73 THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 71, p. 2333–2348, 1999.
- 74 DUJARDIN, B. E.; MANN, S. Bio-inspired Materials Chemistry. **advanced Materials**, n. 11, p. 775–788, 2002.
- 75 SOTOMAYOR, M. D. P.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 123–128, 2002.
- 76 BONI, A. C.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, A. A. Application of a Biomimetic Sensor Based on Iron Phthalocyanine Chloride: 4-Methylbenzylidene-Camphor Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1377–1383, 2010.
- 77 KUAH, E.; TOH, S. YEE, J. MA, Q.; GAO, Z. Enzyme Mimics: Advances and Applications. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 25, p. 8404–8430, 2016.
- 78 CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. v. 26, p. 370–378, 2008.
- 79 MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. v. 77, p. 237–256, 2002.

- 80 SGOBBI, L. F.; ZIBORDI-BESSE, L.; RODRIGUES, B. V. M.; RAZZINO, C. A.; SILVA, J. L. F.; MACHADO, S. A. S. Polyhydroxamicalkanoate as a bioinspired acetylcholinesterase-based catalyst for acetylthiocholine hydrolysis and organophosphorus dephosphorylation: experimental studies and theoretical insights. **Catalysis Science & Technology**, v. 7, n. 15, p. 3388–3398, 2017.
- 81 MASCINI, M.; SERGI, M.; MONTI, D.; CARLO, M DEL.; COMPAGNONE, D. Oligopeptides as Mimic of Acetylcholinesterase: From the Rational Design to the Application in Solid-Phase Extraction for Pesticides Oligopeptides as Mimic of Acetylcholinesterase: From the Rational Design to the Application in Solid-Phase Extraction fo. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9150–9156, 2008.
- 82 BHATTACHAYAY, D.; PAL, P.; BANERJEE, S.; SANYAL, S. K.; TURNER, A. P.F.; SARKAR, P. Electrochemical acetylcholine chloride biosensor using an acetylcholine esterase biomimic. **Analytical Letters**, v. 41, n. 8, p. 1387–1397, 2008.
- 83 SGOBBI, L. F.; PINHO, V. D.; CABRAL, M. F.; BURTOLOSO, A. C. B.; MACHADO, S. A. S. Hydrazone molecules as mimics for acetylcholinesterase. A new route towards disposable biosensors for pesticides. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 182, p. 211–216, 2013.
- 84 HUANG, X.; MENG, X.; TANG, F.; LI, L.; CHEN, D.; LIU, H.; ZHANG, Y.; REN, J. Mesoporous magnetic hollow nanoparticles - Protein carriers for lysosome escaping and cytosolic delivery. **Nanotechnology**, v. 19, n. 44, 2008.
- 85 ZHANG, H. L.; LAI, G. S.; HAN, D. Y.; YU, A. M. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase on an electrode modified with magnetic dextran microspheres. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 3, p. 971–977, 2008.
- 86 ROCHA-SANTOS, T. A. P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 28–36, 2014.
- 87 RANJBARI, E.; HADJMOHAMMADI, M. R.; KIEKENS, F.; DE WAEL, K. Mixed Hemi/Ad-Micelle Sodium Dodecyl Sulfate-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for the Efficient Removal and Trace Determination of Rhodamine-B and Rhodamine-6G. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 15, p. 7894–7901, 2015.
- 88 CHAICHI, M. J.; EHSANI, M. A novel glucose sensor based on immobilization of glucose oxidase on the chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and the luminol-H₂O₂-gold nanoparticle chemiluminescence detection system. **Sensors and 120 Actuators, B: Chemical**, v. 223, p. 713–722, 2016.
- 89 AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004.
- 90 ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: padronização - preparação - purificação**. Edgard Blu ed. São Paulo, 1968.
- 91 FILHO, E. R. P. **Planejamento fatorial em química. Maximizando a obtenção de resultados**. 1° ed. EdUF ed. São Carlos/SP, 2015.
- 92 DE SOUSA, R. A.; RIBEIRO, C. Avaliação de metodologia eletroquímica no monitoramento da conversão de óleo de girassol em biodiesel. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 51–54, 2012.

- 93 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- 94 CHEN, D.; SUN, X.; GUO, Y. QIAO, L.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-SnO₂-chitosan nanocomposite. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, p. 315–321, 2015.
- 95 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
- 96 ABDALLAH, H.; ARNAUDGUILHEM, C.; JABER, F.; LOBINSKI, R. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear ion. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 61–72, 2014.
- 97 KACHHAWAHA, AS, NAGARNAIK, PM, JADHAV, M; PUDALE, A; LABHASETWAR, PK; BANERJEE, K. Optimization of a Modified QuEChERS Method for Multiresidue Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Surface Water by LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 592–597, 2017.
- 98 FONT, G.; JUAN, C.; MA, J. Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 344–351, 2017.
- 99 ANNUNZIATA, L.; STRAMENGA, A.; VISCIANO, P.; SCHIRONE, M.; COLLI, L.; COLAGRANDE, M. N.; CAMPANA, G.; SCORTICHINI, G. Simultaneous determination of aflatoxins, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in cereal-derived products by QuEChERS extraction coupled with LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, p. 5143–5155, 2017.
- 100 RAMALHOSA, M. J.; PAÍGA, P.; MORAIS, S.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. **journal of separation science**, v. 32, p. 3529–3538, 2009.
- 101 AL-ALAM, J.; FAJLOUN, Z.; CHBANI, A.; MILLET, M. A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS – SPME. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, p. 5157–5169, 2017.
- 102 GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015.
- 103 WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 803–812, 2011.
- 104 MASTOVSKA K, DORWEILER KJ, LEHOTAY SJ, WEGSCHEID JS, S. K. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5959–72, 2010.

- 105 BESIL, N.; PEQUEÑO, F.; ALONZO, N.; HLADKI, R.; CESIO, M.; HEINZEN, H. Evaluation of different QuEChERS procedures for pesticide residues determination in *Calendula officinalis* (L) inflorescences. **Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 7, n. September, p. 143–148, 2017.
- 106 VIERA, M. S.; RIZZETTI, T. M.; DE SOUZA, M. P.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition i. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 119–127, 2017.
- 107 LEHOTAY, S. J.; AE, K.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548–2560, 2010.
- 108 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7a ed ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- 109 PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4a ed. norte-americana 2010.
- 110 TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. The most important methods for the characterization of porosity of styrene-divinylbenzene based resins. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808, 2001.
- 111 THICKETT, D.; ODLYHA, M. Application of thermomagnetometry to corrosion studies of archaeological iron. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, n. 3, p. 565–571, 2005.
- 112 BDEC. **Base de Dados de Estruturas Cristalinas**. Disponível em: <<http://bdec.dotlib.com.br/inicio/crystmet>>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- 113 STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3–4, p. 207–218, 2003.
- 114 JIN, W. J.; YANG, G.; J.; SHAO, H. X.; QIN, A. J. A novel label-free impedimetric immunosensor for detection of semicarbazide residue based on gold nanoparticles-functional chitosan composite membrane. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 188, p. 271–279, 2013.
- 115 LI, H.; WEI, X.; ZHANG, Y.; XU, Y.; LU, K.; LI, C.; YAN, Y. Rapid and sensitive detection of hemoglobin with gold nanoparticles based fluorescence sensor in aqueous solution. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 685, p. 820–827, 2016.
- 116 HAWORTH. **Protein Methods Library. Thermo Fisher Scientific**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>>. Acesso em: 2 de maio de 2017.
- 117 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações**. Editora: Almedina, 1993.
- 118 STOYTICHEVA, M. Electrochemical evaluation of the kinetic parameters of a heterogeneous enzyme reaction in presence of metal ions. **Electroanalysis**, v. 14, n. 13, p. 923–927, 2002.

- 119 SMITH, E. T. Examination of $n = 2$ reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, n. 2, p. 259–264, 2006.
- 120 ABBAR, J. C.; NANDIBEWOOR, S. T. Voltammetric oxidation and determination of atorvastatin based on the enhancement effect of cetyltrimethyl ammonium bromide at a carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 158–164, 2013.
- 121 TEMERK, Y.; IBRAHIM, M.; IBRAHIM, H.; KOTB, M. Adsorptive stripping voltammetric determination of anticancer drug lomustine in biological fluids using in situ mercury film coated graphite pencil electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 760, p. 135–142, 2016.
- 122 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241–259, 2006.
- 123 HUDARI, F. F.; FERREIRA, S. L. C; ZANONI, M. V. B. Multi-responses Methodology Applied in the Electroanalytical Determination of Hair Dye by Using Printed Carbon Electrode Modified with Graphene. **Electroanalysis**, v. 28, n. 5, p. 1085–1092, 2016.
- 124 ROSA, T. R.; RODRIGUES, J. G. A.; FERREIRA, R. Q. Uso do planejamento experimental para otimização de um procedimento voltamétrico para determinação simultânea das concentrações dos metais Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1206–1214, 2016.
- 125 JEYAPRAGASAM, T.; SARASWATHI, R. Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide-chitosan nanocomposite. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 191, p. 681–687, 2014.
- 126 BUCUR, M. P.; BUCUR, B.; RADU, G. L. Critical evaluation of acetylthiocholine iodide and acetylthiocholine chloride as substrates for amperometric biosensors based on acetylcholinesterase. **Sensors (Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 1603–1613, 2013.
- 127 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- 128 SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.
- 129 ANVISA. **Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2013-2015_VERSÃO-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>.
- 130 KOSTELNIK, A. et al. Construction of an Acetylcholinesterase Sensor Based on Synthesized Paramagnetic Nanoparticles, a Simple Tool for Neurotoxic Compounds Assay. **sensors**, v. 17, p. 1–12, 2017.
- 131 CHAUHAN, N.; NARANG, J.; JAIN, U. Amperometric acetylcholinesterase biosensor for pesticides monitoring utilising iron oxide nanoparticles and poly(indole-5-carboxylic acid). **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 2, p. 111–122, 2016.

132 CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe₃O₄ nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides. **Electrochimica Acta**, v. 67, p. 79–86, 2012.

133 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 5 set. 2017.