

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/01/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**TESE DE DOUTORADO**

***UTILIZAÇÃO DA MONTMORILONITA NA CONSTRUÇÃO DE  
SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM  
ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE CLORPIRIFÓS***

**CAROLINE POLINI LUPI**

**ARARAQUARA  
2019**

**CAROLINE POLINI LUPI**

***UTILIZAÇÃO DA MONTMORILONITA NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES  
ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE  
CLORPIRIFÓS***

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.

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Luis Fertonani

**Coorientador:** Prof. Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira

**Araraquara  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

L965u Lupi, Caroline Polini  
Utilização da montmorilonita na construção de sensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterase para detecção de clorpirifós / Caroline Polini Lupi. – Araraquara : [s.n.], 2019  
98 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Fernando Luis Ferttonani  
Coorientador: Antonio Aparecido Pupim Ferreira

1. Montmorilonita. 2. Inibidores de colinesterase. 3. Análise térmica. 4. Compostos organofosforados. 5. Espectroscopia de impedância. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Utilização da monmorilonita na construção de sensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterase para detecção de dopirifós"

AUTORA: CAROLINE POLINI LUPI

ORIENTADOR: FERNANDO LUIS FERTONANI

COORIENTADOR: ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA

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

Prof. Dr. FERNANDO LUIS FERTONANI

Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. MARIA APARECIDA ZAGHETE BERTOCHI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. HIDEKO YAMANAKA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. WENDEL ANDRADE ALVES

Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Prof. Dr. MARYSTELA FERREIRA

Departamento de Física, Química e Matemática / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba

Araraquara, 29 de janeiro de 2019

## DEDICATÓRIA

*À minha família, base de tudo, que me dá forças todos os dias para seguir sonhando e lutando: ao meu esposo **Juliano**, por me apoiar e estar sempre ao meu lado; às minhas filhas, **Lavínia** e **Manuela**, razão do meu viver; aos meus pais, **Domingos** e **Olinda**, por todo amor e incentivo.*

*“Há duas formas para viver a sua vida. Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, sem o qual nada sou, por me dar forças e colocar pessoas tão especiais em meu caminho.

Ao meu esposo Juliano por todo amor, amizade, companheirismo, incentivo, por me ajudar a tornar sonhos em realidades. Essa vitória também é sua!

Às minhas filhas, Lavínia e Manuela, que ressignificaram minha existência, dando novo sentido aos meus dias.

Aos meus pais, Domingos e Olinda, pelo amor, carinho, por acreditarem, me apoiarem, não medindo esforços para me ajudarem a alcançar meus sonhos.

À toda minha família, pelo amor e respeito.

Ao Professor Dr. Fernando Luis Fertoni pela atenção, disponibilidade, dedicação e orientação, de maneira tão amigável e carinhosa durante esses anos, proporcionando-me crescimento intelectual, e, acima de tudo, pessoal.

Ao Professor Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira pela co-orientação e amizade, por todo o ensinamento proporcionado ao longo dos anos, por ser exemplo de profissional e de ser humano.

À Profa. Dra. Hideko Yamanaka que acompanhou meu projeto, sempre disposta a discutir e contribuir com o desenvolvimento do trabalho, bem como forneceu toda infraestrutura para o desenvolvimento do mesmo.

Ao Prof. Dr. Assis Vicente Bendetti e à Profa. Dra. Hideko Yamanaka pelas valiosas sugestões dadas no exame geral de qualificação.

Aos integrantes do GEAr, por toda a ajuda e disponibilidade durante o período de desenvolvimento desse trabalho: Marcos, Juliana, Rafael, Mariele e Bárbara.

Aos colegas do Laboratório de Fotoquímica, IBILCE – São José do Rio Preto, pelas contribuições na realização das análises térmicas: Bruno e Filipe.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

***Muito Obrigada!!***



## RESUMO

A produção agrícola tem recebido inquestionáveis benefícios devido ao uso de pesticidas, entretanto, essas substâncias podem causar sérios danos aos organismos vivos, devido sua toxicidade, baixa biodegradabilidade e alto potencial carcinogênico. Dessa forma, a determinação de pesticidas, em nível de traços, se faz de extrema importância, sendo necessário encontrar abordagens analíticas simples e efetivas para seu monitoramento. Nesse sentido, diversos tipos de biossensores enzimáticos, têm sido investigados e fundamentados na inibição de acetilcolinesterase, enzima envolvida na transmissão dos impulsos nervosos. Os pesticidas das classes dos organofosforados interagem com essa classe de enzimas, inativando-as e provocando intoxicações agudas, podendo levar, como consequência, à morte do indivíduo. A montmorilonita é um argilomineral do grupo das esmectitas, que possui excelentes propriedades de intercalação e inchamento, alto potencial de adsorção e elevada afinidade com diversas substâncias orgânicas e inorgânicas. Essas características as constituem como um adequado meio de imobilização de moléculas orgânicas/inorgânicas e biológicas, tais como enzimas e nanopartículas metálicas. Recentemente, eletrodos modificados com montmorilonita têm atraído considerável atenção na área de eletroanalítica/eletroquímica, revelando como propriedades: alta sensibilidade, boa seletividade, custo relativamente baixo, resposta rápida e possibilidade de miniaturização, dentre outras vantagens. Nesse sentido, este trabalho buscou evidenciar a possibilidade de modificação da montmorilonita com três sequências peptídicas sintéticas, propostas por modelagem molecular, que mimetizam o sítio ativo da acetilcolinesterase, e a aplicação dessa argila modificada na construção de sensores, utilizados na detecção eletroquímica, por espectroscopia de impedância eletroquímica, de clorpirifós, pesticida da classe dos organofosforados. As sequências peptídicas utilizadas foram  $(NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-)$ ;  $(NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-)$ ;  $(NH_3^+ - His - Glu - Tyr - Lys - Pro - Ser - COO^-)$ . Essas sequências biomiméticas, que já haviam sido propostas e estudadas anteriormente, apresentaram uma alta constante de afinidade pelos pesticidas da classe dos organofosforados. A modificação da montmorilonita foi demonstrada pelas técnicas de caracterização análise térmica, difração de raios X, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. A interação das argilas modificadas com o clorpirifós foi demonstrada por DSC, e as três sequências peptídicas apresentaram comportamentos diferentes frente ao pesticida, podendo, duas delas, serem utilizadas satisfatoriamente em substituição à enzima original na construção de sensores impedimétricos. Os sensores construídos apresentaram boa linearidade na faixa de concentração de  $1 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (sensor 1: R = 0,9997; sensor 3: R = 0,9999) e também de  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (sensor 3: R = 0,9950), limites de detecção entre  $1,41 \times 10^{-10}$  e  $2,40 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, e foram satisfatoriamente aplicados na detecção da clorpirifós em amostra de tomate.

**Palavras-Chave:** Montmorilonita. Acetilcolinesterase. Espectroscopia de impedância eletroquímica. Análise térmica. Clorpirifós.

## ABSTRACT

Agricultural production has received unquestionable benefits due to the use of pesticides; however, these substances can cause serious damage to living organisms due to their toxicity, low biodegradability and high carcinogenic potential. Thus, the determination of pesticides at trace level is extremely important, and it is necessary to find simple and effective analytical approaches for its monitoring. In this sense, several types of enzymatic biosensors have been investigated and based on the inhibition of acetylcholinesterase, an enzyme involved in the transmission of nerve impulses. The pesticides of the classes of organophosphates interact with this class of enzymes, inactivating them and provoking acute intoxications, which can lead, as a consequence, to the death of the individual. The montmorillonite is a clay of the smectite group, which has excellent intercalation and swelling properties, high adsorption potential and high affinity with various organic and inorganic substances. These characteristics constitute them as an adequate means of immobilizing organic/inorganic and biological molecules, such as enzymes and metal nanoparticles. Recently, montmorillonite modified electrodes have attracted considerable attention in the field of electroanalytical/electrochemistry, revealing as properties: high sensitivity, good selectivity, low cost, rapid response and possibility of miniaturization, among other advantages. In this sense, this work aimed to show the possibility of modifying the montmorillonite with three synthetic peptide sequences, proposed by molecular modeling, that mimic the active site of acetylcholinesterase, and the application of this modified clay in the construction of sensors, used in electrochemical detection, by spectroscopy electrochemical impedance, chlorpyrifos, pesticide of the organophosphorus class. The peptide sequences used were ( $\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$ ); ( $\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$ ); ( $\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Tyr} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$ ). These biomimetic sequences, which had already been proposed and studied previously, had a high affinity constant for organophosphorus class pesticides. The modification of montmorillonite was demonstrated by the techniques of thermal analysis, X-ray diffraction, infrared and scanning electron microscopy. The interaction of the modified clays with the chlorpyrifos was demonstrated by DSC, and the three peptide sequences presented different behaviors against the pesticide, and two of them could be used satisfactorily in substitution of the original enzyme in the construction of immunometric sensors. The constructed sensors presented good linearity in the concentration range of  $1 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (sensor 1: R = 0,9997; sensor 3: R = 0,9999) and also from  $1 \times 10^{-7}$  to  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (sensor 3: R = 0,9950), detection limits between  $1,41 \times 10^{-10}$  and  $2,40 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, and were satisfactorily applied in the detection of chlorpyrifos in a tomato sample.

**Keywords:** Montmorillonite. Acetylcholinesterase. Electrochemical impedance spectroscopy. Thermal analysis. Chlorpyrifos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representações das estruturas dos diferentes argilominerais: (a) representação simplificada dos tetraédros e octaédros; (b) representação espacial dos tetraédros e octaédros; (c) representação simplificada caulinita, ilitas, esmectitas	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Estrutura cristalina da montmorilonita	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Classificação de pesticidas quanto à toxicidade	<b>21</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química geral de um organofosforado	<b>22</b>
<b>Figura 5</b>	Hidrólise da acetilcolina pela ação da AChE	<b>24</b>
<b>Figura 6</b>	Sítio ativo da enzima AChE composto pela tríade (Ser 200-His 440-Glu 327)	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	Mecanismo clássico de inibição da AChE por pesticidas organofosforados	<b>26</b>
<b>Figura 8</b>	Célula eletroquímica típica com destaque para os processos ocorridos na interface do eletrodo de trabalho e eletrólito de suporte	<b>31</b>
<b>Figura 9</b>	Representação do Diagrama de Nyquist	<b>32</b>
<b>Figura 10</b>	(a) Sinal de excitação típico para voltametria cíclica: forma de onda triangular; (b) Representação esquemática de um voltamograma cíclico, com as indicações dos potenciais e correntes de picos	<b>34</b>
<b>Figura 11</b>	Fluxograma da preparação das suspensões argila e mixes	<b>38</b>
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática da modificação do eletrodo de platina por imersão	<b>39</b>
<b>Figura 13</b>	Representação esquemática da preparação do material sólido a partir das suspensões da argila e mixes	<b>40</b>
<b>Figura 14</b>	Difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	<b>47</b>
<b>Figura 15</b>	Ampliação da região a baixos ângulos dos difratogramas de raios X obtidos para SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	<b>48</b>
<b>Figura 16</b>	Espectros no infravermelho obtidos para a montmorilonita pura (-), o peptídeo 1 (-) e o mix 1 (-)	<b>49</b>

<b>Figura 17</b>	Espectros no infravermelho obtidos para a montmorilonita pura e para os mixes	<b>50</b>
<b>Figura 18</b>	Curvas TG/DTG e DTA para a (a) argila pura e (b) mix 1	<b>51</b>
<b>Figura 19</b>	Remoção de água: a) DTG: argila pura, mix 1; b) DTA: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA. Remoção peptídeo: c) DTG: argila, mix 1 e subtração das curvas DTA	<b>52</b>
<b>Figura 20</b>	Curvas DSC para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	<b>53</b>
<b>Figura 21</b>	Ampliação das curvas DSC de resfriamento em diferentes intervalos para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	<b>54</b>
<b>Figura 22</b>	Ampliação das curvas DSC de aquecimento no intervalo de -5 °C a 45 °C para a argila pura (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-)	<b>55</b>
<b>Figura 23</b>	Análise cíclica: curvas DSC para argila montmorilonita. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv\ 1} = -70^\circ\text{C}$ , $T_{inv\ 2} = 80^\circ\text{C}$ ; ciclo 5: $T_i = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ , $T_f = 300^\circ\text{C}$	<b>55</b>
<b>Figura 24</b>	Análise cíclica: curvas DSC para mix 1. Ciclo 1: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 2: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 3: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 4: $T_i = T_f = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv\ 1} = -70^\circ\text{C}$ , $T_{inv\ 2} = 80^\circ\text{C}$ ; ciclo 5: $T_i = 25^\circ\text{C}$ , $T_{inv} = -70^\circ\text{C}$ , $T_f = 300^\circ\text{C}$	<b>57</b>
<b>Figura 25</b>	Ampliação das curvas DSC do mix 1 na região de -60 a 2°C	<b>58</b>
<b>Figura 26</b>	Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o (a) substrato de platina e para os filmes de (b) montmorilonita, (c) mix 1, (d) mix 2 e (e) mix 3	<b>59</b>
<b>Figura 27</b>	(a) VCs obtidos para o eletrodo modificado com diferentes camadas de SWy-1 na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Pt (-), 1 camada (-), 2 camadas (-), 3 camadas (-), 4 camadas (-), 5 camadas (-). (b) VCs para o eletrodo sem modificação e modificado com 3 camadas do filme de SWy-1 apenas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; $A_{geom}$ : $0,014 \text{ cm}^2$ ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Eletrodo de referência: $\text{Ag} \text{AgCl} \text{KCl}_{(sat)}$	<b>61</b>
<b>Figura 28</b>	(a) Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com SWy-1, nos diferentes tempos de imersão, na presença de	<b>63</b>

$1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, pH 7,0.  
 (b) voltamogramas cíclicos obtidos nas mesmas condições,  
 com eletrodo de trabalho: Pt;  $A_{\text{geom}}: 0,014 \text{ cm}^2$ ;  
 $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>

- Figura 29** Relação entre  $|Z|/|Z|_{5\text{mV}(\text{rms})}$  e diferentes amplitudes, aplicadas a uma frequência de 50 mHz **64**
- Figura 30** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para eletrodo modificado com mix 1 nas diferentes razões argila:peptídeo, na presença de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, pH 7,0 **64**
- Figura 31** VCs e relação de  $i_{\text{pa}}$  em função de  $v^{1/2}$  para os eletrodos modificados com (a) SWy-1, (b) Mix 1, (c) Mix 2, (d) Mix 3, nas diferentes velocidades de varredura, na presença de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, em pH 7,0; eletrodo de trabalho: Pt;  $A_{\text{geom}}: 0,014 \text{ cm}^2$ . Eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub> **65**
- Figura 32** VCs obtidos para o branco (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-) na presença de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt;  $A_{\text{geom}}: 0,014 \text{ cm}^2$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub> **67**
- Figura 33** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o bare (-) e para os sensores construídos com SWy-1 (-), mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-), na presença de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, pH 7,0 **69**
- Figura 34** Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente (símbolos) e pelo ajuste do circuito elétrico (-) para (a) bare Pt, e para os eletrodos modificados com (b) SWy-1, (c) Mix 1, (d) Mix 2 (e) Mix 3, na presença de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, em pH 7,0 **69**
- Figura 35** Análise cíclica: curvas DSC para mix 1 na presença de clorpirifós. Ciclo 1:  $T_i = T_f = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 2:  $T_i = T_f = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 3:  $T_i = T_f = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$ ; ciclo 4:  $T_i = T_f = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv} 1} = -70^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv} 2} = 80^\circ\text{C}$ ; ciclo 5:  $T_i = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inv}} = -70^\circ\text{C}$ ,  $T_f = 300^\circ\text{C}$  **72**
- Figura 36** Ampliação das curvas DSC de resfriamento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -40 a -10 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-) **73**
- Figura 37** Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -60 a 10 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-) **74**

<b>Figura 38</b>	Ampliação das curvas DSC de aquecimento do mix 1 na presença de clorpirifós na região de -50 a -5 °C para os diferentes ciclos: 1 (-), 2 (-), 3 (-), 4 (-) e 5 (-)	<b>74</b>
<b>Figura 39</b>	Ampliação das curvas DSC da SWy-1 (-), mix 1 (-) e mix 1 + pesticida (-), na região de 172 a 294,5 °C	<b>75</b>
<b>Figura 40</b>	Curvas DSC para o mix 1 (-), mix 2 (-) e mix 3 (-) na presença de clorpirifós	<b>76</b>
<b>Figura 41</b>	Curva DSC de resfriamento para: (a) SWy-1 (-) e mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1 (-) e mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-) e mix 3 na ausência (-) e na presença do pesticida (-)	<b>77</b>
<b>Figura 42</b>	Curva DSC de aquecimento para: (a) SWy-1 (-), mix 1 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (b) SWy-1(-), mix 2 na ausência (-) e na presença do pesticida (-); (c) SWy-1 (-), mix 3 na ausência (-) e presença do pesticida (-)	<b>78</b>
<b>Figura 43</b>	Microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o mix 1, mix 2 e mix 3, após a incubação na solução do pesticida	<b>79</b>
<b>Figura 44</b>	Gráficos da absorvância em função do tempo de incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para (a) mix 1, (b) mix 2 e (c) mix 3. $\lambda_{\text{máx}} = 200 \text{ nm}$ . Nos detalhes histograma da porcentagem de interação em função do tempo de incubação	<b>80</b>
<b>Figura 45</b>	VCs obtidos para o branco e para o sensor construído com mix 1 antes e após incubação na solução de pesticida $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por tempos variados. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0. Eletrodo de trabalho: Pt; $A_{\text{geom}}: 0,014 \text{ cm}^2$ ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Eletrodo de referência: $\text{Ag} \text{AgCl} \text{KCl}_{(\text{sat})}$	<b>82</b>
<b>Figura 46</b>	Efeito do pH do eletrólito frente ao sensores incubados no pesticida clorpirifós por 5 min	<b>82</b>
<b>Figura 47</b>	Curva analítica da resistência a transferência de carga em função da concentração do pesticida clorpirifós para: (a) sensor 1 e (b) sensor 3 na faixa de trabalho de 1 a $10 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) sensor 3 na faixa de trabalho de 1 a $10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Medições realizadas na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em pH 7,0	<b>84</b>
<b>Figura 48</b>	Diagramas no plano complexo obtidos experimentalmente para o sensores (a) 1 e (b) 3a para a amostra de tomate na ausência (-) e presença do pesticida (-). Medidas realizadas em meio a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 7,0	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relatório de vendas de ingredientes ativos no Brasil	<b>23</b>
<b>Tabela 2</b>	Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do clorpirifós	<b>24</b>
<b>Tabela 3</b>	Dependência de $i_p$ , $C$ e $E_p$ com a $v$ para alguns tipos mais comuns de processos eletródicos	<b>35</b>
<b>Tabela 4</b>	Sequências peptídicas utilizadas	<b>37</b>
<b>Tabela 5</b>	Informações referentes às amostras submetidas à análise DSC	<b>43</b>
<b>Tabela 6</b>	Faixa de concentração de clorpirifós utilizada na construção da curva analítica para cada sensor	<b>45</b>
<b>Tabela 7</b>	Valores $d_{001}$ calculados para SWy-1, mixes 1, 2 e 3	<b>48</b>
<b>Tabela 8</b>	Bandas atribuídas para o espectro obtido no infravermelho dos mixes	<b>51</b>
<b>Tabela 9</b>	Valores de $E_{pa}$ , $E_{pc}$ e $\Delta E_p$ obtidos para os diferentes sensores	<b>67</b>
<b>Tabela 10</b>	Parâmetros obtidos através dos dados de impedância experimental	<b>71</b>
<b>Tabela 11</b>	Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas de calibração do pesticida clorpirifós para os sensores 1 e 3	<b>71</b>
<b>Tabela 12</b>	Percentual de recuperação do pesticida clorpirifós em amostra de tomate para os sensores 1 e 3	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Área eletroativa do eletrodo
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Arg</b>	Arginina
<b>b</b>	Coeficiente angular da curva analítica
<b>C</b>	Concentração
<b>C<sub>d</sub></b>	Capacitância da dupla camada elétrica
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentração da espécie eletroativa
<b>CPE1</b>	Constante de fase
<b>CPE2</b>	Constante de fase 2
<b>CSNSs</b>	Nanofolhas de sílica carboxiladas
<b>CTC</b>	Capacidade de troca catiônica
<b>D</b>	Coeficiente de difusão da espécie
<b>DRX</b>	Difração de raios X
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>DTA</b>	Análise térmica diferencial
<b>DTG</b>	Termogravimetria derivada
<b>E</b>	Potencial
<b>E<sub>f</sub></b>	Potencial final
<b>E<sub>i</sub></b>	Potencial inicial
<b>EIS</b>	Espectroscopia de impedância eletroquímica
<b>E<sub>oc</sub></b>	Potencial de circuito aberto
<b>E<sub>pa</sub></b>	Potencial de pico anódico
<b>E<sub>pc</sub></b>	Potencial de pico catódico
<b>E<sub>T</sub> (Pt)</b>	Eletrodo de trabalho
<b>f<sub>max</sub></b>	Frequência máxima
<b>Gly</b>	Glicina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>His</b>	Histidina



<b>i</b>	Corrente
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b><math>i_{pa}</math></b>	Corrente de pico anódico
<b><math>I_{p,bare}</math></b>	Corrente de pico para o branco
<b><math>i_{pc}</math></b>	Corrente de pico catódico
<b>IR</b>	Espectroscopia na região do infravermelho
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>j</b>	Número imaginário
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LMR</b>	Limite máximo de resíduo
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>Lys</b>	Lisina
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>mHz</b>	Mili hertz
<b>min</b>	Minuto
<b>Mt</b>	Montmorilonita
<b>n</b>	Número de elétrons envolvidos no processo de transferência eletrônica
<b>NRs</b>	Nanofolhas
<b>OP</b>	Organofosforados
<b>PAMAM</b>	Poliâmidoamina
<b>PHA</b>	Poliacrilamida funcionalizada
<b>Pro</b>	Prolina
<b>Pt</b>	Platina
<b>Pt NP</b>	Nanopartículas de platina
<b>PVA</b>	Polivinilalcool
<b><math>R_{ct}</math></b>	Resistência a transferência de carga
<b><math>R_s</math></b>	Resistência da solução
<b><math>R_{\Omega}</math></b>	Resistência total do sistema
<b>s</b>	Segundo
<b><math>S_D</math></b>	Desvio padrão
<b>SEM</b>	Microscopia eletrônica de varredura

<b>Ser</b>	Serina
<b>SNS</b>	Nanofolhas de SiO <sub>2</sub>
<b>SWy</b>	Montmorilonita
<b>t</b>	Tempo
<b>TG</b>	Termogravimetria
<b>T<sub>onset</sub></b>	Temperatura <i>onset</i>
<b>T<sub>pico</sub></b>	Temperatura de pico
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
<b><math>\omega</math></b>	Frequência angular
<b>Z</b>	Impedância total
<b>Z<sub>img</sub> ou Z''</b>	Componente imaginário da impedância
<b>Z<sub>real</sub> ou Z'</b>	Componente real da impedância
<b><math>\beta</math></b>	Razão de aquecimento
<b><math>\Delta E_p</math></b>	Diferença entre os potenciais de pico
<b><math>\theta</math></b>	Recobrimento máximo da superfície do eletrodo

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 <i>Os pesticidas organofosforados</i>	<b>20</b>
1.2 <i>Sensores eletroquímicos na detecção de pesticidas</i>	<b>26</b>
1.3 <i>Técnicas Eletroquímicas</i>	<b>30</b>
1.3.1 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	<b>30</b>
1.3.2 <i>Voltametria Cíclica</i>	<b>32</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1 <i>Reagentes e equipamentos</i>	<b>36</b>
3.2 <i>Construção dos sensores</i>	<b>37</b>
3.3 <i>Estudo da interação argila-peptídeos</i>	<b>39</b>
3.4 <i>Caracterização eletroquímica dos sensores</i>	<b>41</b>
3.4.1 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)</i>	<b>42</b>
3.4.2 <i>Voltametria Cíclica (VC)</i>	<b>42</b>
3.5 <i>Avaliações dos sensores frente ao pesticida</i>	<b>43</b>
3.5.1 <i>Análise da interação mix-pesticida</i>	<b>43</b>
3.5.1.1 <i>DSC</i>	<b>43</b>
3.5.1.2 <i>SEM</i>	<b>44</b>
3.5.2 <i>Influência do tempo de incubação</i>	<b>44</b>
3.5.3 <i>Influência do pH</i>	<b>45</b>
3.5.4 <i>Construção da curva analítica</i>	<b>45</b>
3.5.5 <i>Aplicação em amostras de alimento</i>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
4.1 <i>Caracterização estrutural argila-peptídeos</i>	<b>47</b>
4.1.1 <i>Difração de raios X</i>	<b>47</b>
4.1.2 <i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	<b>49</b>
4.1.3 <i>Análise térmica</i>	<b>51</b>
4.1.4 <i>Miscroscopia eletrônica de varredura</i>	<b>59</b>
4.2 <i>Caracterização Eletroquímica dos Sensores</i>	<b>61</b>
4.3 <i>Avaliações dos sensores frente ao pesticida</i>	<b>71</b>
4.3.1 <i>Análise da Interação mix-pesticida</i>	<b>72</b>

4.3.1.1 Análise térmica	72
4.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura	79
4.3.2 Influência do tempo de incubação e do pH	80
4.4 <i>Construção da curva analítica</i>	82
4.5 <i>Aplicação em amostras de alimentos</i>	84
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>86</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>89</b>

## INTRODUÇÃO

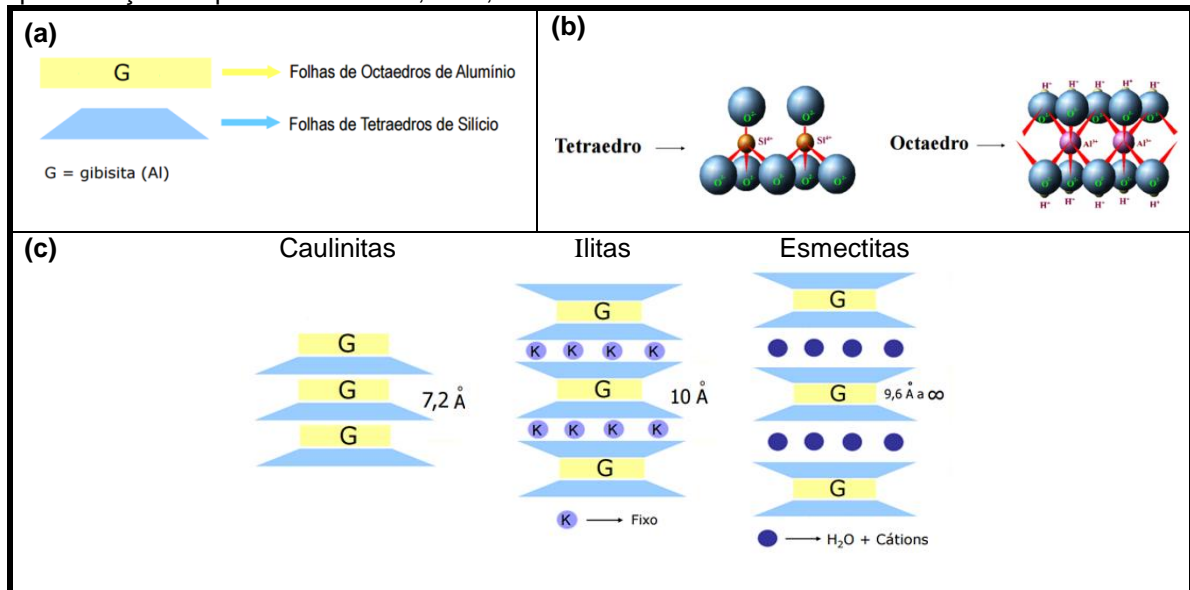
Há muito tempo que o ser humano vem utilizando recursos naturais para processar e fabricar materiais de interesse tecnológico. Dentre esses materiais encontram-se as argilas, que possuem muitas aplicações desde a antiguidade, onde eram utilizadas na fabricação de vasos, tijolos, e outros objetos. Com o passar dos anos suas aplicações cresceram muito e atualmente, são utilizadas nos mais diversos campos, como fabricação de louças sanitárias, pisos, revestimentos, tintas, catalisadores, adsorventes, fertilizantes, na indústria de petróleo, na área farmacológica, cosmética, entre outros <sup>[1-7]</sup>. As diversas aplicações de argilas em uma gama extensa de campos são devido às suas próprias características, tais como: alta plasticidade, resistência mecânica, estabilidade térmica, alta capacidade de adsorção, elevada área superficial e capacidade de troca catiônica (CTC) <sup>[8,9]</sup>.

Pode-se definir o termo argila como sendo um material natural, de textura terrosa, granulação fina, constituída essencialmente de argilominerais e podendo conter outros minerais, como quartzo, mica, pirita, hematita, matéria orgânica e outras impurezas <sup>[10-12]</sup>. Os argilominerais são os minerais característicos das argilas <sup>[13]</sup>, conferindo-lhes características físico-químicas interessantes; são constituídos principalmente por tetraedros de silício ( $\text{SiO}_4$ ) e octaédros de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_6$ ), na presença de outros elementos como sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, como indicadores do tipo argilomineral a que se refere <sup>[12]</sup>. Cada argilomineral possui características próprias que definem sua utilização na indústria.

Entre os argilominerais mais comuns estão a caulinita, a esmectita e a illita. Basicamente, a diferença entre esse grupos são o tipo de estrutura e as possíveis substituições dentro dessas estruturas. O grupo das caulinitas apresenta estrutura do tipo 1:1, ou seja, uma folha octaédrica seguida por uma folha tetraédrica, com um reduzido espaço entre as camadas para a entrada de água ou outros íons. Dessa forma, esse grupo não apresenta estrutura expansível, não sendo possível modificar sua distância basal. Assim, dificilmente ocorre substituição isomórfica em sua estrutura. O grupo da illitas apresenta estrutura 2:1, uma camada tetraédrica seguida por uma octaédrica e novamente uma tetraédrica. Como esses argilominerais são encontrados em solos rico em potássio, entre as suas camadas existem cátions  $\text{K}^+$  “fixos”, dificultando a penetração de água e outros íons, e, portanto, sendo pouco expansíveis. O grupo das esmectitas também apresenta estrutura do tipo 2:1, porém

são muito expansíveis, permitindo a entrada de moléculas de água e a substituição dos cátions que se encontram entre as camadas, na região interlamelar, podendo ter sua distância basal variável [12, 14]. A **Figura 1** apresenta as estruturas dos diferentes grupos argilominerais.

**Figura 1** – Representações das estruturas dos diferentes argilominerais: (a) representação simplificada dos tetraédros e octaédros; (b) representação espacial dos tetraédros e octaédros; (c) representação simplificada caulinita, ilitas, esmectitas

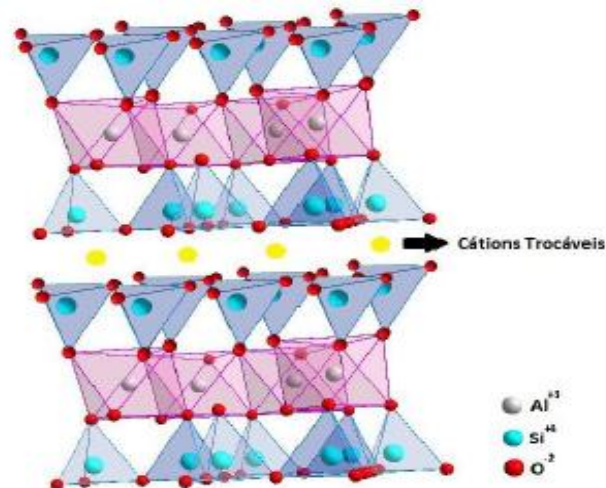


Fonte: CAMPOS, 2011

Por possuírem essa estrutura, as esmectitas são os argilominerais mais interessantes do ponto de vista tecnológico, com aplicações em diversas áreas [1, 15]. Dentre as esmectitas, a mais abundante na natureza é a montmorilonita, que tem recebido especial atenção em aplicações tecnológicas nos últimos anos devido a sua alta capacidade de adsorção [16-19]. Sua estrutura cristalina é lamelar, e está representada na **Figura 2**.

A estrutura da montmorilonita é constituída por duas folhas hexagonais sobrepostas, cada uma delas formada por grupos tetraédricos de silicato (SiO<sub>4</sub>) e uma folha central formada por grupos octaédricos de alumínio (Al(OH)<sub>6</sub>), unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às duas camadas. Possui cátions localizados na região interlamelar, que podem ser trocados por outros cátions ou moléculas, modificando suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente alterando seu espaçamento basal [8].

**Figura 2** – Estrutura cristalina da montmorilonita



Fonte: Figura do autor

Apresenta fórmula geral  $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$ , na qual M indica o cátion trocável presente no espaço interlamelar, e havendo substituição isomórfica nos sítios octaédricos, ou seja, átomos de alumínio sendo substituídos por átomos de magnésio. Essa substituição gera os mais importantes sítios ativos presente nas superfícies das argilas, sendo o excesso de carga negativa distribuído pelos oxigênios da superfície, resultando em uma superfície altamente ácida [20, 21].

Além de todas as propriedades peculiares da montmorilonita, apresentam também baixo custo, facilidade de obtenção e purificação e possibilidade de reutilização. Podem também ter sua estrutura modificada quimicamente pela inserção de moléculas orgânicas ou inorgânicas, possibilitando agregar funcionalidades a fim de intensificar suas propriedades físico-químicas [10]. Se apropriando dessas características, muitos estudos vem sendo realizados utilizando argilas modificadas nas mais diversas áreas, como na remoção de contaminantes do meio ambiente e na construção de sensores químicos [16,20, 22-28].

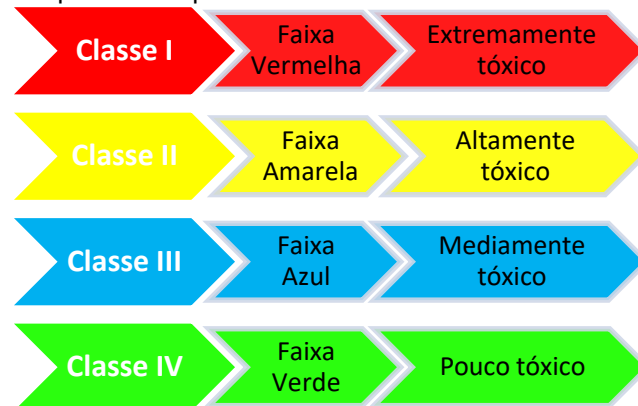
## 1.1 OS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

A preocupação com a qualidade das águas, solos, organismos vivos e meio ambiente vem aumentando nos últimos anos. Atenção especial tem sido dada a problemas ambientais associados à presença de contaminantes, tais como metais pesados e pesticidas, derivados de atividades industriais e agrícolas. Na indústria agrícola, o uso de agroquímicos para o controle de organismos é uma preocupação

atual, pois eles se dissolvem no solo, e agravam o risco de contaminação superficial e subterrânea [29-36].

A palavra pesticida pode ser definida, segundo a *União Internacional de Química Pura e Aplicada* (IUPAC), como substância bioativa utilizada como fim a destruição e o combate, bem como a prevenção de espécies indesejáveis que possam ser encontradas como interferentes durante as etapas de produção, colheita, processamento, transporte e armazenamento de alimentos e produtos agrícolas [37]. Podem ser classificados de diferentes modos: de acordo com o seu modo de ação e organismo alvo, como herbicidas, fungicidas, inseticidas, etc.; de acordo com sua estrutura química, como organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc.; ou de acordo com sua toxicidade, como classe I, II, III e IV [38]. A **Figura 3** apresenta as diferentes classes de toxicidade desses compostos.

**Figura 3** – Classificação de pesticidas quanto à toxicidade



Fonte: Figura do autor

No Brasil, os órgãos responsáveis pela legislação vigente sobre pesticidas são o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cada órgão é responsável por determinado tipo de avaliação do produto, de modo independente do outro. O IBAMA é responsável pela avaliação ambiental, ou seja, avalia quais os riscos e danos ao meio ambiente a utilização de determinado pesticida pode ocasionar. Ao MAPA cabe a responsabilidade da avaliação agrônômica, ou seja, avalia a eficiência e o potencial de uso na agricultura. Cabe a ANVISA a avaliação toxicológica, indicando o quão tóxico o produto é para a população e em quais condições o seu uso é seguro [39].

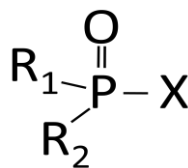


Sem dúvida, o uso de pesticidas provoca inquestionáveis benefícios no aumento da produção agrícola, uma vez que são eficazes no combate às pragas. Entretanto, sua utilização em demasia pode gerar graves problemas ambientais, devido a sua toxicidade, baixa biodegradabilidade e alto potencial carcinogênico, tornando-os sérias ameaças aos organismos vivos e ao meio ambiente <sup>[40]</sup>.

A exposição humana prolongada frente a pesticidas pode acarretar diversos danos à saúde, como problemas na visão, em funções sensoriais e cognitivas, no sistema nervoso, mortalidade infantil, doença de *Alzheimer*, carcinogenicidade, neurotoxicidade, entre outros <sup>[41-48]</sup>. Essa contaminação pode ocorrer pela exposição a baixos níveis da substância por um longo período de tempo, devido a circulação e acumulação em águas, ar, solo e cadeia alimentar. Pode ocorrer também contaminação por exposição ocupacional, devido à produção, transporte e aplicação de pesticidas e devido à moradia próxima a locais com altas concentrações de pesticidas <sup>[41,42]</sup>.

Dentre os pesticidas mais utilizados na agricultura, merece destaque a classe dos organofosforados (OP), encontrados principalmente em inseticidas. Essa classe de compostos é formada por, principalmente, ésteres de ácido fosfórico e seus derivados <sup>[49]</sup>. A estrutura química geral desses compostos é apresentada na **Figura 4**, na qual R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam grupos alcóxilas e X um halogênio, grupos alcóxidos, grupos alquil aminas, entre outros <sup>[49]</sup>.

**Figura 4** – Estrutura química geral de um organofosforado



Fonte: Figura do autor

Inicialmente os organofosforados foram utilizados na agricultura em substituição aos organoclorados, por apresentarem tempo de meia vida inferior, sendo menos persistentes ao meio ambiente. Porém, apresentam propriedades altamente tóxicas para os vertebrados em geral, como mamíferos e peixes, e seu consumo e exposição estão diretamente ligados a casos de intoxicações e mortes em todo o mundo <sup>[50-52]</sup>.

Segundo relatório do IBAMA, o organofosforado clorpirifós tem sido muito aplicado no Brasil nos últimos anos, visto que em 2017 foi o 13º ingrediente ativo mais vendido, como mostra a **Tabela 1** <sup>[53]</sup>.

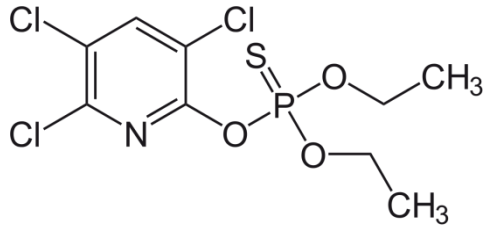
**Tabela 1** – Relatório de vendas de ingredientes ativos no Brasil

<b>Os 10 ingredientes ativos mais vendidos 2017</b>		
<b>Unidade de medida: toneladas de IA</b>		
<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Vendas (ton. IA)</b>	<b>Ranking</b>
Glifosato e seus sais	173.150,75	1º
2,4-D	57.389,35	2º
Mancozebe	30.815,09	3º
Acefato	27.057,66	4º
Óleo mineral	26.777,62	5º
Atrazina	24.730,90	6º
Óleo vegetal	13.479,17	7º
Dicloreto de paraquate	11.756,39	8º
Imidacloprido	9.364,57	9º
Oxicloreto de cobre	7.443,62	10º
Enxofre	7392,44	11º
Diurom	6999,47	12º
<b>Clorpirifós</b>	<b>6471,19</b>	<b>13º</b>

Fonte: IBAMA/ Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto 4.074/2002 (Dados atualizados em 25/06/2018)

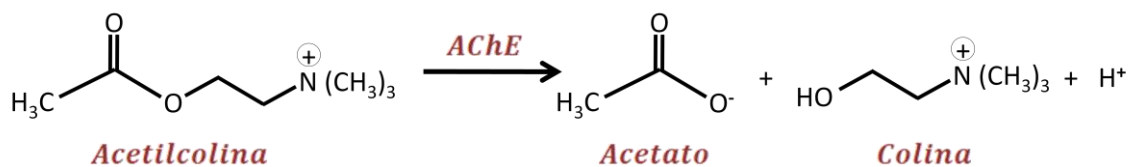
O clorpirifós, também conhecido como *tiofosfato o,o-dietil-o(3,5,6-tricloro-2-piridila)* e com fórmula molecular  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ , apresenta baixa solubilidade em água e é pertencente a classe II da classificação quanto a toxicidade, ou seja, é altamente tóxico. Sua fórmula estrutural é apresentada na **Tabela 2**, juntamente com suas propriedades. Pode ser absorvido pelo organismo humano através da pele, mucosas e vias respiratórias <sup>[52]</sup>. Estudos mostram que a exposição via intrauterina de camundongos ao pesticida provoca alterações hormonais na tireóide <sup>[54-55]</sup>, bem como a exposição por via oral interfere diretamente no sistema reprodutivo masculino, provocando alterações nos testículos, diminuição da contagem de espermatozóides e da fertilidade animal <sup>[56]</sup>.

**Tabela 2** – Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do clorpirifós

<i>Propriedades do Clorpirifós</i>	<i>Fórmula Estrutural</i>
<p><b>Classificação Toxicológica:</b> classe II</p> <p><b>Massa Molar:</b> 350,59 g mol<sup>-1</sup></p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS</p> <p><b>Pressão de Vapor:</b> 1,82 x 10<sup>-5</sup> mmHg (25 °C)</p> <p><b>Ponto de Fusão:</b> 42- 43,5 °C</p> <p><b>Solubilidade em água:</b> 1,4 mg L<sup>-1</sup> (25°C)</p>	

Fonte: Eaton, D. L. *et al*, 2008 [67].

O mecanismo de ação desse composto, igualmente ao de qualquer organofosforado, é através da inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), enzima da classe serina hidrolase, responsável por catalisar a hidrólise de ésteres, especialmente de ésteres de colina. O corpo humano produz AChE, que atua na neurotransmissão colinérgica central e periférica, degradando a acetilcolina (ACh). É a ACh quem transmite a mensagem de um neurônio a outro, e estruturalmente possui em sua molécula um grupo éster e uma amina quaternária, sendo de primordial importância para a manutenção de diversas funções fisiológicas [58,59]. A ACh é hidrolisada a colina e ácido acético pela ação da AChE. A reação de hidrólise é mostrada na **Figura 5**.

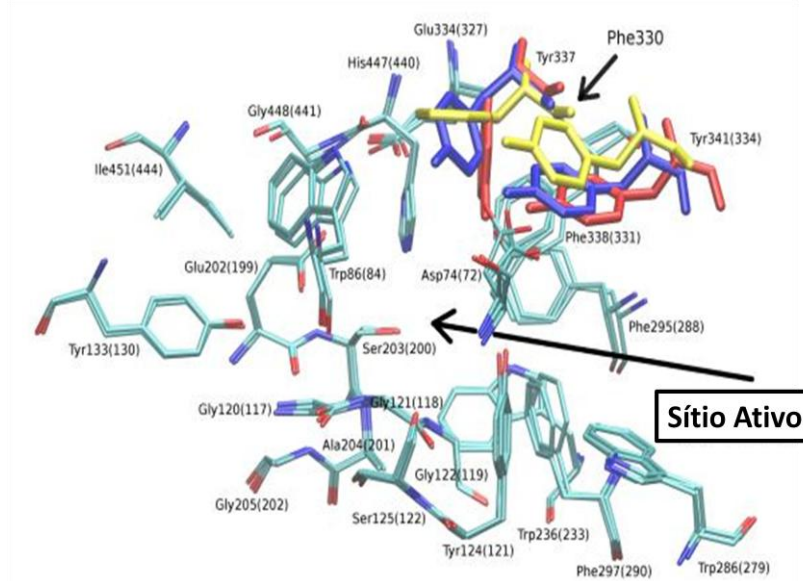
**Figura 5** – Hidrólise da acetilcolina pela ação da AChE

Fonte: Figura do autor

Depois de hidrolisada a colina é transportada novamente para a terminação nervosa, onde será reutilizada na síntese de novas ACh. Dessa forma, se a enzima AChE perde sua função, há um acúmulo de ACh nas fendas sinápticas, causando a interrupção na transmissão dos impulsos nervosos, levando a uma série de danos à saúde, como perda do controle muscular, convulsões, parada cardíaca e até a morte [60].

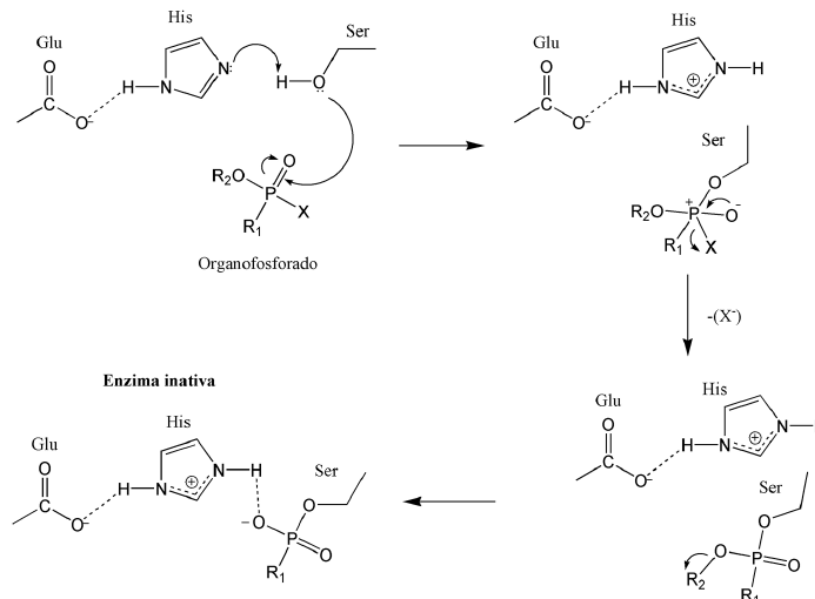
Os compostos organofosforados inibem a AChE, uma vez que promovem uma ligação covalente no sítio ativo da enzima. A enzima tem seu sítio ativo caracterizado por três aminoácidos essenciais: serina, histidina e ácido glutâmico (Ser 200-His 440-Glu 327), como mostrado na **Figura 6**. A inibição ocorre pela fosforilação da serina, resultando em uma ligação química forte da histidina protonada e o átomo de oxigênio do inibidor <sup>[61]</sup>. O mecanismo clássico de inibição da AChE por compostos organofosforados é apresentado na **Figura 7**.

**Figura 6** – Sítio ativo da enzima AChE composto pela tríade (Ser 200-His 440-Glu 327)



Fonte: <http://www.ncbr.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html>

**Figura 7** – Mecanismo clássico de inibição da AChE por pesticidas organofosforados



Fonte: Sgobbi, 2016 <sup>[61]</sup>.

A metodologia utilizada rotineiramente para ensaios com pesticidas, que promove alta precisão e confiabilidade, e também recomendada pela ANVISA, é cromatografia líquida ou gasosa acoplada a um espectrômetro de massas. Porém, essas análises requerem complicados pré-tratamentos das amostras, instrumentação sofisticada, mão de obra operacional altamente treinada e qualificada e longos tempos de análises, o que acaba limitando suas aplicações [62, 63]. Nesse sentido, torna-se de extrema urgência o desenvolvimento de métodos analíticos simples e eficientes, capazes de monitorar os resíduos de pesticidas em gêneros alimentícios e amostras ambientais. Dessa forma, biossensores tem atraído muito o interesse devido a sua alta sensibilidade, simplicidade de construção, miniaturização e portabilidade. Com base nisso, vários biossensores eletroquímicos têm sido aplicados satisfatoriamente a detecção de organofosforados [64-69], partindo da inibição da enzima acetilcolinesterase [62,70].

## 1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS NA DETECÇÃO DE PESTICIDAS

Biossensores eletroquímicos baseados na inibição da AChE possuem numerosas vantagens, incluindo resposta rápida, alta sensibilidade, fácil operação, pequeno tamanho e baixo custo, tem atraído interesse como um promissor candidato para detecção de organofosforados, nos quais a AChE é imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho [66].

Song e colaboradores partiram de  $\text{MoS}_2$  dopado com nitrogênio e flúor, funcionalizados com nanopartículas de Ag, na fabricação de um biossensor para detecção de clorpirifós. O sensor proposto apresentou desempenho notável, com resposta rápida e baixos limites de detecção [62]. Sgobbi e colaborador desenvolveram um sensor bioinspirado empregando poliacrilamida funcionalizada, PHA, imobilizada na superfície de um eletrodo impresso para detecção dos organofosforados paraoxo-etil, fenitroion e clorpirifós. O sensor foi empregado utilizando técnicas amperométricas e apresentou limite de detecção (LD) 0,36, 0,61 e 0,83  $\mu\text{M L}^{-1}$ , respectivamente [64].

Lu e colaboradores desenvolveram um sensor altamente sensível a AChE, com nanobastões bimetálicos Pd@Au (NRs), o qual apresentou, nas condições ótimas, intervalo de concentração linear entre  $3,6 \times 10^{-12}$  e  $1,0 \times 10^{-7}$   $\text{mol L}^{-1}$  para o paraoxon, com limite de detecção de  $3,6 \times 10^{-12}$   $\text{mol L}^{-1}$  [66]. Lang e colaboradores

desenvolveram um sensível biossensor amperométrico a base de acetilcolinesterase, utilizando nanobastões de ouro, para detecção de pesticidas organofosforados. O biossensor foi aplicado na determinação de paraoxon e dimetoato, apresentando intervalo de concentração linear entre  $1,0 \times 10^{-9}$  e  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para o primeiro e  $5,0 \times 10^{-9}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para o segundo. Os limites de detecção foram de  $7,0 \times 10^{-10}$  e  $3,9 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> para paraoxon e dimetoato, respectivamente. O sensor construído apresentou boa estabilidade e sensibilidade, podendo ser aplicado a medidas em amostras de água [71].

Yu e colaboradores imobilizaram a AChE em nanotubos de carbono aminofuncionalizados, e empregaram na fabricação de um biossensor para detecção de organofosforados. Utilizaram paraoxon como modelo de pesticida, obtendo estabilidade e reprodutibilidade satisfatórias em intervalos de concentração lineares entre 0,2 e 1 nmol L<sup>-1</sup> e 1 e 30 nmol L<sup>-1</sup>, com LD de 0,08 nmol L<sup>-1</sup>. O biossensor foi satisfatoriamente aplicado na determinação de pesticidas em amostras vegetais [72].

Adicionalmente, com o rápido desenvolvimento da nanotecnologia, cada vez mais novos materiais vêm sendo utilizados na fabricação de biossensores eletroquímicos mais eficazes [65, 73-78]. Em particular, as argilas, especificamente a montmorilonita, tem se tornado um material atrativo para a utilização como matriz na imobilização de biomoléculas, justamente devido às propriedades citadas anteriormente [26, 28, 79-81]. Estudos recentes mostram a utilização de montmorilonita intercalada com diferentes moléculas orgânicas, como metilamina ou dimetilamina [82], trimetilamina [83], aminoácidos [84], ácido fólico [85], enzimas, entre outros [86, 87], na construção de sensores.

Lucena e colaboradores utilizaram filmes de montmorilonita sódica na construção de um sensor eletroquímico para a detecção de dopamina. O sensor foi obtido pela técnica de deposição layer-by-layer em vidro ITO, apresentou LD 1 µmol L<sup>-1</sup> e intervalo linear de concentração entre 5 e 150 µmol L<sup>-1</sup>. O sensor foi aplicado satisfatoriamente em amostras de urina humana, confirmando a possibilidade de utilização em amostras reais [19].

Unal e colaboradores fabricaram um sensor utilizando a técnica de *eletrospinnig*; a montmorilonita modificada com dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), e utilizando como polímero adicional polivinilalcool (PVA), foi utilizada na formação de nanofibras de PVA/PAMAM-Mt sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. A enzima piranose oxidase foi, então, imobilizada na superfície do

eletrodo, o qual posteriormente foi submetido a medidas amperométricas. A resposta linear para a glicose foi no intervalo de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, com LD de  $7,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> [88].

Abbaci *et al.* desenvolveram um sensível e seletivo sensor voltamétrico para monitoramento do fungicida propinebe, a partir da construção de um eletrodo de pasta de carbono modificado com Cu-montmorilonita, o qual apresentou baixo limite de detecção, por volta de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e intervalo linear entre 5 e 30 µM [40].

Songurtekin e colaboradores [84] fabricaram um biossensor eletroquímico pela modificação da argila montmorilonita com histidina e posterior imobilização da enzima laccase, o qual foi, então, aplicado para a detecção de catecol, por análise em fluxo, apresentando LD de  $4,2 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e intervalo linear entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de catecol.

Os estudos realizados por Zapp e colaboradores [70] mostraram o desenvolvimento de um sensor para detecção do pesticida metomil a partir da imobilização da enzima laccase na argila montmorilonita. O intervalo de concentração linear obtido foi de  $9,8 \times 10^{-7}$  a  $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e LD  $2,35 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. O sensor construído foi aplicado satisfatoriamente na detecção de metomil em amostras de tomate e cenoura.

Embora seja grande o número de trabalhos que utilizam montmorilonita modificada na construção de sensores e biossensores, poucos relatam a imobilização da AChE na argila. Na busca de trabalhos baseados na montmorilonita e na inibição enzimática da AChE encontra-se apenas dois trabalhos, utilizando nanofolhas de sílica, retiradas da montmorilonita. Em 2014, Li e colaboradores utilizaram a montmorilonita como precursora na preparação de nanofolhas de sílica carboxiladas (CSNSs), e juntamente com nanopartículas de Pt (Pt NP) e nafion, modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Nas condições ótimas, o sensor detectou metil paration e carbaril no intervalo de concentração  $1 \times 10^{-12}$  e  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> apresentando LDs de  $5,52 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> para metil paration e  $5,65 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> para o carbaril [89].

Yang e colaboradores também utilizaram a montmorilonita para preparar nanofolhas de SiO<sub>2</sub> (SNS), e estas na preparação de nanocompósitos. Para imobilizar a AChE utilizou-se a quitosana, e Nafion foi utilizado como uma membrana protetora a fim de promover a estabilidade do biossensor de AChE. O biossensor foi utilizado para detectar metil paration, clorpirifós e carbofurano em intervalos de

concentrações de  $1 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. O limite de detecção obtido para os três pesticidas foi de  $5 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup>. O biossensor desenvolvido apresentou boa sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade e baixo custo fornecendo assim uma nova ferramenta na análise de pesticidas no ambiente [44].

É possível notar que biossensores baseados na inibição da enzima AChE têm sido amplamente desenvolvidos para detecção de pesticidas organofosforados. Apesar das vantagens mostradas por esses dispositivos, são raramente aplicados em amostras reais devido ao alto custo da enzima, aliado a necessidade de condições perfeitamente controladas para garantir a estabilidade enzimática, e a possibilidade de inibição da AChE na presença de cátions metálicos ou moléculas orgânicas podendo levar a resultados não confiáveis [64].

Como alternativa a essas questões, pesquisas mostram o desenvolvimento de materiais biomiméticos, os quais exibem propriedades catalíticas semelhantes a das enzimas naturais, podendo, assim, superar esses inconvenientes e aumentar o desempenho do biossensor em relação à estabilidade e a sensibilidade [86, 90]. No caso da enzima AChE, devido apresentar alta massa molecular e estrutura complexa, a utilização de uma molécula que mimetize o sítio ativo da enzima se torna uma alternativa interessante [91].

Nesse sentido, Mascini e colaboradores utilizaram modelagem molecular para projetar diferentes sequências peptídicas baseadas na tríade catalítica presente no sítio ativo da AChE (*Ser-220; His-440; Glu-327*). Os resultados foram satisfatórios, uma vez que as moléculas projetadas interagiram com pesticidas organofosforados e carbamatos [92]. Santos e colaboradores utilizaram-se de um hexapeptídeo bioinspirado ( $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$ ) na construção de um sensor para detecção de diclorvós em amostras de alimentos, obtendo um LD de  $1,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, boa estabilidade e sensibilidade [91]. Em 2018, Rodrigues construiu um sensor bioinspirado em AChE, utilizando o hexapeptídeo ( $NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-$ ) que mimetizava o sítio ativo da enzima e nanopartículas de ouro, para a detecção de clorpirifós e carbofurano em amostras de tomate e batata; o sensor apresentou baixos LD para o carbofurano e clorpirifós, com valores de  $6,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> e  $4,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente [93].

Com base no exposto, o presente trabalho buscou a utilização de três diferentes sequências peptídicas ( $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$ ),



$(NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-)$ ,  $(NH_3^+ - His - Glu - Tyr - Lys - Pro - Ser - COO^-)$ , propostas por estudos de modelagem molecular, realizados em colaboração pelo Prof. Dr. Marcello Mascini, da Universidade de Teramo, Itália (UniTE), que mimetizam o sítio ativo da AChE para a modificação da argila montmorilonita, visando a construção de sensores eletroquímicos para detecção de pesticidas da classe dos organofosforados.

### 1.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas são bastante utilizadas para se detectar substâncias de interesse por serem relativamente simples e rápidas e por permitir uma análise mais detalhada das reações ocorridas no meio reacional.

#### 1.3.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

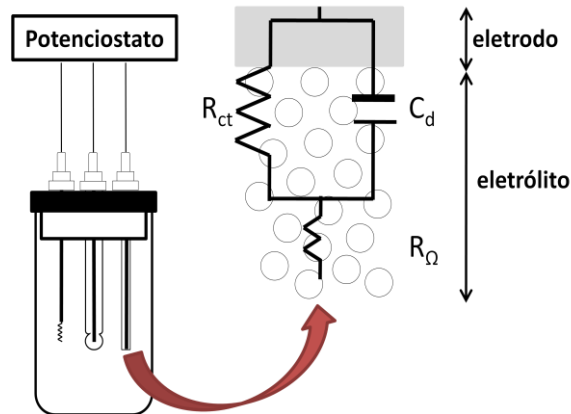
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução eletrolítica. Esta técnica eletroquímica envolve a aplicação de uma perturbação de sinal senoidal do potencial ou da corrente no sistema sob investigação, monitorando-se as relações potencial-corrente e obtendo-se a impedância e o ângulo de fase do sistema. Com essas medidas é possível avaliar processos como transporte de carga, capacitância redox e de dupla camada, condutividade de filmes, coeficientes de difusão, entre outros<sup>[94]</sup>.

A EIS é uma técnica bastante utilizada por permitir a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio, diferentemente de outras técnicas eletroquímicas que são dinâmicas. As informações são obtidas utilizando circuitos equivalentes ou modelos matemáticos, e admitindo-se a interface eletrodo/solução eletrolítica como sendo resultante da combinação de elementos de circuito elétricos passivos, isto é, resistência, capacitância e indutância<sup>[94]</sup>. A **Figura 8** mostra um sistema eletroquímico típico utilizado em EIS: uma célula eletroquímica de três eletrodos, com eletrodo de trabalho, referência e auxiliar; juntamente com o circuito equivalente para o sistema, no qual  $R_{ct}$  indica a resistência à transferência de carga,  $C_d$  a capacitância da dupla camada elétrica,  $R_\Omega$  resistência total do sistema.

Comumente, a impedância é expressa como função complexa, podendo ser desmembrada em uma parte real e uma parte imaginária, como mostra a equação (1), onde  $j$  é o número imaginário, por definição  $j = \sqrt{-1}$ .

$$Z = Z_{real} + jZ_{imaginário} \quad (1)$$

**Figura 8** – Célula eletroquímica típica com destaque para os processos ocorridos na interface do eletrodo de trabalho e eletrólito de suporte

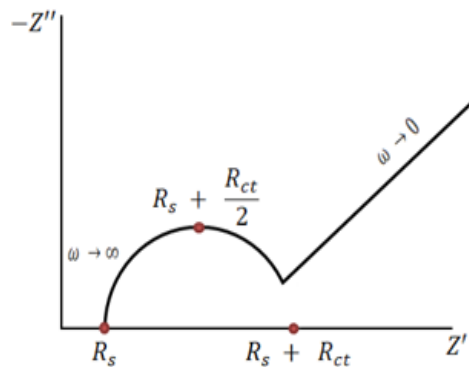


Fonte: Adaptado de Damos *et al*, 2004 <sup>[95]</sup>

A interpretação das medidas EIS é realizada por meio de três tipos de diagramas distintos: de Nyquist, de Bode e de frequência; os quais representam os processos físicos que ocorrem no sistema, sendo que a forma mais utilizada na análise dos resultados experimentais são as representações gráficas de Nyquist. Nesses diagramas, também conhecidos como diagrama no plano complexo, o componente real está localizado no eixo das abscissas e componente imaginário no eixo das ordenadas, e cada ponto representa a impedância em determinada frequência. A **Figura 9** mostra a representação geral de um diagrama de Nyquist, onde  $\omega$  é frequência angular,  $Z'$  componente real da impedância,  $Z''$  componente imaginário da impedância, com as principais informações que dele podem ser retiradas.

É possível observar duas regiões distintas no diagrama. A primeira região, à altas frequências, onde aparece um semicírculo, do qual podem ser retiradas informações quanto resistência da solução ( $R_s$ ), frequência máxima ( $f_{max}$ ), e resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ); seguido pela região linear a baixas frequências, indicando a presença ou não de processos de origem difusional <sup>[96, 97]</sup>.

**Figura 9** – Representação do Diagrama de Nyquist



O valor de  $R_s$  pode ser obtido pela primeira intersecção do semicírculo (frequência mais alta) com o eixo de impedância real, e a segunda intersecção (projeção do semicírculo) indica o valor da soma de  $R_s$  e  $R_{ct}$ . O valor de  $R_{ct}$  está associado à transferência de elétrons que ocorre nos processos de oxidorredução na interface eletrodo/eletrólito, indicando a facilidade ou dificuldade na transferência eletrônica; um maior valor  $R_{ct}$  indica que há uma dificuldade dos elétrons chegarem até a superfície eletródica. Como esses parâmetros podem ter seus valores modificados de acordo com diferentes materiais que possam estar immobilizados na superfície do eletrodo, e também relacionados com a concentração do analito presente no meio reacional, a EIS se torna uma eficiente técnica para aplicações analíticas.

### 1.3.2 Voltametria Cíclica

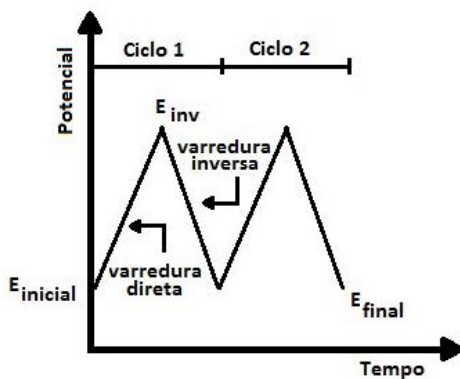
A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica muito versátil que permite o estudo de espécies eletroativas presentes no meio reacional. Aliada a essa versatilidade, sua fácil instrumentação e medição tornam a VC uma técnica de ampla utilização nas mais diversas áreas da química. Frequentemente é o primeiro experimento a ser realizado, uma vez que fornece informações rápidas acerca de processos eletroquímicos, sejam estes em compostos, materiais biológicos ou na superfície de eletrodos, permitindo o estudo da cinética e dos mecanismos de reações <sup>[98]</sup>.

A técnica consiste na oxidação e redução de espécies eletroativas presentes no meio reacional, devido à aplicação de uma corrente, a qual é medida em função da aplicação controlada de um potencial. O intervalo de varredura de potencial é realizado a uma velocidade constante  $v$ , tendo o potencial inicial a mesma

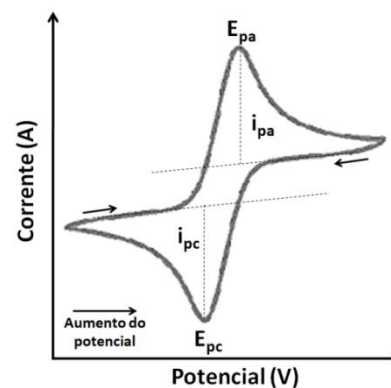
magnitude do potencial final ( $E_f = E_i$ ). Obtém-se, dessa forma, uma curva de intensidade de corrente ( $i$ ) em função do potencial aplicado ( $E$ ), denominada voltamograma cíclico. A **Figura 10** apresenta o sinal de excitação típico e um voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível.

**Figura 10** – (a) Sinal de excitação típico para voltametria cíclica: forma de onda triangular; (b) Representação esquemática de um voltamograma cíclico, com as indicações dos potenciais e correntes de picos

(a)



(b)



Fonte: Figuras adaptadas de WANG, 2001<sup>[99]</sup> e GREEF *et al*, 1985<sup>[100]</sup>.

Vários parâmetros podem ser retirados de um voltamograma cíclico, tais como potenciais de pico anódico e catódico ( $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ ), correntes de picos anódico e catódico ( $i_{pa}$  e  $i_{pc}$ ), diferença entre potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ). A análise desses parâmetros, juntamente com variação da velocidade de varredura e variação de concentração, permite inferir sobre o mecanismo de um processo. A **Tabela 3** mostra esses critérios.

**Tabela 3** – Dependência de  $i_p$ ,  $C$  e  $E_p$  com a  $v$  para alguns tipos mais comuns de processos eletródicos

<b>Mecanismo</b>	<b>Dependência de <math>i_p</math> com <math>v</math></b>	<b>Dependência de <math>i_p</math> com <math>C</math></b>	<b>Dependência de <math>E_p</math> com <math>v</math></b>	<b><math>i_{pa}/i_{pc}</math></b>
<b>Reversível</b>	$i_p \propto v^{1/2}$	Linear	$E_p$ é independente de $v$	$i_{pa} / i_{pc} = 1$ para todas velocidades
<b>Irreversível</b>	$i_p \propto v^{1/2}$	Linear	$E_p$ torna-se mais negativo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc} = 0$ para todas velocidades
<b>Eletroquímico-Químico</b>	Aproxima-se de casos reversíveis com o aumento de $v$	Geralmente linear	$E_p$ é mais positivo que casos reversíveis; $E_p$ torna-se mais negativo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc} \rightarrow 1$ com o aumento da velocidade
<b>Químico-Eletroquímico</b>	$i_p/v^{1/2}$ versus $v$ diminui com o aumento de $v$	Frequentemente não linear $i_p/C <$ casos reversíveis	$E_p$ torna-se mais positivo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc}$ aumenta com o aumento da velocidade
<b>Regenerativo</b>	Aproxima-se de casos reversíveis com o aumento de $v$	Frequentemente não linear; $i_p/C >$ casos reversíveis	$E_p$ torna-se mais positivo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc} \approx 1$ para todas as velocidades
<b>Adsorção de Reagentes</b>	$i_p$ aumenta com o aumento de $v$	Não Linear	$E_p$ torna-se mais negativo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc} \leq 1$ ; próximo a 1 para baixas velocidades
<b>Adsorção de Produtos</b>	$i_p$ diminui com o aumento de $v$	Não Linear	$E_p$ torna-se mais positivo com o aumento de $v$	$i_{pa} / i_{pc} \geq 1$ ; próximo a 1 para baixas velocidades

Tabela Adaptada de WANG, 2001 <sup>[99]</sup>.

## CONCLUSÃO

A modificação da argila montmorilonita com as sequências peptídicas 1 ( $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$ ), 2 ( $NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-$ ) e 3 ( $NH_3^+ - His - Glu - Tyr - Lys - Pro - Ser - COO^-$ ) foi demonstrada pelas técnicas de caracterização análise térmica, difração de raios X e infravermelho, bem como pelas técnicas eletroquímicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A partir da diferença nas curvas DTG argila/mix e no aumento das bandas de IR mix/argila, foi possível evidenciar as interações argila-peptídeos, que ficaram comprovadas pela análise de DRX. A presença das sequências peptídicas adsorvidas na argila afeta a orientação e o arranjo das partículas de montmorilonita, uma vez que os peptídeos podem se localizar entre suas lamelas, facilitando a abertura ou fechamentos destas de acordo com suas concentrações, pHs, naturezas e pesos moleculares.

Os voltamogramas cíclicos para os eletrodos modificados com SWy-1 e mixes (argila modificada com as sequências peptídicas) mostraram um perfil diferente do obtido para o branco Pt, e o recobrimento superficial ( $\theta$ ) foi estimado para cada eletrodo. Utilizando a técnica EIS, foi possível observar uma diminuição na resistência a transferência de carga ao se comparar a SWy-1 com os mixes. Essa diminuição ocorreu pela presença das sequências peptídicas na estrutura da montmorilonita, uma vez que as interações ocorridas podem se dar de maneiras diferentes. O estudo eletroquímico do filme da argila montmorilonita mostrou que o transporte de  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  através da camada de montmorilonita é limitado pela heterogeneidade do filme formado na superfície do eletrodo, devido as partículas de argila formarem placas sobrepostas não regulares, observada nas microscopias.

A interação argila modificada-pesticida clorpirifós foi demonstrada por DSC. A inserção da molécula de pesticida provocou uma perturbação na quantidade e nos tipos de águas presentes no sistema. Os três mixes apresentaram comportamentos distintos frente ao pesticida devido a sequência de aminoácidos que compõe a cadeia peptídica serem diferentes. Dentre os três, o mix 2, montmorilonita modificada com a sequência ( $NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-$ ), apresentou menor interação, justamente devido a sua estrutura, o que pôde ser comprovado pelas imagens de microscopia.

Entre as três sequências peptídicas que mimetizam o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, as sequências 1 ( $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$ ) e 3 ( $NH_3^+ - His - Glu - Tyr - Lys - Pro - Ser - COO^-$ ) apresentaram bons resultados no que tange a interação argila-peptídeos-pesticida, podendo ser utilizadas satisfatoriamente, em substituição à enzima original, na construção de sensores eletroquímicos para detecção de clorpirifós.

Os sensores desenvolvidos apresentaram boa linearidade (sensor 1:  $R = 0,9997$ ; sensor 3:  $R = 0,9999$  e  $R = 0,9950$ , para duas faixas de concentrações) e limites de detecção de  $2,40 \times 10^{-10}$  e  $1,41 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  para os sensores 1 e 3, respectivamente. A aplicação em amostras de tomate, sem qualquer pré-tratamento, obteve recuperação aceitável dentro da faixa recomendada pela ANVISA.

Portanto, com esse trabalho, foi possível concluir que o desenvolvimento de sensores a base de montmorilonita modificada com sequências peptídicas que mimetizam o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase pode ser satisfatoriamente realizado, como sendo uma alternativa rápida, com menores custos e eficiente na determinação do pesticida clorpirifós em amostras de alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAVALCANTI, R. K. B. C.; BRASILEIRO, C. T.; MACEDO R. O.; FERREIRA, H. S. Maquiagem mineral desenvolvida a partir de argilas bentoníticas naturais e tratadas organofilicamente. **Cerâmica**, v 64, n 370, 2018.
- [2] SILVA-VALENZUELA, M. G.; MATOS, C. M.; SHAH, L. A.; CARVALHO, F. M. S.; SAYEG, I. J.; VALENZUELA-DIAZ, F. R.; **Int. J. Modern Eng. Res.**, v 1, n 3, p 163 2013.
- [3] MURRAY, H. H.. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. **Appl. Clay Sci.**, v 17, n 5, p 207, 2000.
- [4] VISERAS, C.; AGUZZI, C.; CEREZO, P.; LOPEZ-GALINDO, A.. Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. **Appl. Clay Sci.** v 36, n 1, p 37, 2007.
- [5] CHRZANOWSKI, W.; KIM, S. Y.; NEEL, E. A. A.. Biomedical applications of clay. **Aust. J. Chem.**, v 66, n 11 p 1315, 2013.
- [6] FERREIRA, H. S.; CAMPOS, L. F. A.; MENEZES, R. R.; CARTAXO, J. M.; SANTANA, L. N. L.; NEVES, G. A.; FERREIRA, H. C.. Influência das variáveis de processo na obtenção de argilas. **Cerâmica**, v 59, p 277, 2013.
- [7] BERTUOLI, P. T. Desenvolvimento e caracterização de uma tinta em pó base poliéster contendo montmorilonita funcionalizada com silano. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologias) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- [8] BARUEL, A. F.; DUTRA, R. C. L.; BALDAN, M. R.; LOPES, C. M. A.; CASSU, S. N.. Organofilização e silanização de argila bentonita. **Química Nova**, v 41, n 2, 2018.
- [9] AHMED, A.; CHAKER, Y.; BELARBI, E. H.; ABBAS, O.; CHOTARD, J. N.; ABASSI, H. B.; NGUYEN VAN NHIEU, A.; HADRI, M. E.; BRESSON, S.. XRD and ATR/FTIR investigations of various montmorillonite clays modified by monocationic and dicationic imidazolium ionic liquids. **Journal of Molecular Structure**, v 1173, p 653, 2018.
- [10] TEIXEIRA-NETO, E.; TEIXEIRA-NETO, A. A.. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 809-817, 2009.
- [11] CHAGAS, A. P.. **Argilas: as essências da terra**. 2ª Edição. São Paulo: Ed. Moderna, 1996.
- [12] SANTOS, P. S.. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. 2ª Edição. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1989.
- [13] MACKENZIE, R. C.. The classification and nomenclature of clay minerals. **Clay Minerals Bull.**, v 4, p 52, 1959.



- [14] CAMPOS, T. M. P.. **Argilominerais: Propriedades e Aplicações**. PUC-Rio, 2011.
- [15] MACHADO, M. C. P.; LANGBEHN, OLIVEIRA, J. T. C. M.; ELYSEU, F.; CARGNIN, M.; DE NONI JR A.; FRIZON, T. E. A.; PETERSON, M.. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. **Cerâmica**, v 64, n 370, 2018.
- [16] BARROS, A.; FERREIRA, M.; CONSTANTINO, C. J. L.; BORTOLETO, J. R. R.; FERREIRA, M.. Synergy between polyaniline and omt clay mineral in langmuir–blodgettfilms for the simultaneous detection of traces of metal íons. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v 7, p 6828, 2015.
- [17] BARROS, A.; FERREIRA, M.; CONSTANTINO, C. J. L.; FERREIRA, M.. Nanocompositesbased on LbL films of polyaniline and sodium montmorillonite Clay. **Synth. Met.**, v 197, p 119, 2014.
- [18] MOUSTY, C.; Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—newtrends. **Applied Clay Science**, v 27, p 159, 2004.
- [19] LUCENA, N. C.; MIYAZAKI, C. M.; SHIMIZUB, F. M.; CONSTANTINO, C. J. L.; FERREIRA, M.. Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine. **Applied Surface Science**, v 436, p 957-966, 2018.
- [20] SADRI, S.; JOHNSON, B. B.; RUYTER-HOOLEY, M.; ANGOVE, M. J.. The adsorption of nortriptyline on montmorillonite, kaolinite and gibbsite. **Applied Clay Science**, v 165, p 64-70, 2018.
- [21] CHEN, T.; ZHAO, Y., SONG, S.. Comparison of colloidal stability of montmorillonite dispersion in aqueous NaCl solution with in alcohol-water mixture. **Powder Technology**, v 322, p 378-385, 2017.
- [22] FITCH, A. Clay-modified electrodes: a review. **Clays and Clay Minerals**, v 38, n 4, p 391-400, 1990.
- [23] DEMIR, F.; DEMIR, B.; YALCINKAYA, E. E.; CEVIK, S.; DEMIRKOL, D. O.; ANIK, U.; TIMUR, S.. Amino acid intercalated montmorillonite: electrochemical biosensing applications. **RSC Advances**, v 4, n 91, p 50107-50113, 2014.
- [24] SOUZA, G. R.; FERTONANI, L. F.; PASTRE, I. A.. Estudo espectro eletroquímico de sistemas estruturados argila-corante. **Eclética Química**, v 28, n 1, p 77-83, 2003.
- [25] KULA, P., NAVRÁTILOVÁ, Z. Voltammetric copper (II) determination with a montmorillonite-modified carbon paste electrode. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 354(5-6), p. 692-695, 1996.

- [26] FERTONANI, F. L.; LUPI, C. P.; MARTINS, L. A.; PASTRE, I. A.; SANTOS, C. C. M.; GUIZZELINI, F. C.; FRANZIN, B. T.. Thermal and electrochemical study of Fe(III) organophilic montmorillonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 131, p 713-723, 2016.
- [27] PASTRE, I. A.; NASCIMENTO OLIVEIRA, I.; MOITINHO, A. B. S.; SOUZA, G. R.; IONASHIRO, E. Y.; FERTONANI, F. L. Thermal behaviour of intercalated 8-hydroxyquinoline (oxine) in montmorillonite clay. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 75, p 663, 2004.
- [28] LUPI, C. P.; FRANZIN, B. T.; PEREIRA, P. R.; DAMACENO, A. J.; DADAMOS, T. R. L.; SANTOS, C. C. M.; PASTRE, I. A.; FERTONANI, F. L.. Thermal and electrochemical studies of Cu(II) 8-hydroxyquinoline organophilic montmorillonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v 131, p 799-810, 2018.
- [29] PARK, Y.; SUN, Z.; AYOKO, G. A.; FROST, R. L.. Removal of herbicides from aqueous solutions by modified forms of montmorillonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v 415, p 127–132, 2014.
- [30] HILLIE, T.; HLOPHE, M.. Nanotechnology and the challenge of clean water. **Nat. Nano**, v 2, p 663, 2007.
- [31] TRIGO, C.; KOSKINEN, W.C.; CELIS, R.; SADOWSKY, M.J.; HERMOSIN, M.C.; CORNEJO, J.. Bioavailability of organoclay formulations of atrazine in soil. **J. Agric. Food Chem.**, v 58, p 11857-11863, 2010.
- [32] CABRERA, A.; COX, L.; SPOKAS, K. A.; CELIS, R.; HERMOSIN, M. C.; CORNEJO, J.; KOSKINEN, W. C.. Comparative sorption and leaching study of the herbicides fluometuron and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) in a soil amended with biochars and other sorbents. **J. Agric. Food Chem.**, v 59, p 12550, 2011.
- [33] HERMOSIN, M. C.; CELIS, R.; FACENDA, G.; CARRIZOSA, M. J.; ORTEGA-CALVO, J.J.; CORNEJO, J.. Bioavailability of the herbicide 2,4-D formulated with organoclays. **Soil Biol. Biochem.**, v 38, p 2117-2124, 2006.
- [34] SOLOMON, R. D. J.; SANTHI, V. S.. Controlled release formulations of butachlor and oxadiazon – an evaluation of sorption/desorption. **J. Agron.**, v 6, p 370, 2007.
- [35] XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R.. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Appl. Clay Sci.**, v 49, p 255, 2010.
- [36] SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARINAS, B. J.; MAYES, A. M.. Science and Technology for Water Purification in the Coming Decades. **Nature**, v 452, p 301-310, 2008.
- [37] 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.

[38] BARBOSA, S. C. B.. Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa.

[39] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regularização de produtos – Agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro>> Acesso em 09 nov. 2018.

[40] ABBACI, A.; AZZOUZ, N.; BOUZNIT, Y.. A new copper doped montmorillonite modified carbon paste electrode for propineb detection. **Applied Clay Science**, v 90, p 130-134, 2014.

[41] MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAH, M.. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch. Toxicol.**, v 91, 549–599, 2017.

[42] BLANKSON, G.K.; OSEI-FOSU, P.; ADEENDZE, E. A.; ASHIE, D.. Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. **Food Control**, v 68, p 174–180, 2016.

[43] YU, Q.; LI, Y.; MA, A. Z.; LIU, W. F.; WANG, H. L.; ZHUANG, G. Q.. An efficient design strategy for a whole-cell biosensor based on engineered ribosome binding sequences. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 401, p 2891–2898, 2011.

[44] YANG, L.; & WANG, G-C.; LIU, Y-J.; & AN, J-J.; WANG, M.. Development of a stable biosensor based on a SiO<sub>2</sub> nanosheet–Nafion–modified glassy carbon electrode for sensitive detection of pesticides. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 405, p 2545–2552, 2013.

[45] CREMONESE, C.; FREIRE, C.; CAMARGO, A. M.; LIMA, J. S.; KOIFMAN, S.; MEYER, A.. Pesticide consumption, central nervous system and cardiovascular congenital malformations in the south and southeast region of Brazil. I **JOMEH**, v 27 p 474–486, 2014.

[46] HAYDEN, K. M.; NORTON, M. C.; DARCEY, D.; OSTBYE, T.; ZANDI, P. P.; BREITNER, J. C.; WELSH-BOHMER, K. A.. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the cache county study. **Neurology**, v 74, p 1524–1530, 2010.

[47] VOPHAM, T.; BROOKS, M. M.; YUAN, J. M.; TALBOTT, E. O.; RUDELL, D.; HART, J. E.; CHANG, C. C. H.; WEISSFELD, J. L.. Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: a case-control study using a geographic information system (GIS) to link SEER-Medicare and California pesticide data. **Environ. Res.**, v 143, p 68–82, 2015.

[48] KEIFER, M.C.; FIRESTONE, J.. Neurotoxicity of pesticides. **J. Agromed.**, v 12, p 17–25, 2007.

[49] ELERŠEK, T.; FILIPI, M.; Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, v 12, 243, 2016.

[50] ALINEJAD, S., ZAMANI, N., ABDOLLAHI, M., & MEHROUR, O. A narrative review of acute adult poisoning in Iran. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v 42(4), p 327–346, 2017.

[51] JOHN, H., VAN DER SCHANS, M. J., KOLLER, M., SPRUIT, H. E. T., WOREK, F., THIERMANN, H., & NOORT, D.. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. **Forensic Toxicology**, v 36(1), p. 61–71.

[52] BATISTA, T. J.. Efeitos da exposição crônica ao organofosforado clorpirifós sobre a função cardiorespiratória. 2018. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

[53] IBAMA. 2017. HISTORICO DE CONSUMO DE AGROTÓXICOS ENTRE 2000-2016 NO BRASIL. <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> Acesso em 15 de nov. de 2018.

[54] DE ANGELIS, S.; TASSINARI, R.; MARANGHI, F.; EUSEPI, A.; DI VIRGILIO, A.; CHIAROTTI, F.; RICCI, L.; VENEROSI PESCIOLINI, A.; GILARDI, E.; MORACCI, G.; CALAMANDREI, G.; OLIVIERI, A.; MANTOVANI, A. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. **Toxicol. Sci.**, v 108, n 2, p 311-9, 2009.

[55] HAVILAND, J. A.; BUTZ, D. E.; PORTER, W. P. Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. **Reprod. Toxicol.**, v 29, n 1, p 74-79, 2010.

[56] JOSHI, S. C.; MATHUR, R.; GULATI, N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. **Toxicol. Ind. Health**, v 23, n 7, p 439-44, 2007.

[57] EATON, D. L.; DAROFF, R. B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L. G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W. C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P. S.. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v 38, n 2, 2008.

[58] VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L.; MATEO, C.. An immobilized acetylcholinesterase as test system to screen new inhibitor drugs to treat Alzheimer's disease. **Sensors & Actuators B: Chemical**, v 278, p 196–201, 2019.

[59] KUČA, K.; SOUKUP, O.; MAREŠOVÁ, P.; KORABENČNÝ, J.; NEPOVIMOVÁ, E.; KLIMOVÁ, B.; HONEGR, J.; RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. C.. Current Approaches Against Alzheimer's Disease in Clinical Trials. **J. Braz. Chem. Soc.**, v 27, p 641–649, 2016.

- [60] ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES A. A.. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v 8, p 1818-1834, 2016.
- [61] SGOBBY, L. F. Desenvolvimento de um biosensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento. 2016. Tese. (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [62] SONG, D.; WANG, Y.; LU, X.; GAO, Y.; LI, Y.; GAO, F.. Ag nanoparticles-decorated nitrogen-fluorine co-doped monolayer MoS<sub>2</sub> nanosheet for highly sensitive electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. **Sensors and Actuators B**, v 267, p 5–13, 2018.
- [63] PAULA, C. G.; TOLEDO, R. A.; VAZ, C. M. P.; MARQUES, P. J.; BATISTUTI, J. P.; PASTRE, I. A.; SHIM, H.; FERTONANI, F. L.. A Solid Film Electrode of Intermetallic Ag<sub>2</sub>Hg<sub>3.02</sub> for the Direct Determination of Folic Acid in Fresh and Processed Fruit Juices. **Electroanalysis**, v 26, p 1 – 8, 2014.
- [64] SGOBBI, L. F.; MACHADO, S. A. S.. Functionalized polyacrylamide as an acetylcholinesterase-inspired biomimetic device for electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v 100, p 290–297, 2018.
- [65] ZHAO, H. Y.; JI, X. P.; WANG, B. B.; WANG, N.; LI, X. R.; NI, R. X.; REN, J. J.. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles--cyclodextrin/prussian blue chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v 65, p 23–30, 2015.
- [66] LU, X.; TAO, L.; SONG, D.D.; LI, Y.; GAO, F. M.. Bimetallic Pd@Au nanorods based ultrasensitive acetylcholinesterase biosensor for determination of organophosphate pesticides. **Sens. Actuators B Chem.**, v 255, p 2575–2581, 2018.
- [67] DING, J.; ZHANG, H.; JIA, F.; QIN, W.; DU, D.. Assembly of carbon nanotubes on a nanoporous gold electrode for acetylcholinesterase biosensor design. **Sens. Actuators B. Chem.**, v 199, p 284–290, 2014.
- [68] PENG, L.; DONG, S.Y.; WEI, W. B.; YUAN, X.J.; HUANG, T.L.. Synthesis of reticulated hollow spheres structure NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> and its application in organophosphate pesticides biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v 92, p 563–569, 2017.
- [69] SONG, D. D.; LI, Y.; LU, X.; SUN, M. X.; LIU, H.; YU, G. M.; GAO, F. M.. Palladium-copper nanowires-based biosensor for the ultrasensitive detection of organophosphate pesticides. **Anal. Chim. Acta**, v 982, p 168–175, 2017.
- [70] ZAPP, E. D. B.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sensors and Actuators B**, v 155, p 331–339, 2011.

- [71] LANG, Q.; HAN, L.; HOU, C.; WANG, F.; LIU, A.. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. **Talanta**, v 156-157, p 34–41, 2016.
- [72] YU, G.; WU W.; ZHAO, Q. ; WEI, X. ; LU, Q.. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v 68, p 288–294, 2015.
- [73] WEI, M.; WANG, J. J.. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. **Sens. Actuators B: Chem.**, v 211, p 290–296, 2015.
- [74] ZHOU, Q.; YANG, L.; WANG G. C.; YANG, Y.. Acetylcholinesterase biosensor based on SnO<sub>2</sub> nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides. **Biosens. Bioelectron.**, v 49, p 25–31, 2013.
- [75] ZHAI, C.; SUN, X.; ZHAO, W.; GONG, Z.; WANG, X.. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition. **Biosens. Bioelectron.**, v 42, p 124–130, 2013.
- [76] WEI, M.; ZENG, G.Y.; LU, Q.Y.. Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres. **Microchim. Acta**, v 181, p 121–127, 2014.
- [77] CANCAR, H.D.; SOYLEMEZ, S.; AKPINAR, Y.; KESIK, M.; GÖKER, S.; GUNBAS, G.; VOLKAN, M.; TOPPARE, L.. A novel acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v 8, p 8058–8067, 2016.
- [78] MOGHA, N. K.; SAHU, V.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K.; MASRAM, D. T.. Biocompatible ZrO<sub>2</sub> - reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection. **Materials and Design**, v 111, p 312–320, 2016.
- [79] AN, N.; ZHOU, C.H.; ZHUANG, X.Y.; TONG, D.S.; YU, W.H.. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Appl. Clay Sci.**, v 114, p 283–296, 2015.
- [80] TULLY, J.; YENDLURI, R.; LVOV, Y.. Halloysite clay nanotubes for enzyme immobilization. **Biomacromolecules**, v 17, p 615–621, 2016.
- [81] MOUSTY, C.. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v 396, p 315–325, 2010.

- [82] SELECI, M.; AG, D.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D.O.; GULER, C.; TIMUR, S.. Amine intercalated montmorillonite matrices for enzyme immobilization and biosensing applications. **RSC Adv.**, v 2, p 2112–2118, 2012.
- [83] DEMIR, B.; SELECI, M.; AG, D.; CEVIK, S.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D.; ANIK, U.; TIMUR, S.. Amine intercalated clay surfaces for microbial cell immobilization and biosensing applications. **RSC Adv.**, v 3, p 7513–7519, 2013.
- [84] SONGURTEKIN, D.; YALCINKAYA, E. E.; AG, D.; SELECI, M.; DEMIRKOL, D.O.; TIMUR, S.. Histidine modified montmorillonite: laccase immobilization and application to flow injection analysis of phenols. **Appl. Clay Sci.**, v 86, p 64–69, 2013.
- [85] BONGARTZ, R.; AG, D.; SELECI, M.; WALTER, J. G. G.; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D. O.; STAHL, F.; TIMUR, S.; SCHEPER, T.. Folic acid-modified clay: targeted surface design for cell culture applications. **J. Mater. Chem. B**, v 1, p 522–528, 2013.
- [86] SONMEZ, B.; SAYIN, S.; YALCINKAYA, E. E.; SELECI, D. A.; YILDIZ, H. B.; DEMIRKOL, D. O.; TIMUR, S.. Calixarene modified montmorillonite: a novel design for biosensing applications. **RSC Adv.**, v 4, p 62895–62902, 2014.
- [87] MAIGA, M.; YALCINKAYA, E. E.; SONMEZ, B.; PUGLIA, D.; YAVUZ, M.; DEMIRKOL, D. O.; KENNY, J. M.; TIMUR, S.. CTAB modified dellite: a novel support for enzyme immobilization in bio-based electrochemical detection and its in vitro antimicrobial activity. **Sensors Actuators B-Chem.**, v 235, p 46–55, 2016.
- [88] UNAL, B.; YALCINKAYA, E. E. ; DEMIRKOL, D. O.; TIMUR, S.. An electrospun nanofiber matrix based on organo-clay for biosensors: PVA/PAMAM-Montmorillonite. **Applied Surface Science**, v 444, p 542–551, 2018.
- [89] LI, C-P.; FAN, S.; YIN, C.; ZHANG, N.; DUA, S.; ZHAO, H.. Carboxylic silica nanosheet–platinum nanoparticle modified glass carbon electrodes for pesticide detection. **Anal. Methods**, v 6, p 1914, 2014.
- [90] SCOGNAMIGLIO, V., PEZZOTTI, G., PEZZOTTI, I., CANO, J., BUONASERA, K., GIANNINI, D., GIARDI, M.T., 2010. **Microchim. Acta**, v 170, n 3, p 215–225, 2010.
- [91] SANTOS, G. P.; SILVA, B. F.; GARRIDO, S. S.; MASCINI, 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.
- [92] 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 for pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9150–9156, 2008.

- [93] RODRIGUES, N. F. M.. Desenvolvimento de sensor bioinspirado em hexapeptídeo de enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas. 2018. Tese. (Doutorado em Química). Instituto de Química – UNESP, Araraquara.
- [94] KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.. Aplicações de QCM, EIS E SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v 27, n 6, p 970-979, 2004.
- [95] DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T.. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v 27, n. 6, p 970-979, 2004.
- [96] BARSOUKOV, E.; MacDONALD, J. R.. **Impedance spectroscopy: theory, experiment and applications**. 2<sup>a</sup> ed. - Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
- [97] ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, D.. **Electrochemical impedance spectroscopy**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008.
- [98] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, v 5, 1996.
- [99] WANG, J.. **Analytical Electrochemistry**. Ed. Wiley-VCH, 2<sup>a</sup> ed., New York, 2001.
- [100] GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J.. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, New York, John Wiley & Sons LTD, Ellis Horwood Limited, 1985.
- [101] MELO, L. O.. Preparação e caracterização de filmes finos sol-gel de N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dopados com Li<sup>+</sup> visando possível aplicação em arquitetura. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [102] ILER, R.. Multilayers of colloidal particles. **J. Colloid Interface Sci.**, v 21, p 569–594, 1966.
- [103] LEE, D.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E.. All-nanoparticle thin-film coatings. **Nano Lett.**, v 6, p 2305–2312, 2006
- [104] DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J.. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, p 210–211, 831–835, 1992.
- [105] DUBAS, S. T.; SCHLENOFF, J. B.. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. **Macromolecules**, v 32, p 8153–8160 1999.
- [106] RICHARDSON, J. J.; BJÖRNMALM, M.; CARUSO, F.. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. **Science**, v 348, n 6233, 2015.



- [107] VOSSEN, C. A. Nanocompósitos de ABS/PA e argilas organofílicas. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [108] PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V.. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v 54, n 330, p 213, 2008.
- [109] SOLOMONS, T. W. G.; CRAIG FRYHLE, C.. **Química Orgânica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: ed. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1996.
- [110] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: ed. Livros Técnicos e Científicos, 2000.
- [111] IONASHIRO, C. J.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 121, n. 26, p. 17-24, 1980.
- [112] WATT, I. M. **The Principles and Practice of Electron Microscopy**. New York: Cambridge University Press, 2nd ed., 1997.
- [113] CHEN, D.; SUN, X.; GUO, Y. QIAO, L.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-SnO<sub>2</sub>-chitosan nanocomposite. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, p. 315–321, 2015.
- [114] SEQUARIS, J. M.. Hexacyanoferrate(III) Transport in Coated Montmorillonite Clay Films. Effects of Water-Soluble Polymers. **Langmuir**, v 16, n 3, p 1368–1378, 2000.
- [115] BOZOKALFA, G.; AKBULUT, H.; DEMIR, B.; GULER, E.; GUMUS, Z. P.; DEMIRKOL, D. O.; ALDEMIR, E.; YAMADA, S.; ENDO, T.; COSKUNOL, H.; TIMUR, S.; YAGCI, Y.. Polypeptidefunctional surface for the aptamer immobilization: electrochemical cocainebiosensing. **Anal. Chem.**, v 88, n 7, p 4161–4167, 2016.