

Núbia Fernanda Marinho Rodrigues

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

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Hideko Yamanaka
Coorientador: Flávio Santos Damos

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

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

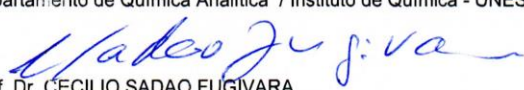
AUTORA: NÚBIA FERNANDA MARINHO RODRIGUES

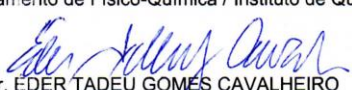
ORIENTADORA: HIDEKO YAMANAKA

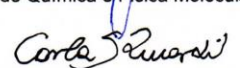
COORIENTADOR: FLÁVIO SANTOS DAMOS

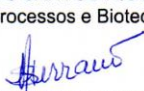
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


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


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


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


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


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

Araraquara, 09 de março de 2018

Em especial...

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

À minha querida avó Maria, por sua presença constante.

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jesus, obrigada por tudo!

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 13: Imagens de SEM-FEG das partículas magnéticas com magnificação de 100.000 e 150.000X respectivamente.	58
Figura 14: Imagens de MET das partículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$ com ampliação de 50 e 20 nm respectivamente.	60
Figura 15: Histograma obtido pela contagem das partículas de (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$, respectivamente.	61
Figura 16: Curvas de TG para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$	63
Figura 17: Curvas de TG e DTA para (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$	64
Figura 18: Difratoograma obtido para: (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD-PEP}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DAD-PEP}$ após oxidação do material na superfície do eletrodo.	66
Figura 19: Difratoograma da magnetita obtido na Base de Dados de Estruturas Cristalinas.	66
Figura 20: Estrutura química da sequência peptídica (SEQPEP1).	67
Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos para a solução de NaClO_4 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0 (—) e na mesma solução de eletrólito contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de SEQPEP1 (—). Velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	68
Figura 22: Voltamograma de onda quadrada obtido para a SEQPEP1 em meio NaClO_4 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $f = 25$ Hz, $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV. Ajuste da linha de base dos voltamogramas pelo software NOVA 2.1.	69
Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO_4 0,1 mol L^{-1} em pH 7,5. Parâmetros utilizados: $f = 100$ Hz, $a = 90$ mV, $\Delta E_s = 6$ mV. ET = carbono vítreo modificado com nanopartículas magnéticas conforme inserido na figura. (B) Voltamograma de pulso diferencial em solução PBS 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $a = 50$ mV, $v = 5$ mV s^{-1} e intervalo de pulso 70 ms. P_1 (primeiro pico) e P_2 (segundo pico).	70

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

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

Figura 41: Gráfico de tendência: intensidade de corrente para o nível máximo e mínimo de cada variável.89

Figura 42: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s^{-1}) para o eletrodo de trabalho sem modificação e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).90

Figura 43: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s^{-1}) para o eletrodo de trabalho modificado com NPs/CS-DADD-PEP e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).90

Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada em meio de NaClO_4 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0 da hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: $f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura.92

Figura 45: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em meio de NaClO_4 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0. Reação de hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: $f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura93

Figura 46: Gráfico da intensidade de corrente em função do tempo de incubação do pesticida, em (A) carbofurano e (B) clorpirifós. Ambos na concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do tempo de pré-concentração.94

Figura 47: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do peptídeo com o pesticida (—) em meio de ferri/ferro 5,0 mmol L^{-1} vs $\text{Ag|AgCl|KCl}_{\text{sat}}$ no intervalo de potencial de -0,2 a +1,3 V com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$95

Figura 48: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do

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

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

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

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

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

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

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

Figura 55: Histograma da intensidade de corrente do peptídeo imobilizado sobre NPs/CS-DADD estocado durante alguns dias na geladeira a 4°C103

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

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

Figura 58: Cromatogramas do pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B). Condições de análises: acetonitrila/água deionizada na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm106

Figura 59: Curva analítica obtida para o pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B) empregando HPLC/UV, fase móvel acetonitrila/água 70:30 (v/v) e comprimento de onda de 230 nm107

Figura 60: Cromatogramas obtidos por HPLC/UV das amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida carbofurano $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Condições de análise: acetonitrila/água na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm107

Figura 61: Cromatogramas obtidos por HPLC/UV das amostras de tomate (A) e batata (B) na ausência (—) e presença (—) do pesticida clorpirifós $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Condições de análise: acetonitrila/água na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos reagentes utilizados nesse trabalho.....	38
Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis, dois níveis e um ponto central.	46
Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis, dois níveis e um ponto central.	46
Tabela 4: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas magnetitas e magnetitas revestidas com quitosana.	56
Tabela 5: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas de magnetitas e magnetitas modificadas.	57
Tabela 6: Dados da isoterma de adsorção (BET) obtidos para as nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$	62
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa Minitab® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).	84
Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa Minitab® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a otimização da SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).	87
Tabela 9: Dados obtidos a partir da curva analítica do pesticida carbofurano e clorpirifós.	100
Tabela 10: Avaliação da seletividade do sensor bioinspirado desenvolvido.	102
Tabela 11: Percentual de recuperação do pesticida carbofurano e clorpirifós em amostra de tomate e batata. Medida realizada em triplicata.....	105

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ Es: Incremento de varredura

a: Amplitude de pulso

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

Ala: Alanina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Arg: Arginina

ATCh: Acetiltiocolina

ATChI: Iodeto de acetiltiocolina

BET: Isotermas Brunauer, Emmett e Teller

BR: Solução tampão Britton-Robinson

CS: Quitosana

DADD: 1,12-diaminododecano

DRX: Difração de raio X

DTA: Análise Térmica Diferencial

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

f: Frequência

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

His: Histidina

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD: Limite Detecção

LMR: Limite Máximo de Resíduos

LQ: Limite de Quantificação

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

SEM-FEG: Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução

NHS: N-hidróxisuccinimida

NPs: Nanopartículas magnéticas

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBS: Solução tampão fosfato

PEP: Peptídeo

Pro: Prolina

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

SEQPEP1: Sequência peptídica 1

SEQPEP2: Sequência peptídica 2

Ser: Serina

TGA: Análise Termogravimétrica

Trp: Triptofano

CV: Voltametria Cíclica

SWV: Voltametria de Onda Quadrada

SUMÁRIO

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

Essas pragas são intensamente combatidas com os chamados “defensivos agrícolas”, também conhecidos como agrotóxicos ou pesticidas. Segundo Sousa et al.(4) os pesticidas ajudam a aumentar a produção e a qualidade de frutas e vegetais, controlando a propagação de pragas durante o crescimento. Entretanto, estes defensivos constituem uma das fontes de contaminação ambiental, o que pode acarretar em sérios riscos para a saúde humana, podendo causar alterações nos ecossistemas com consequências prejudiciais para o ambiente e a agricultura, devido ao surgimento de organismos mais resistentes e de novas doenças em decorrência do aumento da necessidade do uso de mais agrotóxicos (5,6).

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

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

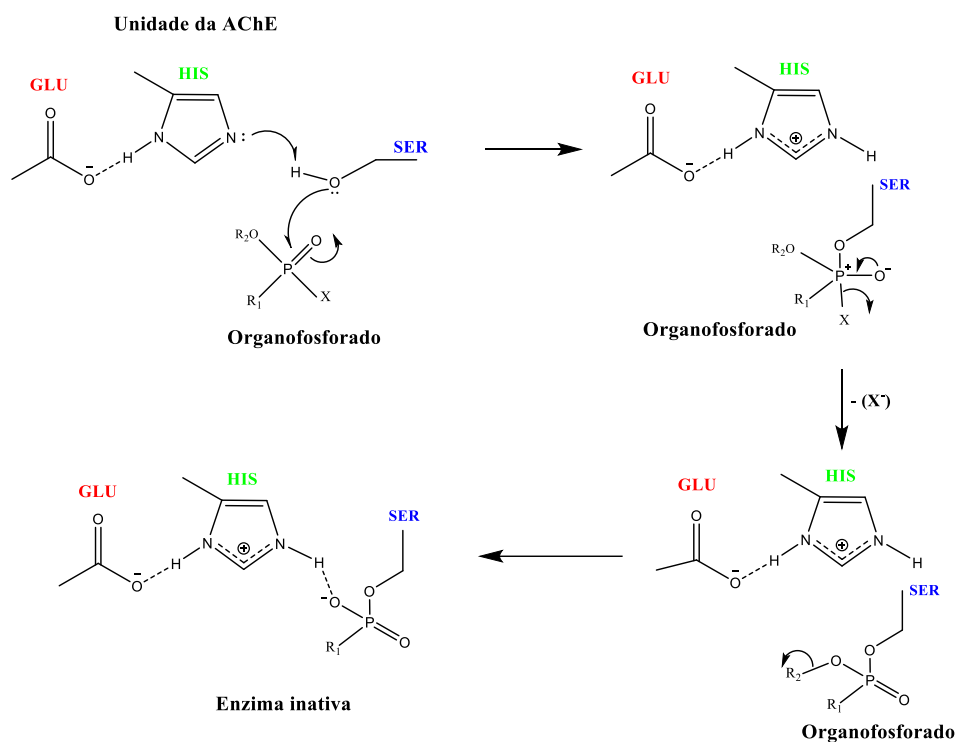
Inicialmente, os pesticidas organoclorados (como o benzeno hexaclorado, BHC, por exemplo) foram extensivamente utilizados, contudo, esses compostos são altamente tóxicos, além disso, são muito persistentes no meio ambiente, o que gerou bioacumulação de seus derivados em solos, mananciais e lençóis freáticos.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

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

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

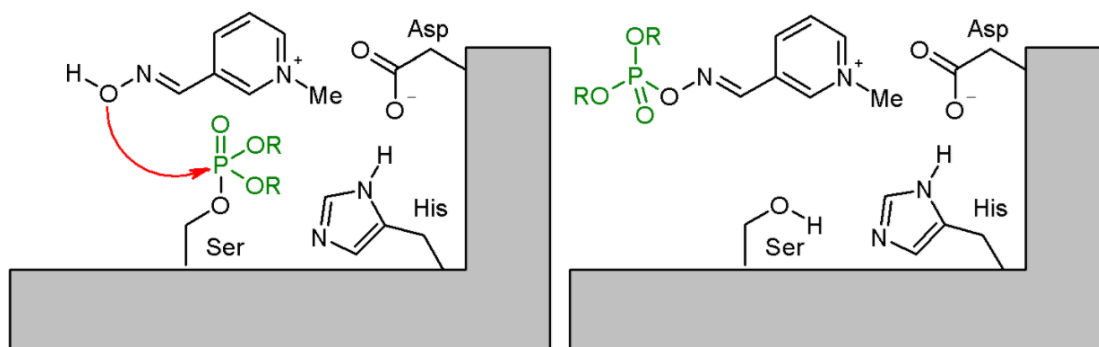
Os efeitos tóxicos dos compostos organofosforados e dos seus produtos de biodegradação estão diretamente relacionados aos processos de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) por esses compostos. Dessa forma a enzima perde sua atividade, deixando de atuar na hidrólise da acetilcolina, que é um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

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



Fonte: Adaptado de Santos et al (20)

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

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

Fonte: Adaptado de Gonsalves et al. (24)

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

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

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

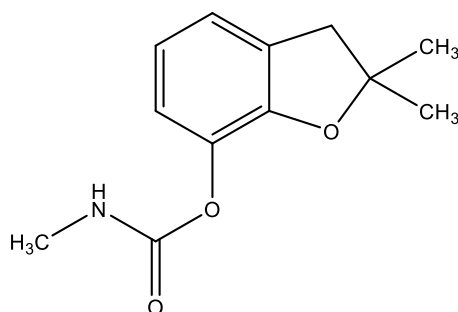
1.1 Pesticidas utilizados neste trabalho

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

1.1.1 Carbofurano

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

Figura 3: Fórmula estrutural do pesticida carbofurano.



Fonte: autoria própria.

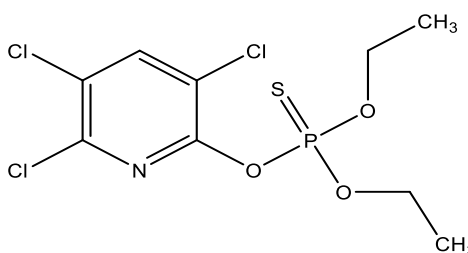
De acordo com a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) é um pesticida extremamente tóxico (classificação toxicológica I). A elevada toxicidade do carbofurano é bem conhecida, sendo reportado danos ao meio ambiente e a saúde humana, devido à sua capacidade embriotóxica, mutagênica e teratogênica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

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

1.1.2 Clorpirifós

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

Figura 4: Fórmula estrutural do pesticida clorpirifós.



Fonte: autoria própria.

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

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

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

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

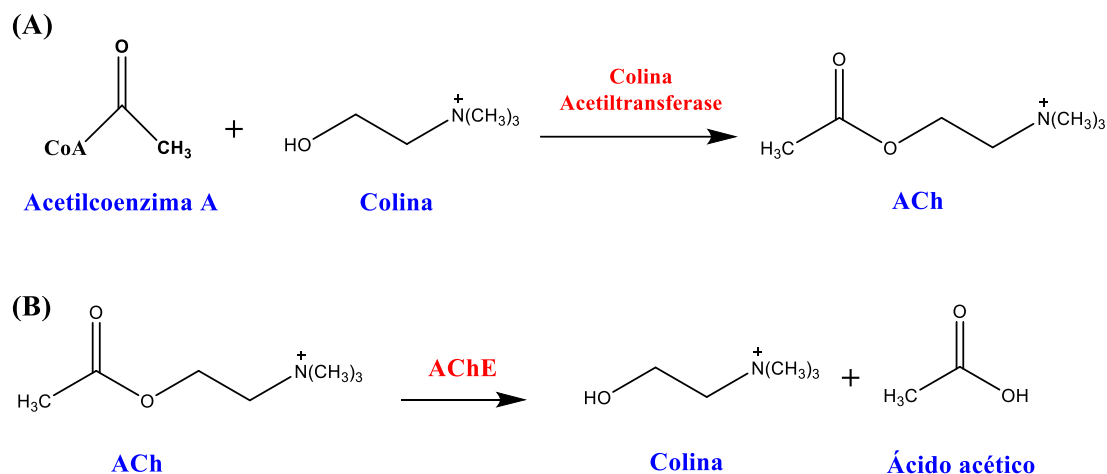
1.2 A Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

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

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

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

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



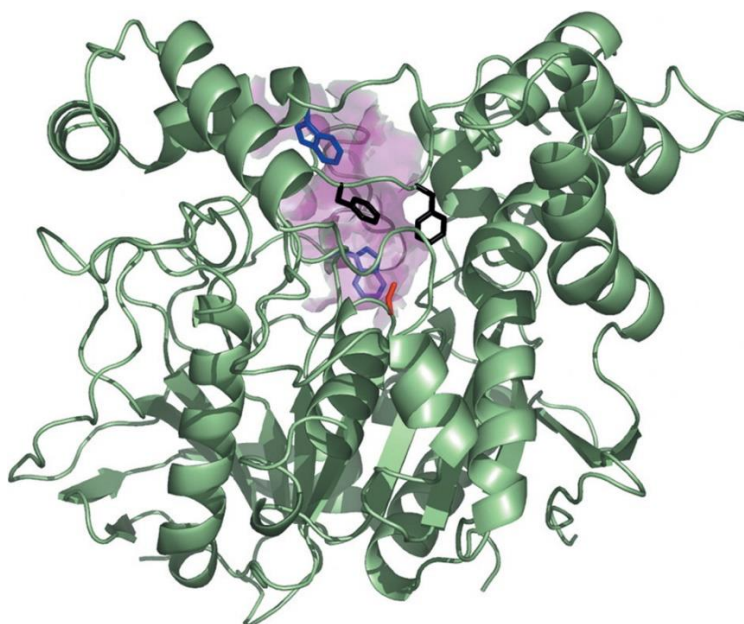
Fonte: Araújo et al.(57)

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

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

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

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



Fonte: Silman e Sussman, (58)

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

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

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

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

1.3 Sensores bioinspirados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Santos e colaboradores (47) investigaram um hexapeptídeo bioinspirado, proposto por estudos de modelagem molecular, para mimetizar o sítio ativo da AChE, como alternativa para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos. A sequência peptídica foi sintetizada pela metodologia de fase sólida e caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa. Os dados indicam uma forte interação entre o pesticida diclorvos e o hexapeptídeo ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$). Os resultados demonstram que o peptídeo apresentou limites de detecção e quantificação de $1,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,66 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores estão bem próximos ou superiores aos biossensores que utilizam a AChE imobilizada na superfície de eletrodos, apresentando vantagem de ser um peptídeo de estrutura menos complexa e com maior estabilidade que a enzima.

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

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

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

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste no desenvolvimento de sensor bioinspirado utilizando uma sequência peptídica (NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-), que mimetize o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, imobilizado sobre nanopartículas magnéticas para detecção dos pesticidas clorpirifós (organofosforado) e carbofurano (carbamato), bem como desenvolver uma metodologia analítica para determinação desses analitos de interesse em amostras de alimentos.

Este trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro;
- Desenvolvimento de metodologia para imobilização da sequência peptídica sobre as nanopartículas magnéticas;
- Otimização das condições experimentais e operacionais para a imobilização da sequência peptídica;
- Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada por meio de planejamento fatorial;
- Construção da curva analítica para os pesticidas carbofurano e clorpirifós;
- Avaliação da seletividade do sensor para diferentes classes de pesticidas;
- Estudo de estabilidade de estocagem do dispositivo na geladeira a 4 °C;
- Aplicação do sensor bioinspirado em amostra de alimentos.
- Avaliação da metodologia desenvolvida para detecção de pesticida em amostra de alimentos com método cromatográfico convencional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore®. A sequência de peptídeos (NH_3^+ - His - Glu - Trp - Arg - Pro - Ser - COO^-) e (NH_3^+ - Glu - His - Trp - Trp - Pro - Ser - COO^-) foram sintetizadas pela Genone Soluções em Biotecnologia.

A Tabela 1 apresenta uma lista com a procedência dos reagentes usados neste trabalho.

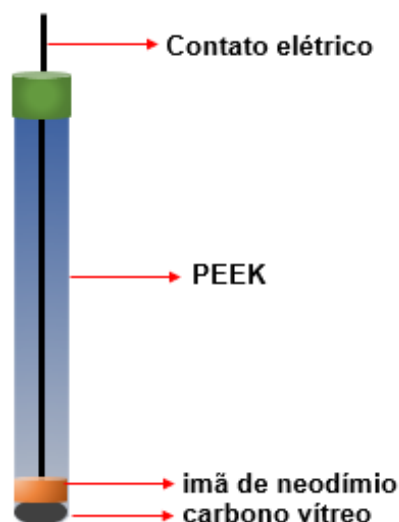
Tabela 1: Lista dos reagentes utilizados nesse trabalho.

Reagente	Procedência	Reagente	Procedência
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	Ácido cítrico	Synth
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	Neon	Carbofurano	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	Synth	Carbaril	Sigma-Aldrich
Quitosana	Sigma-Aldrich	Clorpirifós	Sigma-Aldrich
Ácido acético	Synth	Malation	Sigma-Aldrich
NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich	Metamidofós	Sigma-Aldrich
Na_2HPO_4	Synth	Permetrina	Sigma-Aldrich
1,12-diaminododecano	Sigma-Aldrich	Acetonitrila	Sigma-Aldrich
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)	Sigma-Aldrich	Sulfato de magnésio	Mallinckrodt
N-hidróxisuccinimida	Sigma-Aldrich	Cloreto de sódio	Merck
Perclorato de sódio	Sigma-Aldrich	etilenodiamino-N-propil (PSA)	Agilent
Ácido bórico	Synth	C_{18}	Avantor
ATChI/AChE	Sigma-Aldrich	Ácido fosfórico	Synth

3.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um Potenciostato/Galvanostato μ Autolab acoplado a um computador e controlado pelo *software* NOVA 2.1. O sistema utilizado para obtenção das medidas foi constituído de uma célula eletroquímica, composta por um sistema de três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl (contendo $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl), um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (3 mm de diâmetro, com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$) embutido em PEEK, contendo no interior, um ímã de neodímio. A Figura 7 mostra o esquema do eletrodo de carbono vítreo.

Figura 7: Esquema do eletrodo de trabalho utilizado nas medidas.



Fonte: autoria própria.

As análises por espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier, foram obtidas empregando um espectrômetro FTIR Vertex 70 da Bruker com uma fonte de laser e um detector DLaTGS, utilizando uma faixa de leitura de $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura com Alta Resolução (MEV-FEG) modelo JEOL JSM-7500F.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas utilizando um microscópio Philips modelo CM 200 Super Twin operando em uma potência de feixe de 120 kV. A distribuição de tamanho das nanopartículas foi medida por meio do programa ImageJ®.

A determinação da área superficial específica dos materiais sintetizados foi realizado através de estudos por meio de isothermas de adsorção e dessorção de N₂. As medidas das análises de área de superfície por isothermas Brunauer, Emmett e Taller (BET) foram realizadas em um equipamento da Micromeritics®, modelo ASAP 2010.

A estabilidade térmica das partículas magnéticas, foram avaliadas utilizando termogravimetria e análise térmica diferencial (TG/DTA). As medidas foram obtidas utilizando um módulo TG/DTA simultâneo da marca TA Instruments® modelo SDT 2960. As análises foram realizadas num intervalo de temperatura de 30 a 1000 °C, em uma razão de aquecimento de 20 °C min⁻¹, em atmosfera dinâmica de ar, com vazão de 100 mL min⁻¹ com aproximadamente 6,0 mg de amostra.

Os difratogramas de raios X dos materiais sintetizados, foram obtidos através do método do pó, em porta amostra de vidro, utilizando radiação Cu-K α , no intervalo 2 θ entre 6° e 80°, com tempo de contagem de 3s, passo angular de 0,02° realizada em equipamento da marca Siemens modelo D5000.

Para as análises cromatográficas foi empregado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20A, com detector UV/Visível SPD-20A, acoplado a um microcomputador. A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C18 da marca Shimadzu Shim – Pack CLC – ODS.

3.3 Síntese das partículas magnéticas

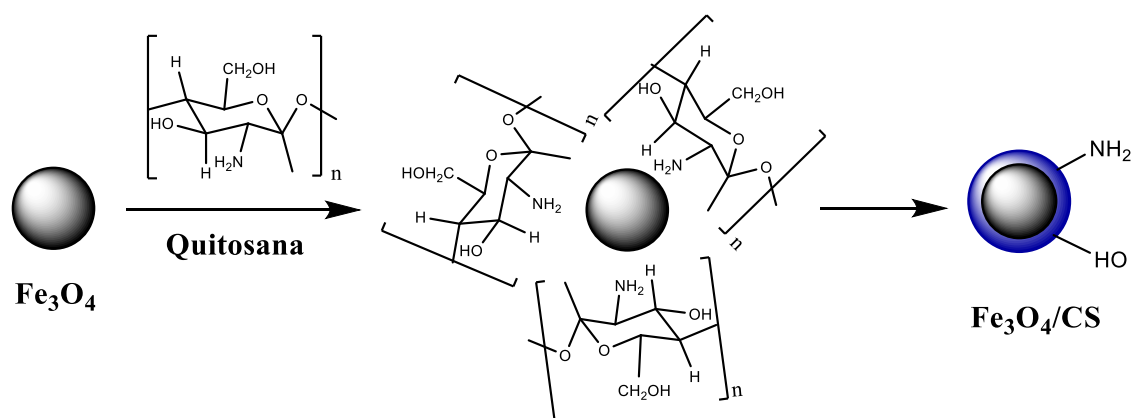
A síntese das partículas de magnetita foi realizada pelo método de co-precipitação seguindo metodologia descrita por Ranjbari (87), onde 5,2 g de FeCl₃·6H₂O, 2,0 g de FeCl₂·4H₂O e 0,85 mL de HCl (12M) foram adicionados em um balão de fundo redondo contendo 25 mL de água deionizada isenta de O₂. Em seguida, adicionou-se 250 mL de solução de NaOH 1,5 mol L⁻¹ previamente aquecida a 80 °C, sob fluxo de nitrogênio. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de nitrogênio com agitação vigorosa em banho de água a 80 °C por 15 minutos. O precipitado foi separado por campo magnético, lavou-se várias vezes com água

deionizada para remover as impurezas e os materiais que não reagiram. As partículas de Fe_3O_4 foram secas na estufa a 80°C . O material obtido foi submetido a campo magnético externo para avaliar se o produto formado de fato era magnético. Para isso, adicionou-se uma determinada quantidade de Fe_3O_4 em um tubo e aproximou-se um ímã de neodímio.

3.4 Modificação da superfície das partículas de Fe_3O_4 com Quitosana (CS)

A quitosana possui alta afinidade por íons metálicos devido aos grupos amina e hidroxila. O procedimento para recobrimento das partículas de Fe_3O_4 com quitosana foi seguindo metodologia descrita na literatura (88). Na Figura 8 está representado resumidamente o procedimento experimental, onde a solução de quitosana foi preparada por dissolução de 0,1 g de quitosana em 10 mL de solução de ácido acético 1% (v/v), sob agitação vigorosa por 50 min. Em seguida, adicionou-se 0,5 g de Fe_3O_4 a solução contendo quitosana e deixou reagir por 50 minutos sob agitação. As partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ foram recuperados da suspensão por meio de campo magnético, foram lavadas várias vezes com água deionizada, dispersas em 10 mL de água e armazenadas a 4°C .

Figura 8: Modificação das partículas de magnetita com quitosana.



Fonte: autoria própria.

3.5 Imobilização do peptídeo sobre as nanopartículas magnéticas (NPs)

Primeiramente preparou-se solução estoque da sequência peptídica $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q. As diluições foram realizadas em solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Todas as soluções foram armazenadas em um refrigerador a 4°C .

Para montagem do sistema do sensor bioinspirado, a sequência peptídica $\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$ (SEQPEP)1 foi imobilizada sobre NPs, objetivando um aumento de área superficial do eletrodo de trabalho, que pode resultar em sinal analítico mais alto e baixos limites de detecção. As NPs foram capturadas por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, que apresenta em sua montagem um ímã de neodímio capaz de efetuar a captura das NPs.

Foram testados 2 tipos de nanopartículas, a comercial funcionalizada com grupo carboxílico ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{COOH}$) e a preparada no laboratório e revestida com quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$). Aplicou-se o mesmo procedimento de imobilização para ambas. A primeira estratégia de imobilização da SEQPEP1 pelo grupamento amina não foi satisfatória, logo as NPs foram modificadas com 1,12-diaminododecano (DADD) que fornece o grupamento amino para proceder com a imobilização pelo grupamento carboxila presente na SEQPEP1.

A imobilização da SEQPEP1 sobre as NPs foi realizada como se segue: pipetou-se $30 \mu\text{L}$ das NPs, separou-se o sólido com auxílio de um ímã de neodímio e dispensou-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se $30 \mu\text{L}$ de solução 10 mmol L^{-1} de DADD deixando interagir por 2h, lavou-se as nanopartículas para retirar o excesso de DADD que não reagiu e dispensou o sobrenadante. Às NPs-DADD adicionou-se $30 \mu\text{L}$ de solução de peptídeo pré-ativado ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) durante 1h (para ativar os grupos funcionais presentes na SEQPEP1 utilizou-se solução de EDC/NHS, onde $60 \mu\text{L}$ de solução do peptídeo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi colocado em contato por 1h com $60 \mu\text{L}$ de solução $37,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e 25 mmol L^{-1} de EDC e NHS respectivamente).

As medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata, depositando um volume de $10 \mu\text{L}$ de NPs-DADD-PEP sobre a superfície do eletrodo de trabalho e aplicando potencial no intervalo de $-0,5$ a $1,3 \text{ V}$. Após as medidas, retirou-se as nanopartículas magnéticas da superfície do eletrodo. Posteriormente, o eletrodo de trabalho foi lavado várias vezes com água destiladas e polido com lixa de

granulometria 4000. Em seguida, a superfície do eletrodo de trabalho estava pronta para uma nova modificação.

3.6 Otimização dos Parâmetros Experimentais

Para melhor desempenho do sensor bioinspirado proposto, os parâmetros experimentais e operacionais do sistema que influenciam a sensibilidade da técnica, a estabilidade e o perfil da resposta analítica foram investigados.

Realizou-se estudos utilizando voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV) com o intuito de se investigar as melhores condições para a oxidação da histidina que ocorre ao redor de 1,2 V.

Todas as medidas foram obtidas em triplicata. Neste sentido otimizaram-se os seguintes parâmetros experimentais:

3.6.1 Otimização da concentração de EDC/NHS

Para a ativação dos grupos terminais da sequência peptídica, foram preparadas soluções de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidróxisuccinimida (NHS) em diferentes concentrações: 9,4/6,2; 12,5/8,3; 18,6/12,5 e 37,5/25 mmol L⁻¹. Em seguida 60 µL de solução de peptídeo 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ foi colocado em contato por 1h com 60 µL de solução de EDC/NHS em diferentes concentrações (citadas anteriormente) para ativar os grupos funcionais presentes na sequência peptídica.

3.6.2 Otimização da concentração 12-diaminododecano (DADD) sobre NPs/CS

Para a modificação ou funcionalização das partículas magnéticas com amina, foram preparadas soluções de DADD em diferentes concentrações: 2, 5, 10, 30, 40, 60 e 70 mmol L⁻¹. Em seguida, 30 µL NPs/CS foram colocados em contato com 30 µL de solução de DADD em diferentes concentrações, deixando interagir por 2h. Após lavagem das nanopartículas para retirar o excesso de DADD que não reagiu imobilizou-se a sequência peptídica sobre NPs/CS-DADD.

3.6.3 Escolha do eletrólito suporte

Estudos preliminares foram realizados para definir o eletrólito suporte mais adequado, ou seja, o que resultasse em melhor resposta de corrente para o analito em estudo utilizando técnica voltamétrica. O eletrólito suporte deve ser eletroinativo na janela de potencial do eletrodo na qual os estudos com o analito de interesse são realizados, ou seja, não deve reagir com o analito eletroativo ou nenhum de seus produtos (89). Baseado nisso, estudou-se o comportamento do sensor bioinspirado nos seguintes eletrólitos NaClO_4 , soluções tampão fosfato (PBS), Britton-Robinson (BR) e McIlvaine. Todas os eletrólitos foram preparados na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 utilizando água deionizada.

A solução tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) foi preparada com uma solução de fosfato de sódio monobásico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ajustado com solução de fosfato de sódio dibásico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até valor de pH desejado. A solução tampão BR ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$) foi preparado pela mistura das soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico, seguido pela adição de solução NaOH para ajustar o valor de pH desejado. A solução tampão McIlvaine ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) foi preparada pela dissolução de fosfato de sódio dibásico e de solução de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para obter o ajuste do pH desejado. Todas as soluções foram preparadas seguindo metodologia descrita na literatura (90).

3.6.4 Otimização do volume de NPs sobre a superfície do eletrodo

Após otimizar a concentração de EDC/NHS, concentração de DADD e melhor solução eletrolítica, avaliou-se a quantidade de NPs/CS-DADD-PEP sobre a superfície do eletrodo. Os volumes utilizados no estudo foram 10, 20, 30, 40, 50 e $60 \mu\text{L}$.

3.6.5 Otimização do tempo de reação do DADD com as NPs/CS

Neste experimento, NPs/CS-DADD foram preparadas variando-se o tempo de contato entre as NPs/CS com solução de DADD em: 30, 60, 90 e 120 minutos. Em seguida a SEQPEP1 foi imobilizada sobre cada NPs/CS-DADD preparado.

3.6.6 Estudo do pH e concentração do eletrólito

Para o estudo do pH, preparou-se solução do eletrólito suporte NaClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se o pH entre 4,0 a 9,0. Para o ajuste do pH empregou-se solução de NaOH e HCl . Definido o valor de pH no qual foi obtido a melhor resposta analítica, variou-se a concentração do eletrólito suporte em: 0,010; 0,025; 0,050 e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

3.6.7 Tempo de ativação do peptídeo com EDC/NHS

Após otimizar a concentração de EDC/NHS, estudou-se o tempo necessário para ativar o grupo carboxila da sequência peptídica (SEQPEP1). Em 4 microtubos adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de solução de SEQPEP1 na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $50 \mu\text{L}$ de solução de EDC/NHS deixando reagir por 15, 30, 60 e 120 minutos. Após esse tempo a SEQPEP1 foi imobilizada sobre NPs/CS-DADD.

3.6.8 Efeito da concentração do peptídeo ativado e tempo de incubação com as NPs/CS-DADD.

A avaliação da influência da concentração do peptídeo ativado ($\text{PEP}_{\text{ativado}}$) e do tempo de incubação do $\text{PEP}_{\text{ativado}}$ com as NPs/CS-DADD foi realizada por meio de ferramenta estatística, o planejamento fatorial.

O planejamento fatorial é indicado quando se deseja identificar, dentre um número de variáveis, aquela ou aquelas que apresentam maior importância ou efeito sobre a resposta em questão. Os experimentos foram conduzidos utilizando uma matriz de planejamento fatorial completo em dois níveis (2^2), onde cada fator assume um valor máximo e um mínimo. Combinando-se esses níveis entre todos os fatores obtém-se 2^n experimentos, onde n é o número de fatores analisados (91).

Os níveis máximo e mínimo aplicados neste estudo estão representados na Tabela 2. A Matriz de planejamento fatorial foi gerada pelo programa *Minitab*® 15 *Statistical Software*.

Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis, dois níveis e um ponto central.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
[PEP] _{ativado} (mol L ⁻¹)	$5,0 \times 10^{-5}$	$2,75 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$
Tempo de incubação do [PEP] _{ativado} com as NPs/CS-DADD	30 min	45 min	60 min

A imobilização da sequência peptídica (SEQPEP1) sobre NPs/CS-DADD foi realizada pela adição de 90 µL das NPs/CS-DADD em um microtubo, separou-se o sólido com auxílio de um ímã de neodímio e dispensou o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 90 µL de solução de peptídeo ativado com EDC/NHS em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-5}$, $2,75 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e tempos de incubação (30, 45 e 60 minutos) conforme matriz de planejamento fatorial apresentada na Tabela 2. As medidas foram realizadas em triplicata, utilizando volume de 30 µL de NPs-DADD-PEP.

3.7 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Na otimização dos parâmetros da SWV, utilizou-se uma matriz de planejamento fatorial completo 2³. As variáveis estudadas foram: frequência (f), amplitude de pulso (a) e incremento de varredura (ΔEs). Os níveis máximo e mínimo aplicados neste estudo estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis, dois níveis e um ponto central.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
Frequência (Hz)	20	60	100
Amplitude de pulso (mV)	10	50	90
Incremento de varredura (mV)	2	6	10

Em um microtubo adicionou-se 750 µL das NPs/CS-DADD, separou-se o sólido com auxílio de um ímã de neodímio e dispensou o sobrenadante. Em seguida

adicionou-se 750 μL de solução peptídeo ativado na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ mantendo em contato por 1h. As medidas foram realizadas em triplicata, utilizando volume de 30 μL de NPs-DADD-PEP.

Os valores das variáveis estudadas neste experimento foram aplicados de acordo com a matriz de planejamento fatorial gerada (Tabela 3). Os dados foram tratados com o auxílio do *Minitab® 15 Statistical Software*.

3.8 Determinação da área eletroativa do eletrodo de trabalho

A determinação da área ativa do eletrodo de trabalho foi realizada por voltametria cíclica variando-se a velocidade de varredura. Em uma célula eletroquímica adicionou-se 5,0 mL de solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 5,0 mmolL em meio aquoso de KCl 0,1 mol L^{-1} e em seguida, registraram-se os voltamogramas cíclicos na faixa de intervalo de velocidade de varredura entre 20 a 150 mV s^{-1} e de 150 a 20 mV s^{-1} , obtiveram-se as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Com o auxílio da Equação de Randles e Sevcik (92) (Equação 1), calculou-se a área eletroativa do eletrodo antes e após a modificação da superfície com 30 μL de NPs/CS-DADD-PEP.

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 \text{ A } D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C_0 \quad (1)$$

Onde:

I_{pa} = corrente anódica (A)

A = área eletroativa (cm^2)

D = coeficiente de difusão da espécie ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

n = número de elétrons envolvidos

v = velocidade de varredura (V s^{-1})

C_0 = concentração da espécie química (mol cm^{-3}).

3.9 Avaliação da sequência peptídica na catálise da acetiltiocolina

Em um microtubo foram adicionados 50 μL de NPs/CS, separou-se o sólido com auxílio de um ímã de neodímio e dispensou o sobrenadante. Em seguida foram adicionados: 20 μL de iodeto de acetiltiocolina 50 mmol L^{-1} , 20 μL de glutaraldeído

25%, 20 μL de peptídeo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e 40 μL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 deixando interagir por 3 minutos. Paralelamente foi preparada uma amostra contendo a enzima AChE (50 U/mL) para fins comparativos.

3.10 Determinação do tempo de incubação do pesticida

Sabe-se que a enzima AChE sofre alterações quando colocada em contato com pesticidas da classe dos organofosforados/carbamatos, ou seja, ambos os compostos interagem com a enzima, inibindo sua capacidade e consequentemente, diminuindo a formação do produto reacional final, o que ocasiona uma diminuição do sinal analítico obtido. Como o objetivo é desenvolver um sensor bioinspirado na enzima AChE, o tempo de inibição é um parâmetro importante a ser estudado.

Para a determinação do tempo de incubação do pesticida foram adicionados 30 μL de solução contendo NPs/CS-DADD-PEP sobre a superfície do eletrodo de trabalho (retirou-se excesso de solução). Em seguida adicionou-se em um béquer 2,0 mL de solução do pesticida (carbofurano e/ou clorpirifós) na concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo modificado com NPs-DADD-PEP foi imerso nesse béquer contendo o pesticida, variando o tempo de contato de 1 a 15 minutos. Depois de ser imerso na solução contendo o pesticida, o sensor foi lavado e inserido na célula eletroquímica para as medidas voltamétricas. O sinal eletroquímico foi monitorado pelo pico de oxidação histidina, cujo valor diminui ao interagir com o pesticida. As medidas foram realizadas em triplicata. O percentual de inibição foi calculado utilizando a Equação (2):

$$\% \text{ I} = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100 \quad (2)$$

onde I_0 corrente de pico na ausência do pesticida e I_1 corrente de pico após inibição com o pesticida.

3.11 Construção da curva analítica para os pesticidas em estudo

Após a determinação do tempo de incubação dos pesticidas em estudo, construiu-se a curva analítica, variando-se a concentração de $1,0 \times 10^{-10}$ a

$5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o pesticida carbofurano e de $1,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o clorpirifós. As soluções estoques dos pesticidas foram preparadas em acetonitrila e diluídas em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Para as análises, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de NPs/CS-DADD-PEP na superfície do eletrodo, retirou-se o excesso de solução peptídica e adicionou-se $20 \mu\text{L}$ de solução do pesticida, deixando interagir por 5 minutos. Em seguida, o eletrodo de trabalho foi lavado para retirar o excesso de pesticida e foi imerso na célula eletroquímica para as medidas. Os respectivos percentuais de inibição foram calculados através da comparação da intensidade de corrente obtida para o eletrodo submetido ao mesmo meio e tempo de pré-concentração, na presença e ausência do pesticida (Equação 2). Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Com base nos valores obtidos a partir da curva analítica, calculou-se o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método de acordo com a Equação 3 e 4 respectivamente, onde (S_D) é o desvio padrão e (b) o coeficiente angular da curva analítica (93).

$$LD = \frac{3 \times S_D}{b} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_D}{b} \quad (4)$$

3.12 Seletividade do sensor bioinspirado

O sensor desenvolvido foi avaliado frente a outros pesticidas da classe dos carbamato, organofosforado e piretróide. Os pesticidas utilizados neste estudo formam: carbofurano, carbaril, clorpirifós, malation, metamidofós e permetrina. Preparou-se solução estoque dos pesticidas em acetonitrila e as diluições foram realizadas em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. A concentração dos pesticidas estudados foi de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O procedimento experimental foi realizado como escrito no item 3.11.

3.13 Aplicação do sensor em amostras de tomate e batata

O sensor bioinspirado proposto para determinação de pesticida, foi avaliado em amostras de tomate e batata, “ambos orgânicos”, adquiridos em supermercado local em Araraquara (SP, Brasil).

A metodologia utilizada para preparar as amostras foi de acordo com a descrita na literatura (94); a batata e o tomate foram lavados, cortados e triturados. Em seguida 2,0 g de amostra foram colocadas em contato com 10 mL de solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e submetidas ao ultrassom por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram agitadas no vortex, centrifugadas a 10.000 rpm; o volume final do sobrenadante foi de 9,0 mL. Pipetou-se 2,0 mL de cada extrato a qual foi enriquecido com uma concentração conhecida de pesticida, e diluído em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 até o volume de 3,0 mL.

Os voltamogramas foram obtidos após a realização de etapa de pré-concentração do sensor com as amostras fortificadas no tempo de contato de 5 minutos. O percentual de inibição foi calculado através da intensidade de corrente obtida para o eletrodo na ausência e presença do pesticida (Equação 2). O valor da concentração de cada pesticida encontrado nas amostras reais foi calculado a partir da equação da reta obtida da curva analítica. Os percentuais de recuperação dos pesticidas nas amostras foram calculados utilizando a Equação 5. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{analito}]_{\text{encontrado}}}{[\text{analito}]_{\text{adicionado}}} \times 100 \quad (5)$$

3.13.1 Análise de pesticida nas amostras de tomate e batata por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Com o objetivo de avaliar a validade do sensor desenvolvido, as amostras de batata e tomate foram investigadas utilizando o método cromatográfico.

O método cromatográfico foi desenvolvido para a determinação do pesticida carbofurano e clorpirifós. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e água deionizada na proporção 70:30 (v/v),

vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção da amostra de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimentos de ondas de 230 nm para carbofurano e clorpirifós.

As amostras de tomate e batata foram preparadas utilizando o método de extração estabelecido pela ANVISA (método QuEChERS), descrito a seguir.

3.13.1.1 Método QuEChERS

O controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos realizado pela ANVISA tem como referência controles realizados por outros países, tais como Estados Unidos e União Europeia. Tais laboratórios fazem uso do método de extração de resíduo de pesticidas em amostras de frutas e vegetais utilizando o método QuEChERS, desenvolvido pela primeira vez em 2003 por Anastassiades et al. (95).

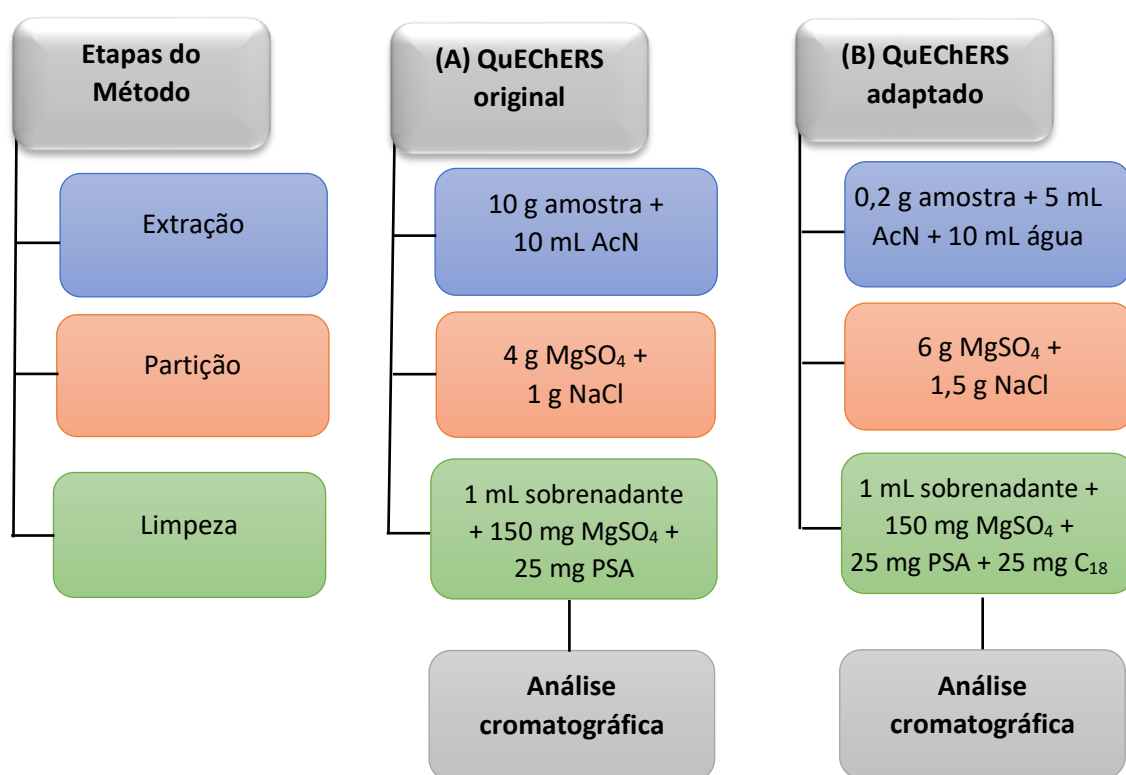
O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é um método de preparo de amostras descrito como rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro. Este método de extração é voltado para análise multirresidual de pesticidas. Ao longo dos anos, o método original vem sendo modificado com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação, uma vez que este método é eficaz para a análise de outros grupos de compostos, incluindo produtos farmacêuticos (96,97), micotoxinas (98,99), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (100,101) e em uma grande variedade de matrizes complexas (102).

A Figura 9A apresenta o fluxograma do método original. A primeira etapa consiste em uma extração, onde 10 g de amostra são colocadas em contato com 10 mL de acetonitrila (AcN), seguida por agitação vigorosa em vortex. A segunda etapa (partição), consiste na adição de $4,0 \text{ g}$ de MgSO_4 e $1,0 \text{ g}$ de NaCl . Essa mistura é agitada e centrifugada, ocorrendo a etapa de partição líquido-líquido entre a água presente na amostra e a acetonitrila. A adição dos sais nesta etapa é devido ao efeito “*salting out*”, o que promove um aumento nos percentuais de recuperação para analito mais polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (4,103). A terceira etapa (limpeza), consiste em retirar uma alíquota de $1,0 \text{ mL}$ do sobrenadante e transferir para outro tubo, onde adiciona-se 150 mg de MgSO_4 e 25 mg de etilenodiamino-N-propil (PSA) que é uma amina primária e secundária, com a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos

(95,104). A mistura é agitada, centrifugada e uma alíquota do sobrenadante é filtrada. A última etapa consiste na análise cromatográfica.

Vimos anteriormente que o método QuEChERS vem passando por modificações. De acordo com levantamento bibliográfico (101,105,106), foram realizadas algumas adaptações no método de preparo de amostras para análise de pesticidas. Essas modificações podem ser visualizadas na Figura 9B.

Figura 9: Fluxograma representativo das etapas do método QuEChERS original (A) e adaptado neste estudo (B).



Fonte: autoria própria.

A abordagem utilizando o método QuEChERS é muito flexível e serve como modelo para modificação da metodologia dependendo das propriedades do analito, composição da matriz, equipamento e técnica analítica disponível no laboratório. As adaptações realizadas no método para preparar as amostras de tomate e batata foram modificações realizadas na proporção de massa, volume de solvente e adição do sorvente C₁₈ (octadecilsilano) para promover uma limpeza mais efetiva das amostras (102,107). Após todo o procedimento de extração e preparo das amostras,

pipetou-se 2,0 mL de cada extrato a qual foi fortificado com uma concentração conhecida de pesticida, diluído em AcN até o volume de 3,0 mL e filtrado com filtro de 0,45 μ m antes da análise no cromatógrafo.

3.14 Estabilidade do sensor bioinspirado

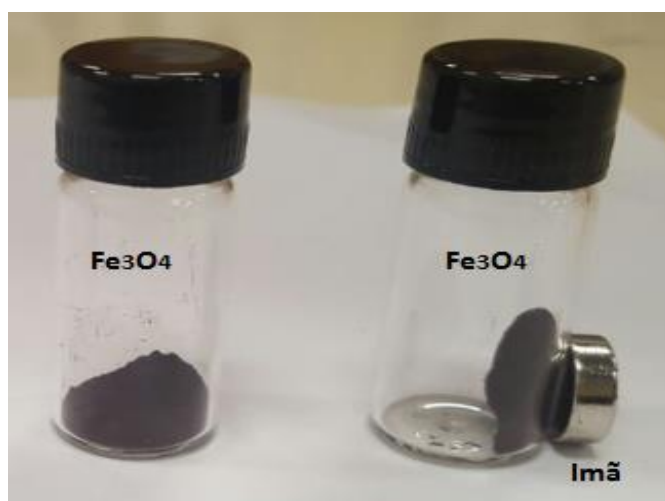
A sequência peptídica foi imobilizada sobre NPs/CS-DADD e armazenada na geladeira a 4 °C em microtubo. Nos períodos de 1, 10, 30, 60, 90, 120 e 150 dias foram realizados voltamogramas de onda quadrada, afim de avaliar a estabilidade do sensor bioinspirado desenvolvido.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As partículas magnéticas de Fe_3O_4 foram sintetizadas, funcionalizadas com quitosana/DADD e o PEP foi imobilizado via DADD. As diversas etapas foram caracterizadas por medidas de FTIR, SEM/FEG, TG/DTA, MET, BET, DRX e a seguir serão apresentados e discutidos os resultados.

Afim de determinar o magnetismo das nanopartículas de óxido de ferro, utilizou-se método convencional, onde o material foi submetido à aplicação de um campo magnético. A Figura 10 mostra a imagem das partículas de Fe_3O_4 na presença e ausência de campo magnético (ímã). Onde se verifica que na ausência de campo magnético, as partículas apresentaram comportamento magnético próximo de zero, e na presença de um campo magnético ocorre um alinhamento das partículas. Esse alinhamento é facilmente desfeito após a remoção do campo magnético, mostrando que o material sintetizado apresenta propriedades magnéticas.

Figura 10: Fotos das magnetitas sintetizadas na ausência e presença de um campo magnético (ímã).



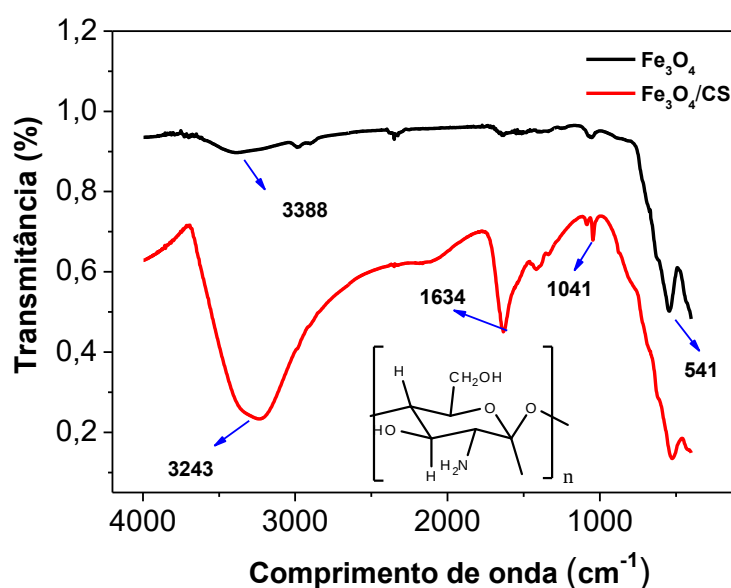
Fonte: autoria própria.

4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A Figura 11 mostra as medidas de espectroscopia no infravermelho evidenciando a presença de modos de vibração relacionados à macromolécula utilizada na modificação de superfície das partículas magnéticas.

O espectro de FTIR das partículas de Fe_3O_4 apresenta banda na região de 3388 cm^{-1} característico da ligação OH na magnetita (proveniente de moléculas de água adsorvidas na superfície do material) e uma banda em torno de 541 cm^{-1} que geralmente ocorre pela vibração da ligação Fe–O, confirmando a presença de partículas de magnetita. O espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ apresenta bandas de absorção em 3243 cm^{-1} correspondente à ligação de O–H e vibrações de estiramento N–H as quais geralmente se apresentam sobrepostas, alargando a banda. Adicionalmente, observa-se bandas de absorção em 1634 cm^{-1} , relacionadas com a deformação da ligação N–H do grupo NH_2 (amina) na quitosana, e em 1041 cm^{-1} que corresponde a vibração de estiramento C–N. Verifica-se também que após o revestimento das partículas com quitosana, o pico referente à ligação Fe–O em 541 cm^{-1} teve um pequeno deslocamento (526 cm^{-1}) no espectro $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$.

Figura 11: Espectro de FTIR das partículas magnéticas de Fe_3O_4 (—) e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ (—).



Fonte: autoria própria.

As bandas atribuídas anteriormente provêm basicamente de vibrações de estiramento (ou deformação axial), representada por ν , ou por vibrações de dobramento (deformação angular), representada por δ . A Tabela 4, apresenta de forma resumida as principais atribuições e grupos funcionais (108,109) encontrados (Figura 11) nas nanopartículas de magnetita e magnetita revestida com quitosana.

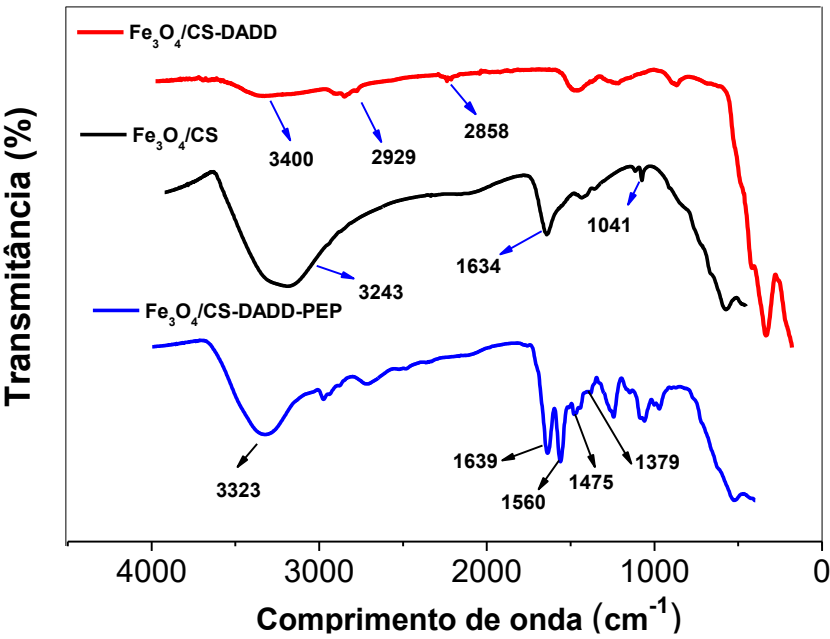
Tabela 4: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas magnetitas e magnetitas revestidas com quitosana.

Principais bandas (cm^{-1})	3388	3243	1634	1041	~541
Atribuições	ν (O-H)	ν (O-H) e ν (N-H)	δ (N-H)	ν (C-N)	Fe-O

A imobilização do PEP sobre as nanopartículas revestidas com quitosana não foi satisfatória, desta forma, as $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ foram modificadas com DADD. A Figura 12 apresenta o espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ -DADD e após imobilização da SEQPEP1. O espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ -DADD apresentou uma diminuição na intensidade da banda em torno de 3400 cm^{-1} quando comparado ao espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$. Esta diminuição de intensidade pode ser atribuída à ligação da molécula de DADD ao grupo OH presente na molécula de quitosana. Além disso, nota-se o aparecimento de bandas na região de 2929 e 2858 cm^{-1} referentes à deformação axial simétrica de C-H, presente em hidrocarbonetos. Dessa maneira, com base nas observações realizadas, pode-se inferir que ocorreu a modificação com DADD nas partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$. Estabelecendo uma comparação entre o espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ -DADD com espectro $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ -DADD-PEP, verifica-se que houve a introdução de grupos característicos dos aminoácidos presentes na sequência peptídica. Isto pode ser justificado pelo aumento da intensidade da banda em 3323 cm^{-1} , resultante da sobreposição das bandas de deformação axial de O-H e N-H. Além disso, ocorre também um aumento de intensidade na região de 1639 cm^{-1} , atribuída à deformação angular simétrica de ligações do tipo N-H e o aparecimento de uma banda em 1560 cm^{-1} , típica da deformação axial assimétrica da ligação C=O. As bandas de estiramento C=C em 1475 e 1379 cm^{-1} também são observadas, sugerindo a

presença de anéis aromáticos, o que está de acordo com esperado, uma vez que a sequência peptídica apresenta histidina e triptofano em sua estrutura.

Figura 12: Espectro de FTIR das partículas magnéticas de Fe₃O₄/CS (—), Fe₃O₄/CS-DADD (—) e após imobilização da sequência peptídica (Fe₃O₄/CS-DADD-PEP) (—).



Fonte: autoria própria.

A Tabela 5 apresenta de forma resumida as principais bandas representadas na Figura 12 e seus respectivos grupos funcionais (108,109).

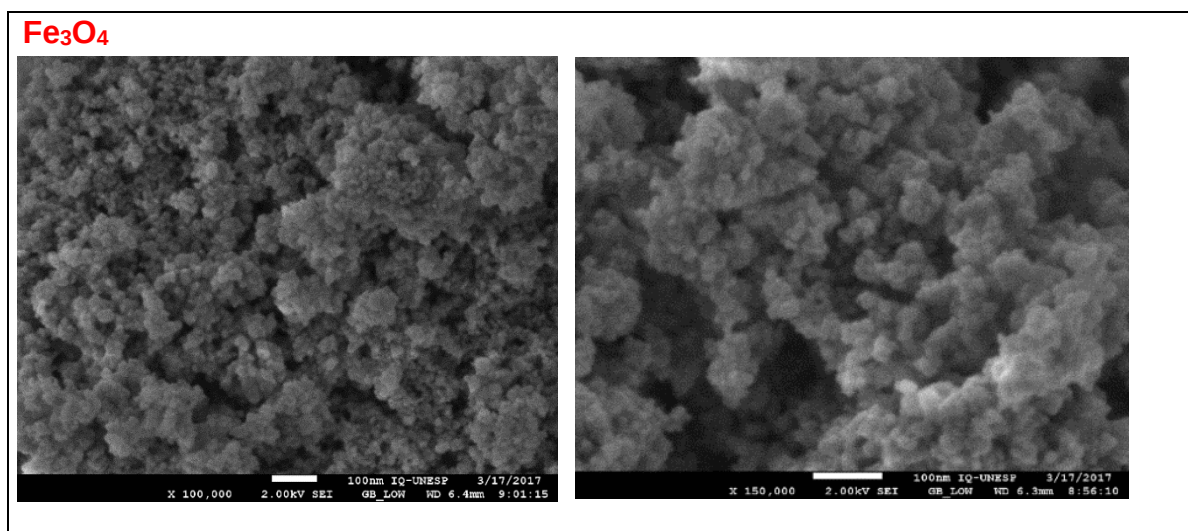
Tabela 5: Principais grupos funcionais e atribuições das partículas de magnetitas e magnetitas modificadas.

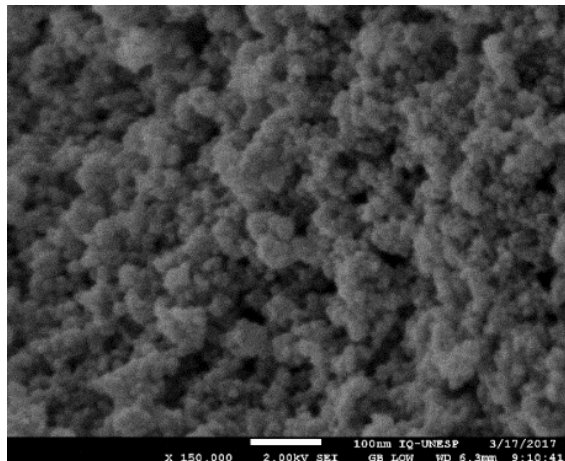
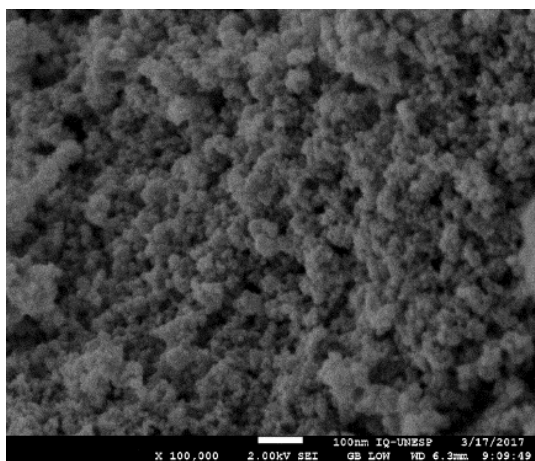
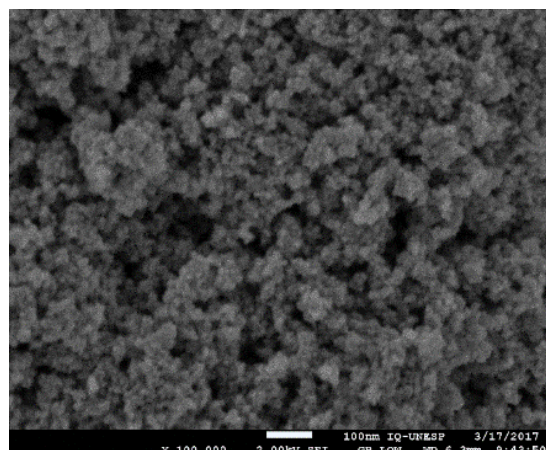
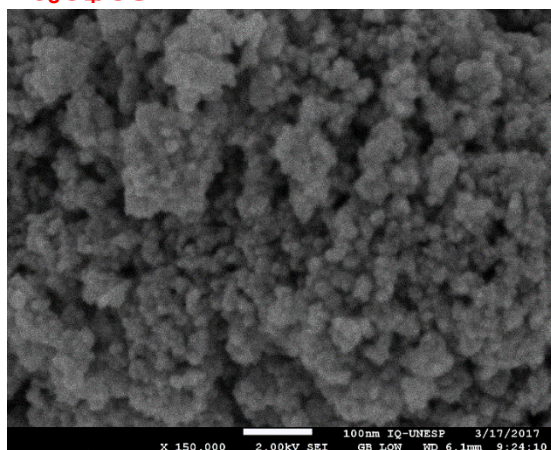
Principais bandas (cm ⁻¹)	3400 - 3330	2929 e 2858	1639	1560	1475 e 1379	~541
Atribuições	ν (O-H) ν (N-H)	ν (C-H)	δ (N-H)	ν (C=O)	ν (C=C)	Fe-O

4.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A Figura 13 mostra as imagens de microscopia das partículas magnéticas de Fe_3O_4 sintetizada no laboratório, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$. Pode-se observar que as partículas magnéticas de Fe_3O_4 foram obtidas satisfatoriamente, mas nota-se pequenos aglomerados de partículas esféricas muito pequenas com diferentes morfologias. Após o revestimento com quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$), constata-se que ocorreu um encapsulamento, uma vez que a imagem mostra uma pequena uniformização na morfologia, ou seja, verifica-se uma diferença na forma estrutural das partículas que pode ser causada pela película de quitosana. As imagens das partículas funcionalizadas com DADD ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$) não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as partículas revestidas com quitosana, onde também pode-se observar pequenos aglomerados esféricos de partículas.

Figura 13: Imagens de SEM-FEG das partículas magnéticas com magnificação de 100.000 e 150.000X respectivamente.



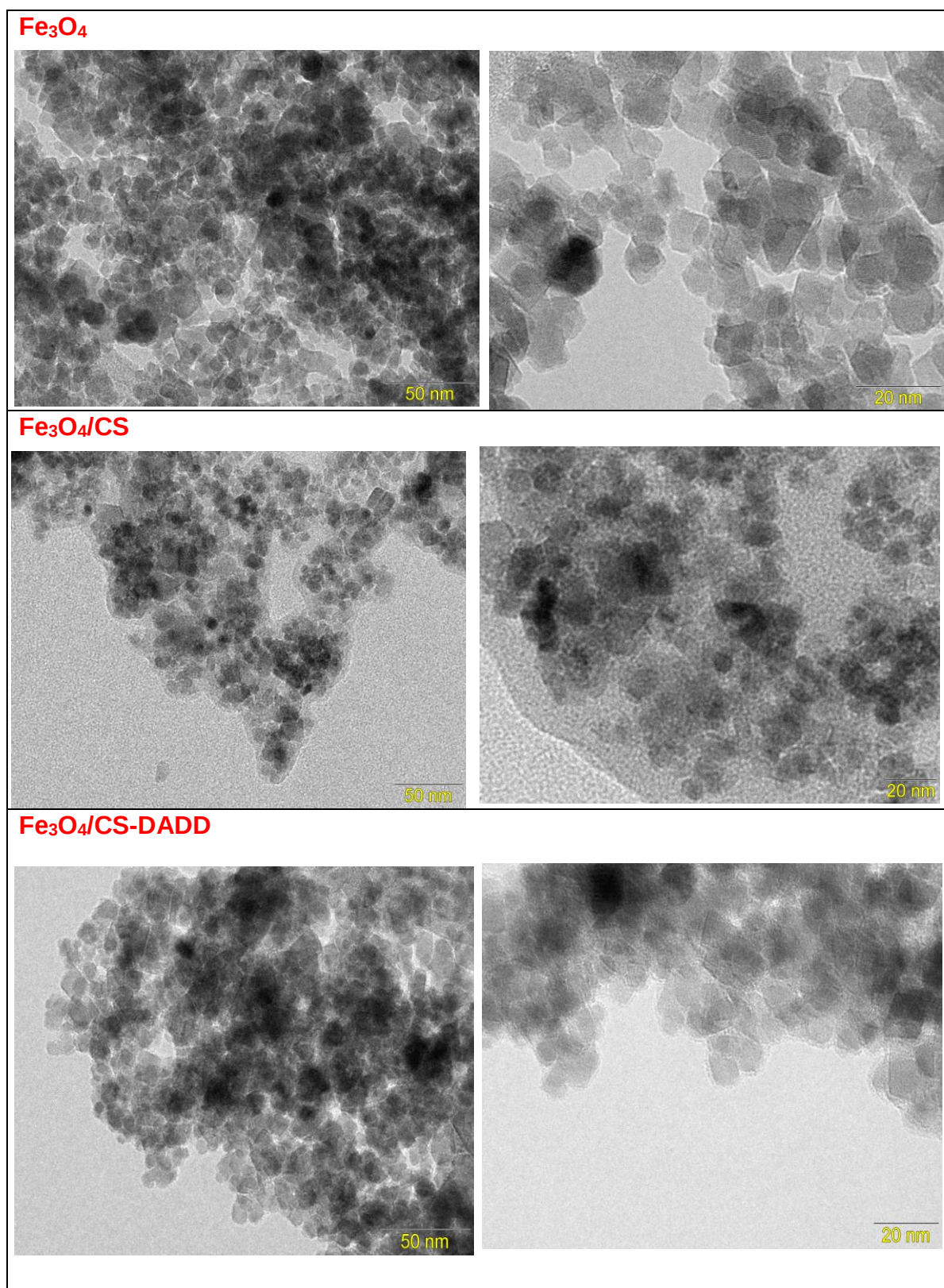
Fe₃O₄/CS**Fe₃O₄/CS-DADD**

Fonte: autoria própria.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Com o intuito de melhor visualizar a morfologia dos materiais sintetizados, foram realizadas imagens utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. As imagens de TEM podem ser visualizadas na Figura 14, onde se observa um agregado de partículas de Fe₃O₄ com morfologia diferente. Após a interação de Fe₃O₄ com quitosana (Fe₃O₄/CS), foi possível detectar alteração na estrutura das amostras funcionalizadas, onde se observa uma película em torno das partículas, mostrando que de fato ocorreu o revestimento com quitosana. Esse revestimento também pode ser visualizado nas imagens referente a Fe₃O₄/CS- DADD, onde observamos também uma “melhora” nos aglomerados esféricos das partículas.

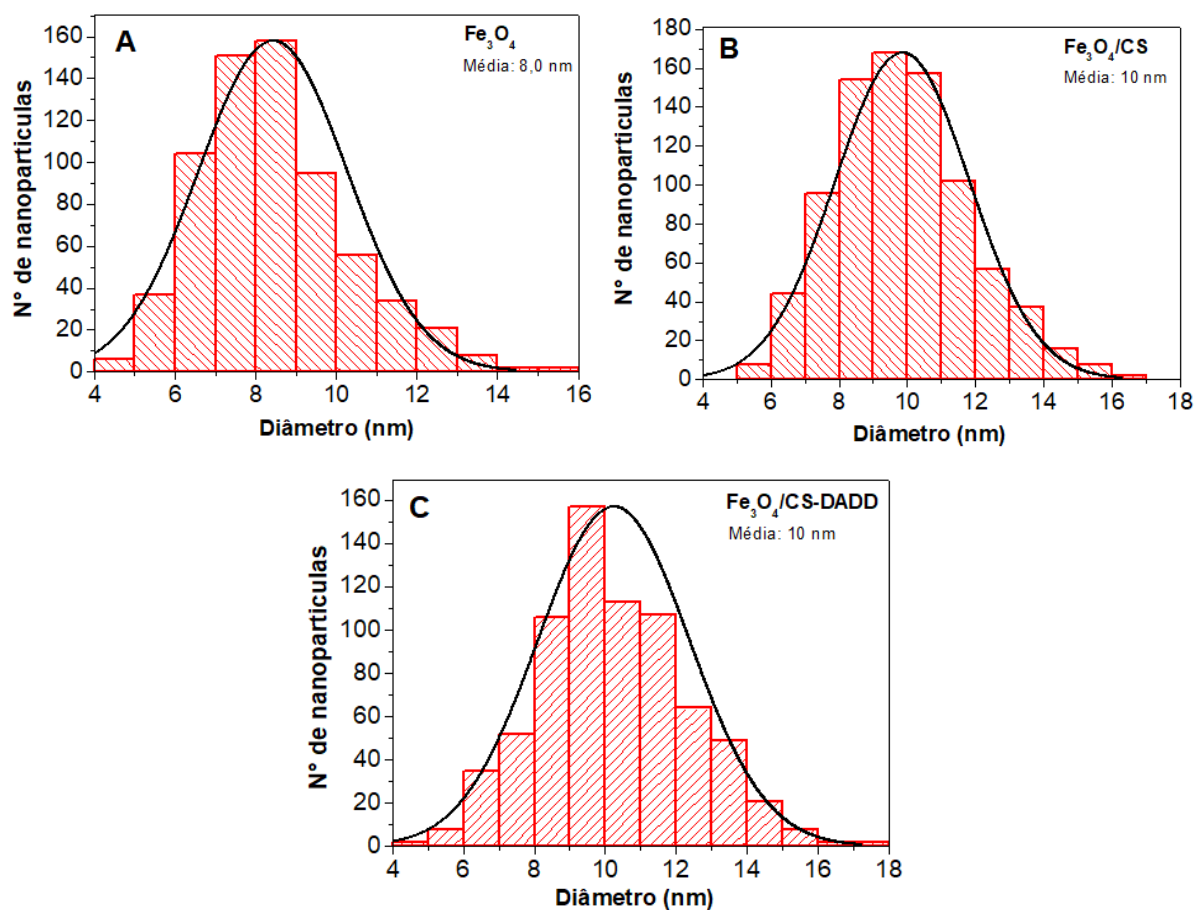
Figura 14: Imagens de MET das partículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$ com ampliação de 50 e 20 nm respectivamente.



Fonte: autoria própria.

Dentre as técnicas atuais, a mais utilizada para a observação direta de nanoestruturas, formando imagens a níveis atômicos, é o TEM. Assim, esta técnica permite fazer a análise da morfologia, tamanho e distribuição das nanopartículas sintetizadas. A partir das imagens de TEM e com auxílio do *software* ImageJ® foi possível medir o tamanho das partículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$. A Figura 15 apresenta o gráfico de distribuição de tamanho das partículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$ obtidas pela contagem direta das partículas. Os resultados mostram uma heterogeneidade de tamanhos, onde se observa um tamanho médio de 8,0 nm para Fe_3O_4 e 10,0 nm para os materiais $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$.

Figura 15: Histograma obtido pela contagem das partículas de (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

4.4 Análise pelo método de BET

O método de BET é um dos procedimentos utilizados para a determinação da área superficial específica de materiais. A Tabela 6 apresenta os valores de área superficial, volume e tamanho médio dos poros de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$. Analisando os dados, pode-se observar que a área específica dos materiais em estudo, são relativamente próximas, variando de 103,96 a 112,60 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. Em relação ao volume dos poros, não houve variação significativa após a modificação da superfície dos materiais de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$.

O tamanho médio dos poros das partículas de óxido de ferro é da ordem de nanômetros. Observa-se que após a modificação, houve uma pequena diminuição, isto pode estar associado ao preenchimento ou recobrimento dos poros das nanopartículas com os modificadores, indicando que a quitosana e o DADD foram incorporados na matriz. Como a análise de área superficial por BET realiza medidas da área através de terminação do volume de gás nitrogênio adsorvido/dessorvido fisicamente sobre a superfície da amostra (110), o tamanho de poro tende a ser menor para $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$ uma vez que o volume dos poros presentes na superfície foram preenchidos com quitosana e DADD, respectivamente. Este fato explica a diminuição do tamanho médio dos poros das nanopartículas de 13,54 para 12,62 nm após as modificações.

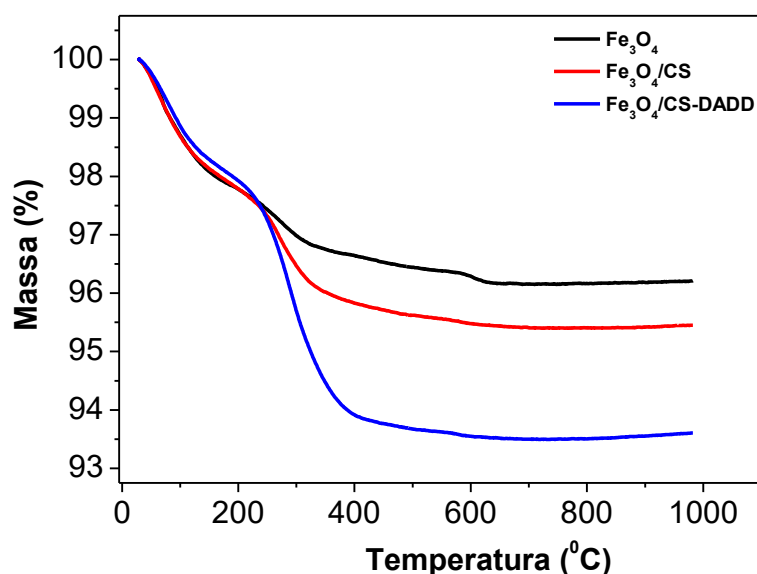
Tabela 6: Dados da isoterma de adsorção (BET) obtidos para as nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$.

Material	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume do poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Tamanho médio dos poros (nm)
Fe_3O_4	112,60	0,40	13,54
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$	103,96	0,39	13,21
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$	110,20	0,38	12,62

4.5 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas (TG) desempenham papel importante na determinação da estabilidade térmica dos materiais, além de fornecerem dados quantitativos quanto a perda de massa em função da temperatura. As curvas TG estão apresentadas na Figura 16, onde se observa que as nanopartículas magnéticas de ferro apresentam uma pequena perda de massa (cerca de 2,5%) até 220 °C, atribuída à perda de água adsorvida; todas as amostras mantêm a massa após 500 °C. Pode-se perceber que a incorporação de quitosana e DADD às nanopartículas foi realizada satisfatoriamente uma vez que há um aumento na perda de massa dos materiais estudados em cada etapa de síntese.

Figura 16: Curvas de TG para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$.



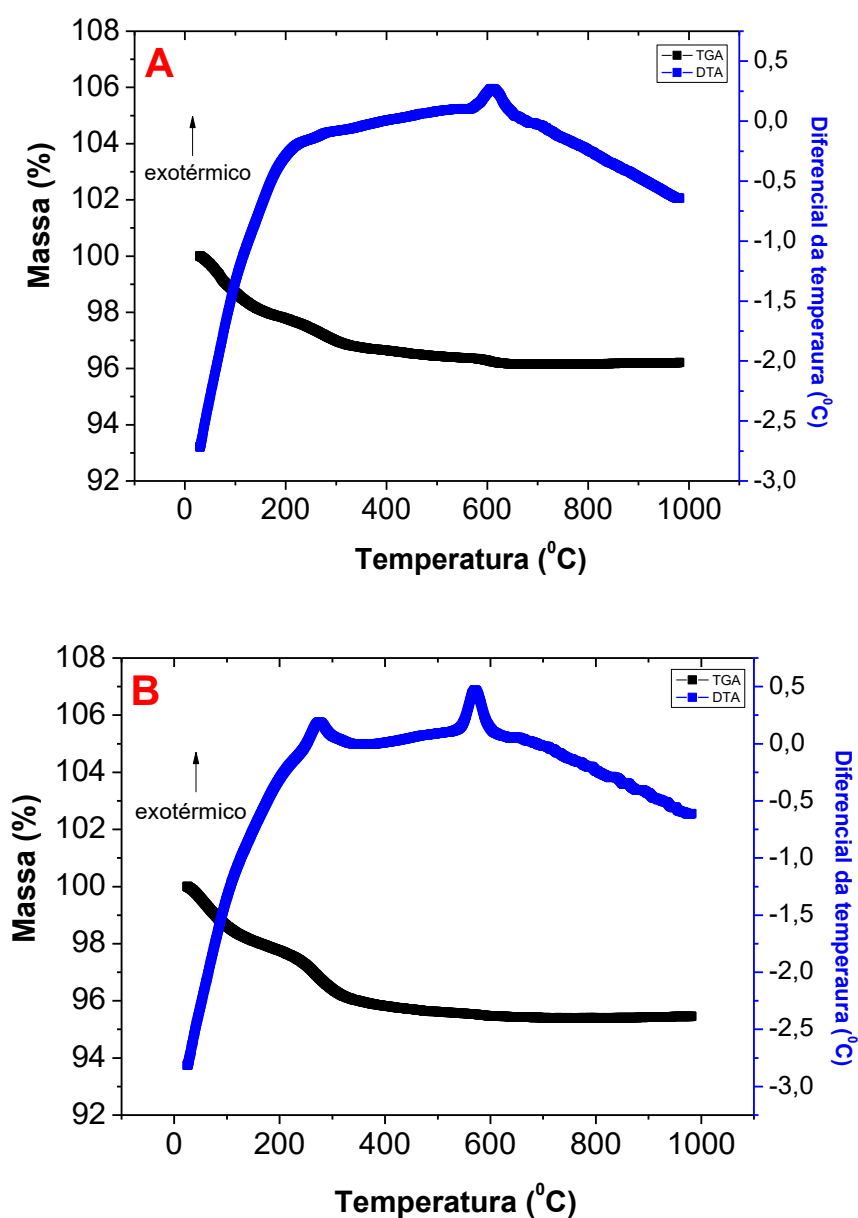
Fonte: autoria própria

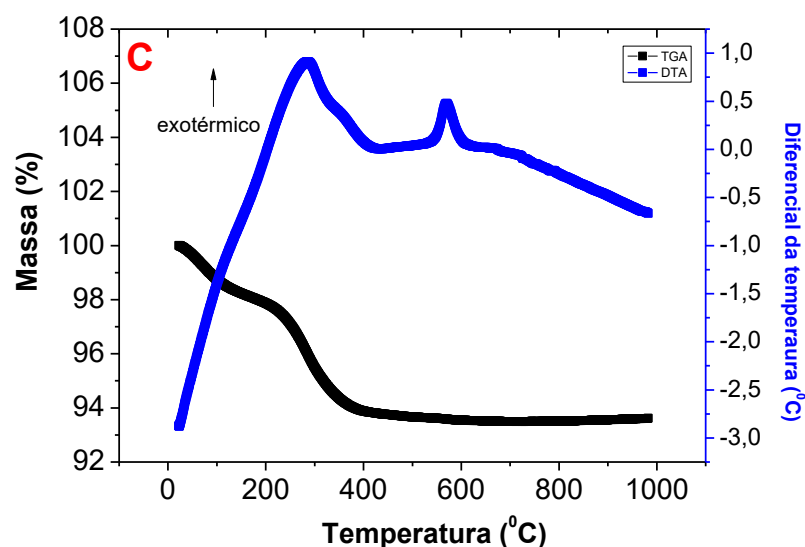
Os processos físicos e químicos envolvendo variação de energia podem ser melhor descritos com as curvas de Análise Térmica Diferencial (DTA) que estão representadas juntamente com TG na Figura 17. Para a magnetita, verifica-se apenas um evento exotérmico em torno de 600 °C (Figura 17A), que corresponde à transição de fase da magnetita para hematita (111). As Figuras 17B e 17C apresentam dois eventos de decomposição térmica. O primeiro por volta de 250 °C

relacionado à decomposição de matéria orgânica e o segundo estágio de decomposição térmica em torno de 600 °C resultante da decomposição de Fe_3O_4 a Fe_2O_3 (ferro II para ferro III). A temperatura diferencial apresentada na Figura 17C é maior do que na Figura 17B.

De acordo com os resultados de análise térmica pode-se inferir que as nanopartículas de Fe_3O_4 foram recobertas com quitosana, pois observa-se eventos relacionados à decomposição de material orgânico, que estão diretamente ligados à incorporação de quitosana e DADD às nanopartículas de magnetita.

Figura 17: Curvas de TG e DTA para (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD}$.





Fonte: autoria própria.

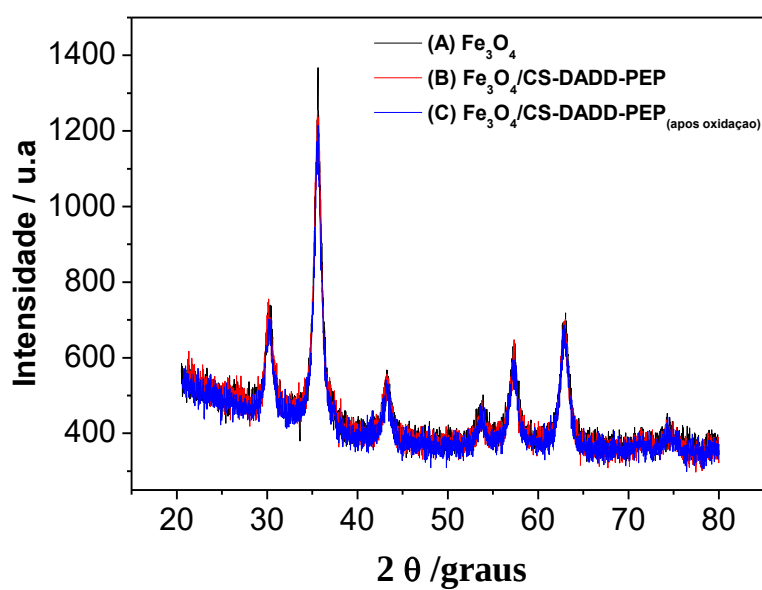
4.6 Difração de raios X

A difração de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização estrutural e microestrutural de materiais cristalinos, permitindo identificá-los mediante comparação com estruturas cristalinas já conhecidas.

A Figura 18 apresenta os difratogramas das nanopartículas obtidas pelo método de síntese por co-precipitação e subsequentes modificações da magnetita. Na Figura 18A temos Fe_3O_4 que foi modificado com quitosana, DADD e imobilização da sequência peptídica - $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD-PEP}$ (Figura 18B). Na Figura 18C temos $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD-PEP}$ após oxidação do material na superfície do eletrodo. Os valores de 2θ encontrados nos difratogramas foram: $30,1^\circ$; $35,7^\circ$; $43,3^\circ$; $53,7^\circ$; $57,3^\circ$ e $62,8^\circ$. Esses dados foram analisados na Base de Dados de Estruturas Cristalinas (BDEC) ou Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), a qual utiliza o programa CRYSTMET (versão 5.6.0), onde verificou-se que tais valores são referentes a difrações dos planos da fase cristalina estrutura do espinélio da magnetita (112), conforme apresentado na Figura 19.

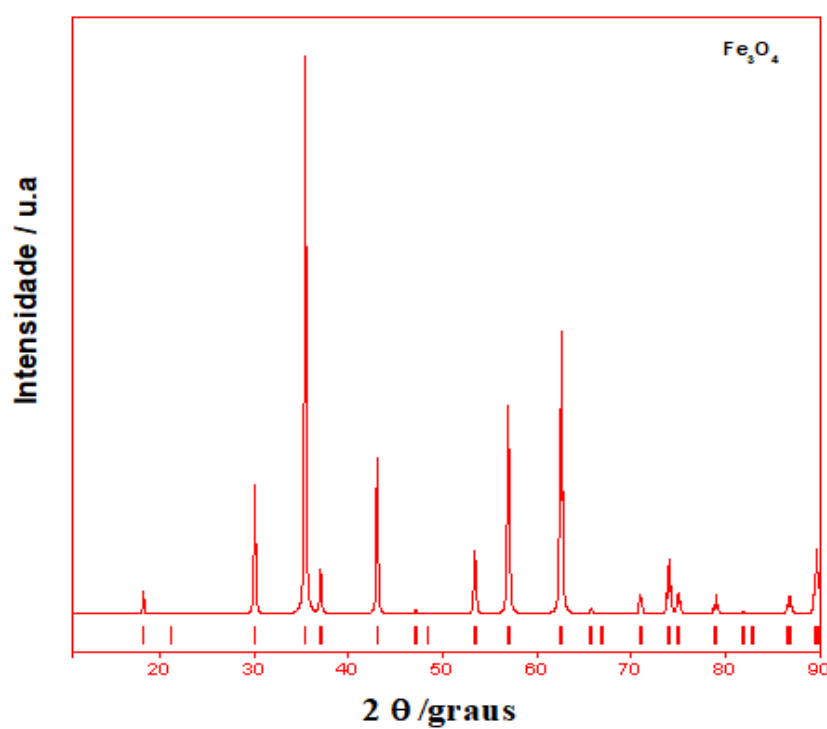
Analisando a Figura 18C, observamos que após a varredura de potencial no intervalo de -0,2 a +1,3 V, não houve alteração na estrutura cristalina do material $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD-PEP}$.

Figura 18: Difratoograma obtido para: (A) Fe_3O_4 , (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DADD-PEP}$ e (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-DAD-PEP}$ após oxidação do material na superfície do eletrodo.



Fonte: autoria própria.

Figura 19: Difratoograma da magnetita obtido na Base de Dados de Estruturas Cristalinas.

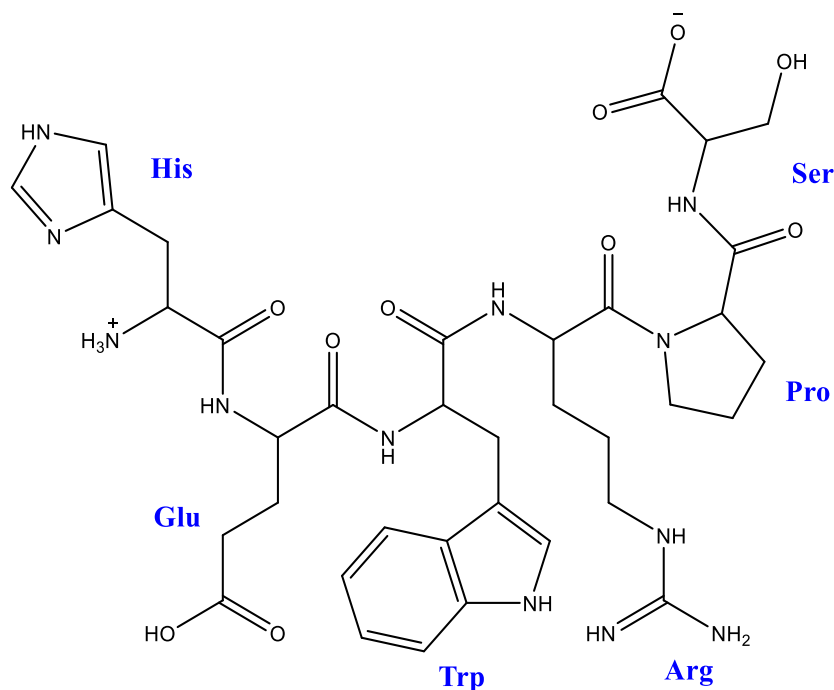


Fonte: Ficha cristalográfica N°480786. Base de Dados de Estruturas Cristalinas (112)

4.7 Resposta eletroquímica da sequência peptídica em solução

A sequência peptídica SEQPEP1 é constituída por ($\text{NH}_3^+ - \text{His} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$), conforme ilustrada na Figura 20.

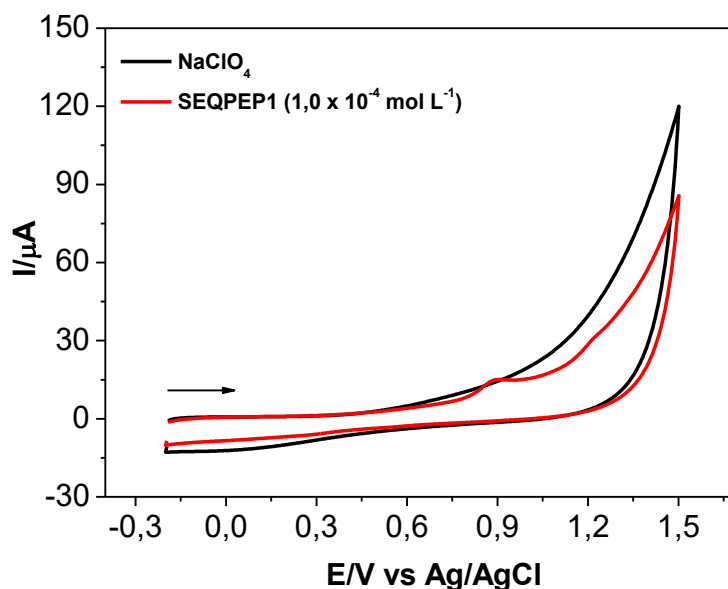
Figura 20: Estrutura química da sequência peptídica (SEQPEP1).



Fonte: autoria própria.

Afim de avaliar a resposta eletroquímica da sequência peptídica sobre o eletrodo de carbono vítreo, foram realizados experimentos preliminares usando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Os dados experimentais obtidos por voltametria cíclica (Figura 21), mostram que a SEQPEP1 apresentou um pico anódico no sentido de varredura de potenciais crescentes ($E_p = +0,9 \text{ V}$), ou seja, ocorre um processo de oxidação do analito sobre o eletrodo de carbono vítreo. Na varredura no sentido inverso não foi observado pico de redução.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos para a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 (—) e na mesma solução de eletrólito contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de SEQPEP1 (—). Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

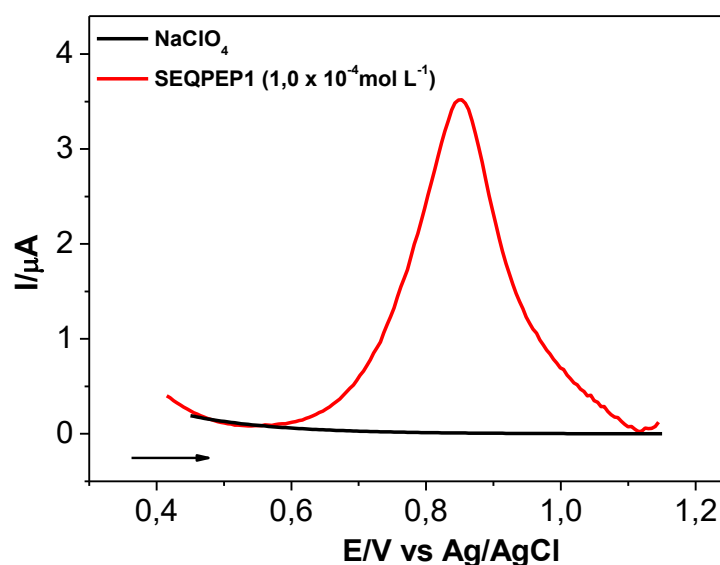


Fonte: autoria própria.

A sequência peptídica apresenta em sua estrutura os aminoácidos histidina e triptofano, que são suscetíveis à reação redox, uma vez que possuem em sua estrutura química grupos aromáticos que são muito sensíveis ao ataque oxidativo das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. A oxidação do triptofano no eletrodo de carbono vítreo ocorre no anel indol e corresponde a formação de 2-oxi-indol. A oxidação seguinte leva a formação de uma espécie 2,7-oxi-indol, logo o triptofano apresenta dois potenciais de oxidação ($E_p = +0,65 \text{ V}$ e $E_p = +1,05 \text{ V}$). Por outro lado, a oxidação da histidina em eletrodo de carbono vítreo corre em apenas um potencial ($E_p = +1,2 \text{ V}$). O centro eletroativo da histidina é o grupo imidazol e os resíduos da histidina são oxidados a 2-oxohistidina (71,72,113).

A Figura 22, apresenta o perfil voltamétrico da SEQPEP1 usando voltametria de onda quadrada, onde podemos observar um pico de oxidação em torno de $+0,9 \text{ V}$, valor próximo do obtido na voltametria cíclica. Esse pico ($E_p = +0,9 \text{ V}$) está relacionado à oxidação da histidina, uma vez que o triptofano apresenta dois picos de oxidação.

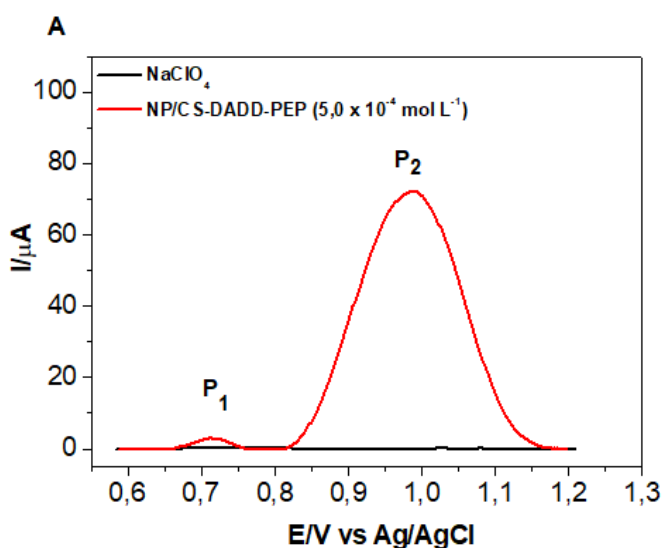
Figura 22: Voltamograma de onda quadrada obtido para a SEQPEP1 em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. Ajuste da linha de base dos voltamogramas pelo software NOVA 2.1.



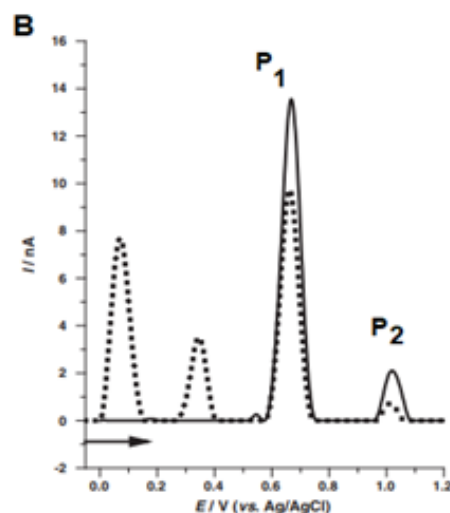
Fonte: autoria própria.

A Figura 23A mostra o voltamograma de onda quadrada da SEQPEP1 na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ imobilizada sobre nanopartículas magnéticas, onde se observa um pico ao redor de $+0,7 \text{ V}$. O aminoácido presente na sequência peptídica que poderia estar sofrendo oxidação neste potencial é triptofano. A Figura 23B apresenta o voltamograma de pulso diferencial da oxidação do triptofano obtido por Enache e Brett em eletrodo de carbono vítreo (72). Analisando o voltamograma da oxidação do triptofano (Figura 23B), observa-se que a corrente de pico $P_1 > P_2$, o que não ocorre quando se compara com o voltamograma da oxidação da SEQPEP1, ou seja, $P_1 < P_2$. Logo se pode inferir que, de fato, o pico monitorado na oxidação da SEQPEP1 é referente à oxidação da histidina.

Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. ET = carbono vítreo modificado com nanopartículas magnéticas conforme inserido na figura. (B) Voltamograma de pulso diferencial em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $a = 50 \text{ mV}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e intervalo de pulso 70 ms . P_1 (primeiro pico) e P_2 (segundo pico).



Fonte: autoria própria.



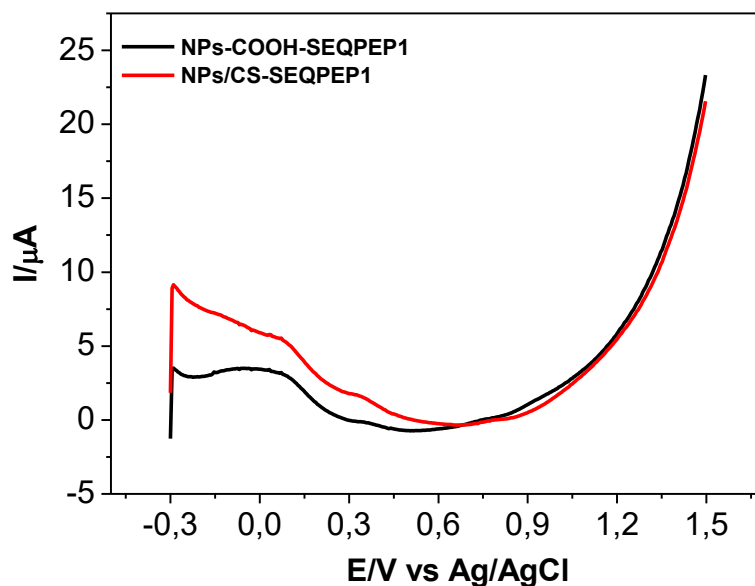
Fonte: Enache e Brett (72).

4.8 Imobilização do peptídeo sobre partículas magnéticas de ferro

Para proceder com a imobilização da SEQPEP1, utilizou-se nanopartículas comercial de óxido de ferro funcionalizadas com grupos carboxílicos ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$) e nanopartículas revestidas com quitosana, sintetizadas no laboratório.

A estratégia de síntese era imobilizar a sequência peptídica SEQPEP1 pelo grupamento amino terminal com o grupo carboxílico presente nas nanopartículas. Para isto foram utilizados nanopartículas comerciais funcionalizadas com grupo carboxílico e nanopartículas revestidas com quitosana. A Figura 24 mostra que essa estratégia de síntese não foi satisfatória uma vez que não se observou o pico referente à oxidação do analito. Tal fato pode ser justificado pelo grupo amino terminal, a histidina possui um anel aromático em sua estrutura, o que pode estar causando um impedimento estérico e consequentemente dificultando a ligação do grupo amino terminal do resíduo de histidina com o grupo carboxílico presente na superfície das nanopartículas.

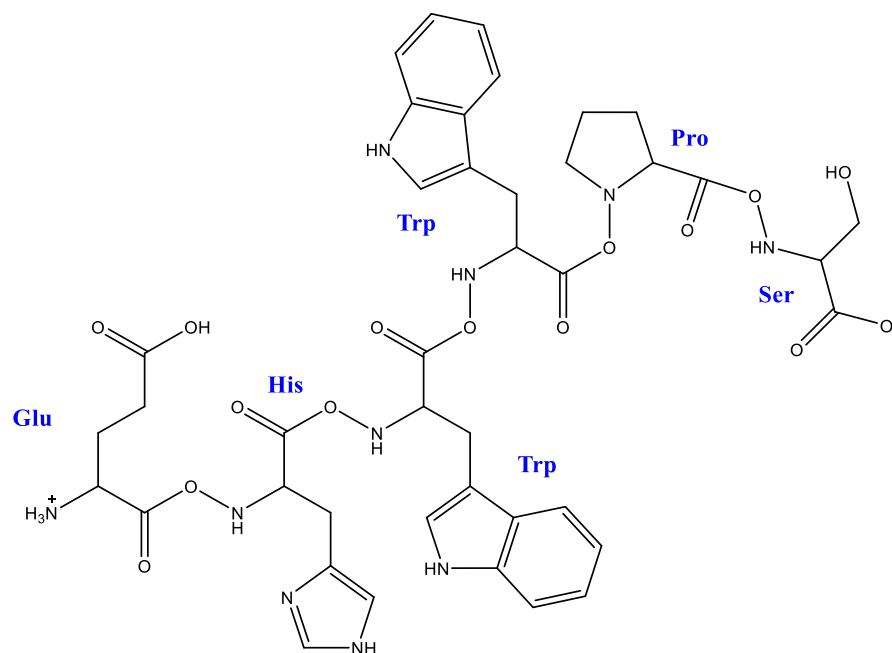
Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada para eletrodo de carbono vítreo em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Peptídeo imobilizado na superfície das partículas carboxiladas e funcionalizadas com quitosana. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



Fonte: autoria própria.

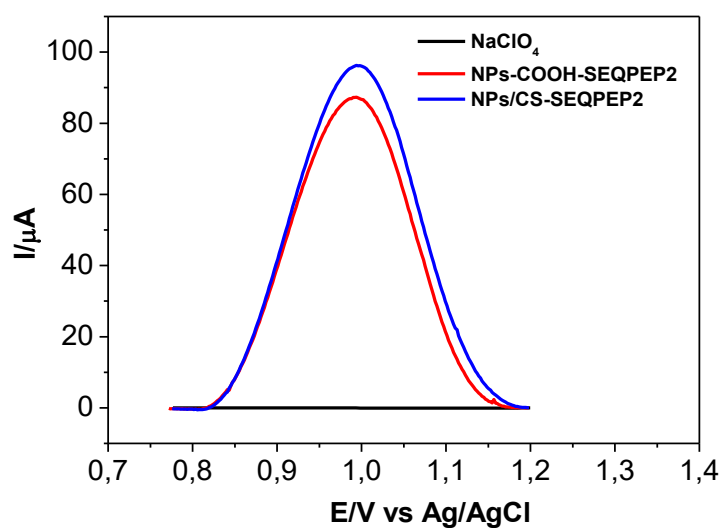
Com o objetivo de comprovar que o anel aromático da histidina estaria dificultando a ligação, realizou-se experimentos utilizando uma sequência peptídica com ácido glutâmico na extremidade; a Figura 25 apresenta a estrutura da SEQPEP2 ($\text{NH}_3^+ - \text{Glu} - \text{His} - \text{Trp} - \text{Trp} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{COO}^-$) investigada. A Figura 26 mostra os voltamogramas de onda quadrada da SEQPEP2 imobilizada sobre as nanopartículas magnéticas, onde se observa a presença de pico de oxidação. Mostrando que de fato estava ocorrendo impedimento estérico.

Figura 25: Estrutura química da sequência peptídica (SEQPEP2).



Fonte: autoria própria.

Figura 26: Voltamograma de onda quadrada em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. SEQPEP2 imobilizado na superfície das partículas magnéticas carboxiladas. Concentração do peptídeo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

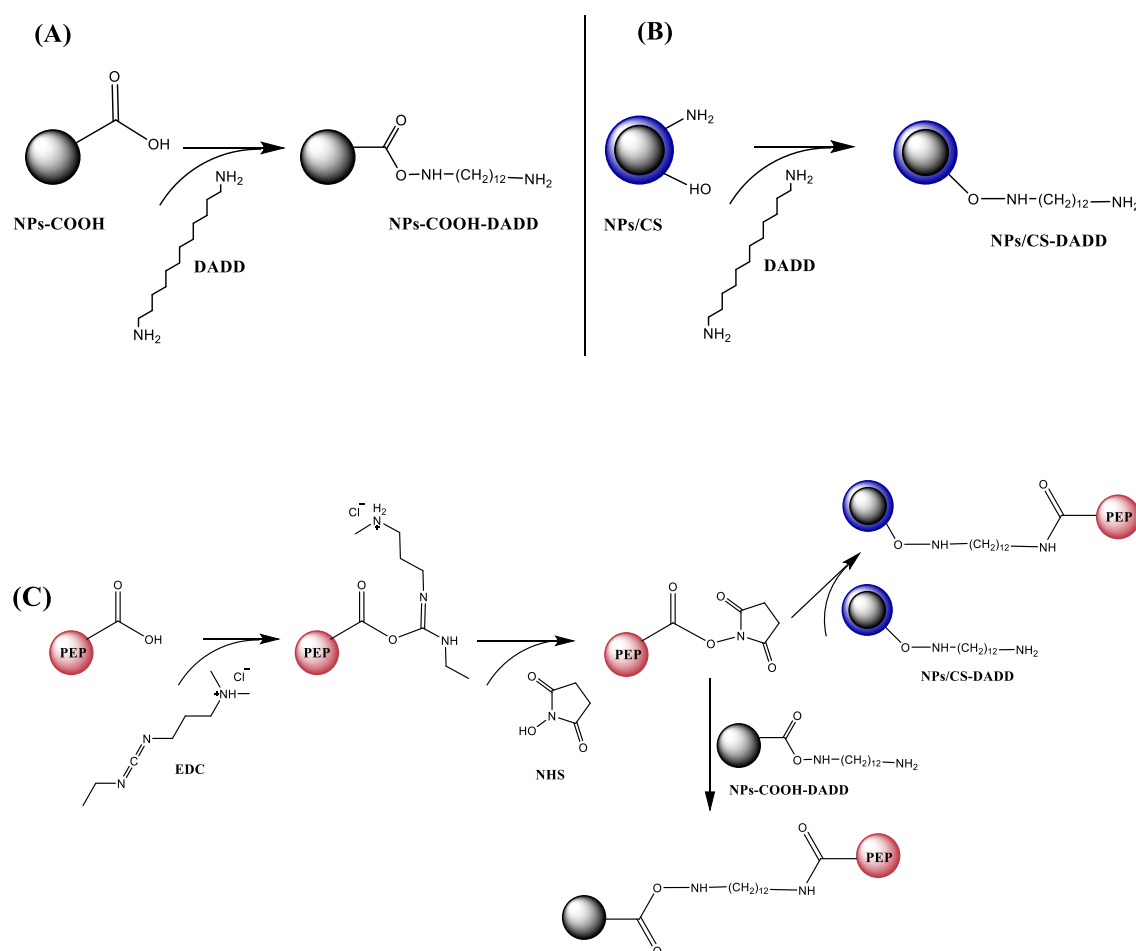


Fonte: autoria própria.

A segunda estratégia foi imobilizar a SEQPEP1 pelo grupamento carboxi terminal com o grupo amino presente nas nanopartículas magnéticas. Para isso, as nanopartículas carboxiladas (comercial) e também aquelas que foram revestidas com quitosana foram funcionalizadas com 1,12-diaminododecano. A Figura 27 mostra o esquema da reação das partículas magnéticas funcionalizadas com DADD sendo com grupo carboxílico (NPs-COOH) na Figura 27A e funcionalizada com CS representada na Figura 27B.

Uma das estratégias de imobilizar agentes biosseletivos é o uso de agentes EDC/NHS (70) para ativar o grupo carboxílico. Na Figura 27C é representado o esquema da reação da pré-ativação da SEQPEP1 com EDC/NHS e posterior imobilização do peptídeo sobre as NPs-COOH-DADD e NPs/CS-DADD.

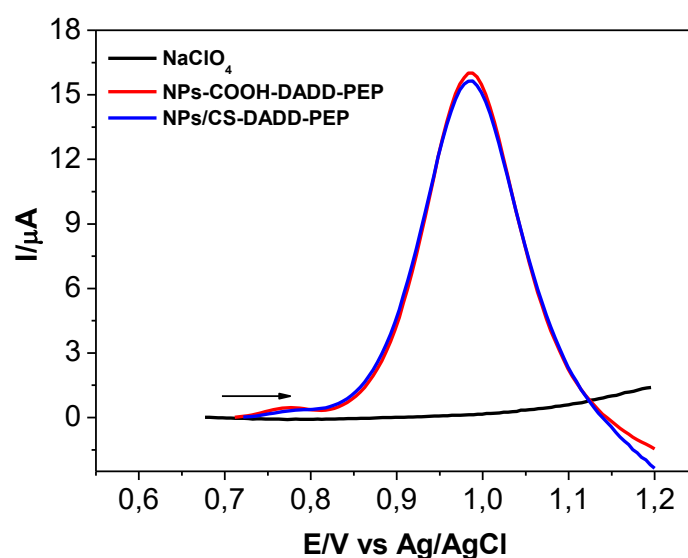
Figura 27: Esquema da modificação da NPs com DADD (A e B) e da reação de ativação da SEQPEP1 com EDC/NHS e imobilização do peptídeo sobre as NPs-DADD (C).



Fonte: autoria própria.

A Figura 28 mostra os voltamogramas de onda quadrada da SEQPEP1 imobilizada sobre as nanopartículas magnéticas, via DADD. Verifica-se o pico de oxidação da histidina, comprovando que a SEQPEP1 foi imobilizada com êxito sobre as NPs comerciais e nas preparadas no laboratório. Desta forma, para os estudos seguintes utilizou-se as NPs/CS-DADD.

Figura 28: Voltamogramas de onda para eletrodo de carbono vítreo em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 na ausência e presença do peptídeo imobilizado na superfície das NPs-COOH-DADD e NPs/CS-DADD. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



Fonte: autoria própria.

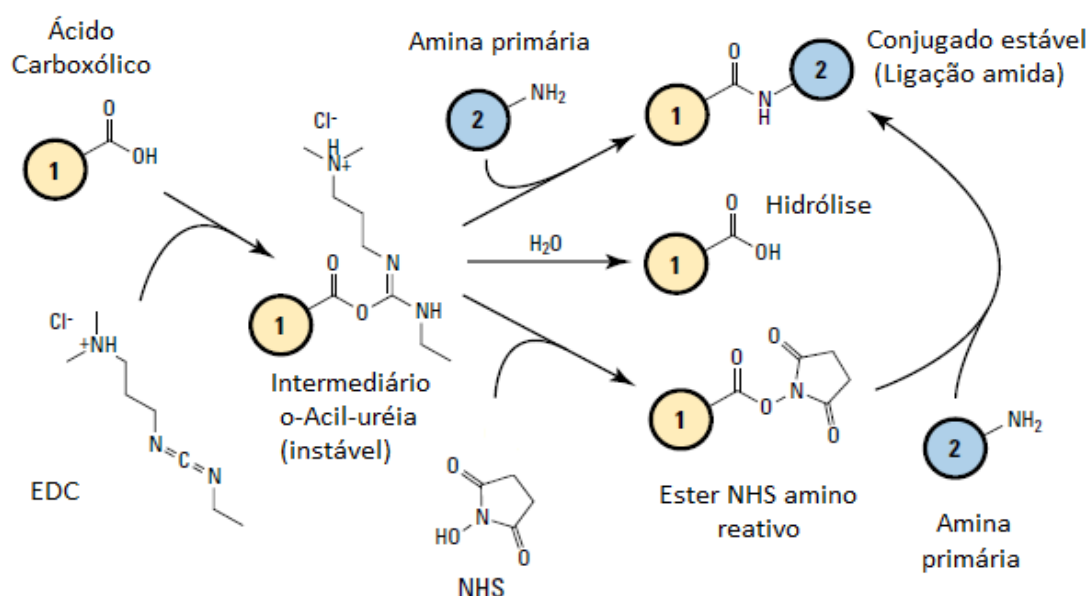
4.9 Otimização dos Parâmetros Experimentais

4.9.1 Concentração de EDC/NHS

O uso de carbodiimidas solúveis em água e hidróxisuccinimidas como reagentes de acoplamento/união para modificação seletiva de carboxilatos e grupos amino presentes em biomoléculas, vem sendo bastante explorado e descrito na literatura (114,115). Em outras palavras, a terminação carboxílica é pré-ativada e a imobilização da molécula ocorre com grupo amino do suporte. É interessante salientar que o EDC e NHS não continuam fazendo parte da ligação, mas são liberados em solução. A Figura 29 apresenta duas estratégias de acoplamento, após

a ativação do grupo carboxílico, formando o éster ativado o-acil-uréia, ocorre a reação direta com grupo amina primária da biomolécula ou uma nova ativação com N-hidroxissuccinimida (NHS) formando um intermediário ativado estável à base de um éster amino reativo que na presença da amina primária forma a ligação amida. A reação de hidrólise do éster ativado regenera o grupo carboxílico.

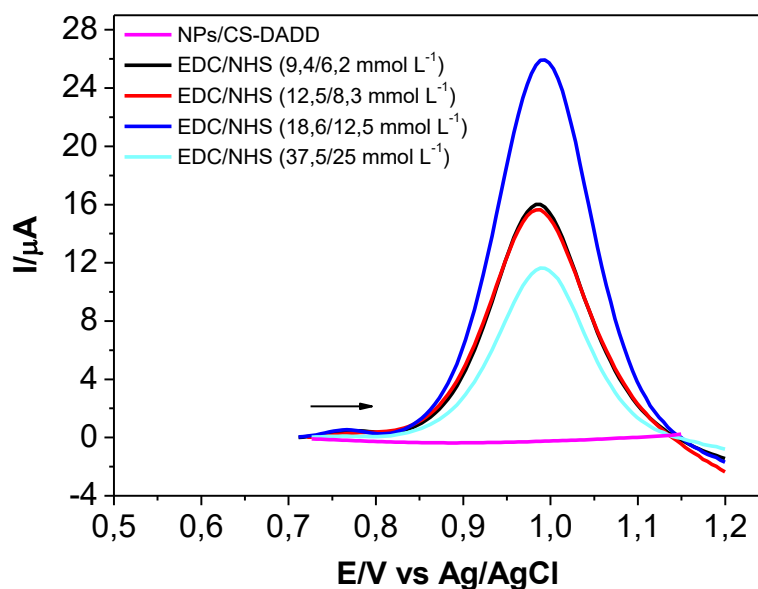
Figura 29: Esquema reacional do EDC com NHS entre o suporte e a biomolécula.



Fonte: Haworth, Protein Methods Library (116).

A Figura 30 apresenta os voltamogramas de onda quadrada da sequência peptídica (SEQPEP1) ativada em diferentes concentrações de EDC (9,4; 12,5; 18,6 e 37,5 mmol L⁻¹) e NHS (6,2; 8,3; 12,5 e 25 mmol L⁻¹) imobilizada sobre NPs/CS-DADD. Os resultados sugerem que a relação de concentração de 18,5/12,5 mmol L⁻¹ (EDC/NHS) foi a que possibilitou a oxidação do grupo histidina com maior corrente de pico, justificando assim a escolha desta condição para preparação dos próximos sensores bioinspirados.

Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Efeito das concentrações EDC/NHS na ativação de PEP para imobilização sobre NPs/CS-DADD. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. ET = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.

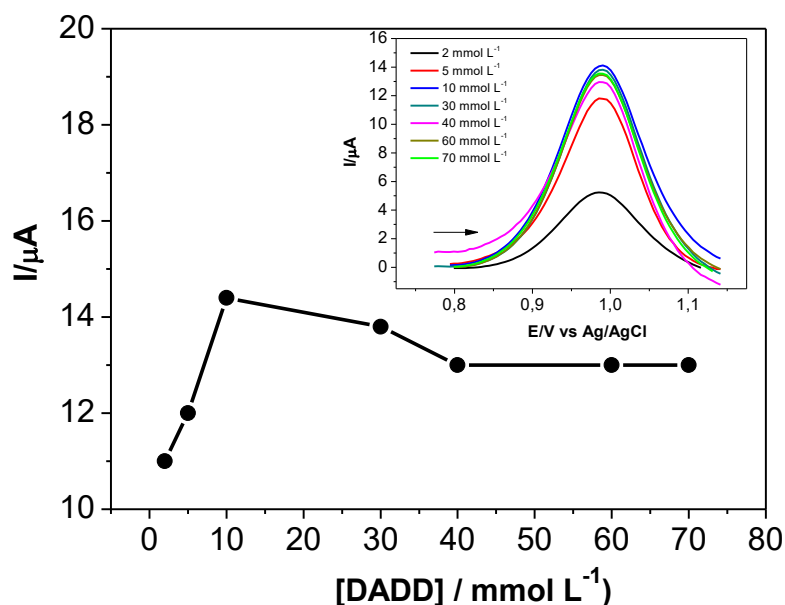


Fonte: autoria própria.

4.9.2 Otimização da concentração de DADD

A variação da quantidade de 1,12-diaminododecano (DADD) a ser utilizada durante a reação também foi avaliada por SWV. Os resultados são apresentados na Figura 31. De acordo com o gráfico, observa-se um aumento de corrente de oxidação em função do aumento da concentração de DADD até 10 mmol L^{-1} . A partir dessa concentração ocorre uma diminuição no valor de corrente, o que pode estar associado ao excesso de DADD sobre a superfície das partículas magnéticas dificultando o processo de transferência de carga entre o sensor bioinspirado e a solução.

Figura 31: Correntes de pico de oxidação vs concentração da solução de DADD (mmol L^{-1}). E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP. Inset: voltamograma de onda quadrada em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

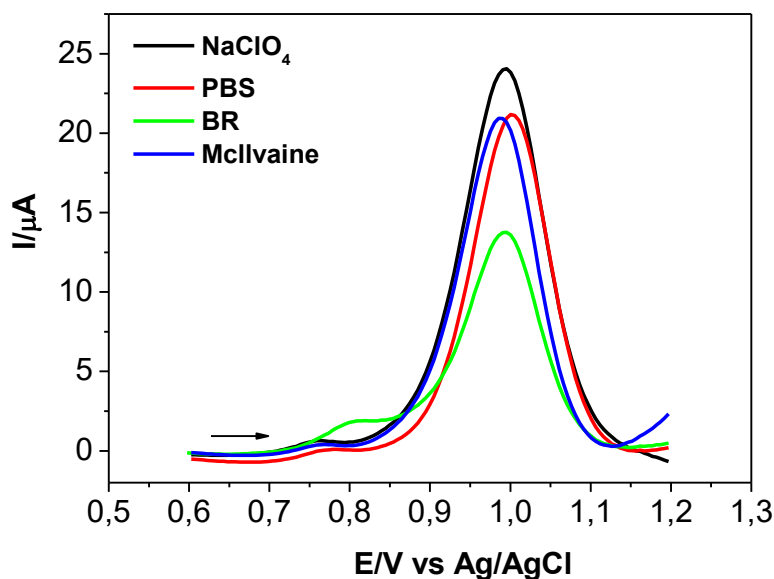


Fonte: autoria própria.

4.9.3 Avaliação do eletrólito suporte e estudo de pH do meio

Experimentos iniciais para a SEQPEP1 foram realizados nos eletrólitos suporte NaClO_4 , PBS, BR e McIlvaine, todos preparados em uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, com o objetivo de avaliar qual eletrólito proporcionaria melhor resposta voltamétrica para o sensor desenvolvido. A maior variação de corrente, quando comparando com os demais eletrólitos estudados, foi obtida com o uso da solução de perclorato de sódio (Figura 32), a qual foi escolhida para estudos subsequentes. Este resultado pode estar associado ao raio de íon hidratado de ClO_4^- ser menor em relação aos outros, possibilitando uma maior mobilidade ou facilidade de transferência de carga entre o sensor bioinspirado e a solução, o que contribui para uma maior corrente de pico.

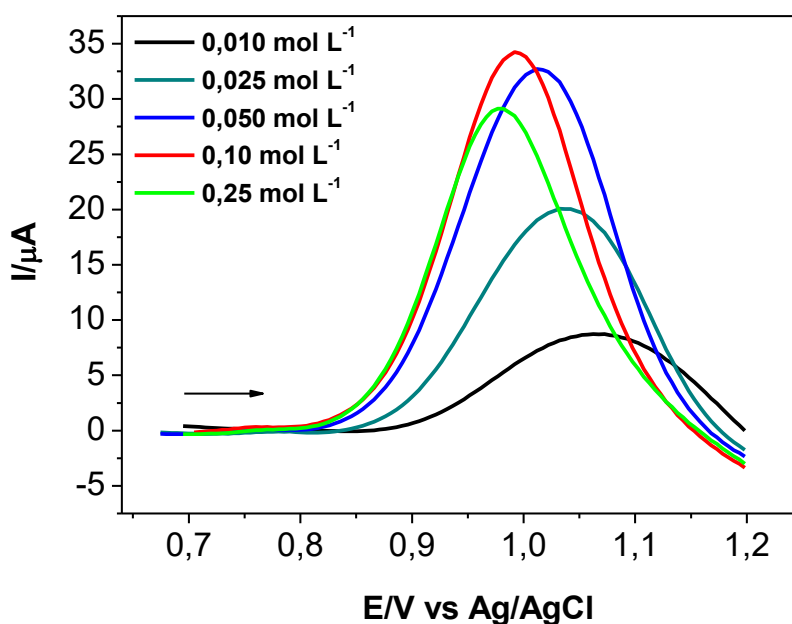
Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada em diferentes eletrólitos, na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.



Fonte: autoria própria.

A concentração da solução eletrolítica pode influenciar em uma melhor resposta do sensor. O efeito de diferentes concentrações da solução de NaClO₄ foram avaliadas. Na Figura 33, observa-se a intensidade de corrente de pico de oxidação de NP/CS-DADD-PEP em meio a solução de NaClO₄ no intervalo de concentração de $0,010$ a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, onde percebe-se que soluções eletrolíticas mais diluídas apresentaram intensidade de corrente de pico menor devido à resistência da solução, comprometendo a transferência de elétrons, ocasionando assim uma menor resposta analítica. Solução mais concentrada de NaClO₄ proporcionaram uma perda de 15% na corrente de oxidação do peptídeo, o que pode estar relacionado com o aumento das cargas elétricas no meio, aumentando assim o tempo de formação da dupla camada elétrica, minimizando a oxidação do peptídeo na superfície do eletrodo (117). A maior intensidade de corrente de pico de oxidação do peptídeo foi obtida na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ a qual será fixada para as próximas etapas.

Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada da solução de NaClO_4 em pH 7,0 em diferentes concentrações do eletrólito. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.



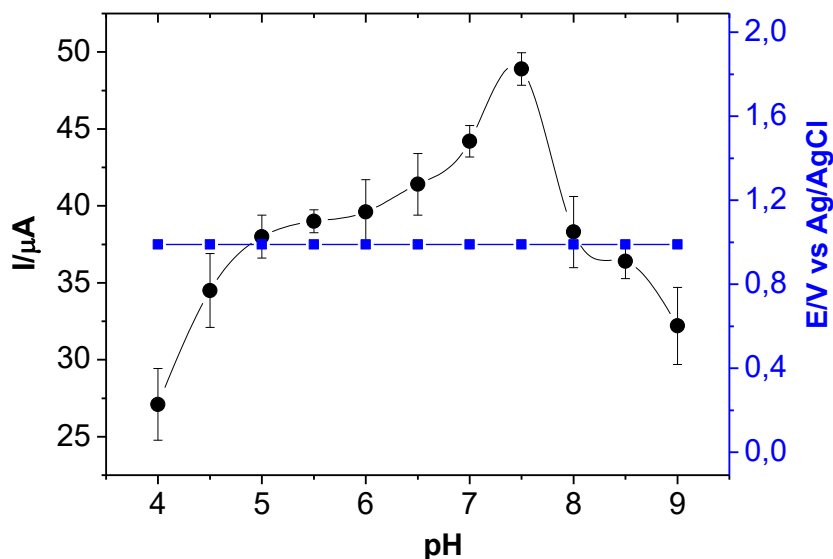
Fonte: autoria própria.

O pH do meio pode afetar a resposta voltamétrica da sequência peptídica em estudo. Desse modo, foram realizados testes de eletroatividade do sensor bioinspirado (NPs/CS-DADD-PEP) em diferentes valores de pH empregando-se solução de NaClO_4 0,1 mol L⁻¹ num intervalo de pH entre 4 a 9.

A sequência peptídica (SEQPEP1) possui grupos ionizáveis (imidazol, carboxila, indol e amino) nas cadeias laterais de seus aminoácidos (Figura 20). De acordo com o pH do meio, estes grupos podem apresentar carga elétrica positiva, negativa ou neutra. Como a conformação da sequência peptídica depende em parte da sua carga elétrica, haverá um pH ótimo para o sistema. A Figura 34 apresenta o gráfico de corrente *versus* variação do valor de pH do meio. O resultado encontrado mostra que a maior corrente foi obtida em pH 7,5; valor próximo do pH ótimo da enzima AChE (pH 7,0) (118). Desta forma, o pH 7,5 do eletrólito suporte foi fixado para as próximas etapas. Ademais na Figura 34 observa-se que não houve variação de potencial em função do valor de pH. Isso mostra que, as reações na superfície do eletrodo não são influenciadas por reações de protonação. A literatura relata que

variações perto do valor teórico de 30 e 60 mV em função do pH indicam protonação (elétrons e prótons envolvidos na reação) (119–121). A invariabilidade do valor de potencial em função do pH sugere que há apenas elétrons envolvidos na reação.

Figura 34: Efeito do pH do eletrólito NaClO₄ e potencial de pico de oxidação do peptídeo imobilizado sobre nanopartículas magnéticas.



Fonte: autoria própria.

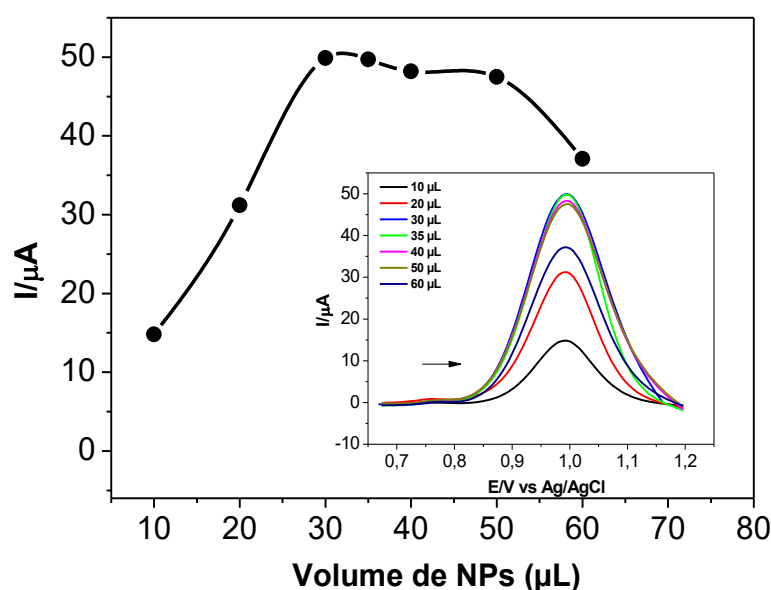
4.9.4 Influência da quantidade de NPs/CS-DADD-PEP sobre a superfície do eletrodo e tempo de reação do DADD com as NPs/CS.

O recobrimento superficial, ou grau de saturação, da superfície do eletrodo é um parâmetro importante no desenvolvimento de biossensores e/ou sensores modificados com nanopartículas.

As nanopartículas magnéticas, apresentam efeitos benéficos tais como o aumento da velocidade de transferência de carga na interface eletrodo/solução, efeito eletrocatalítico e aumento da área ativa do dispositivo (122). O uso de nanopartículas pode aumentar o ganho em sensibilidade e seletividade, em relação as respostas obtidas com eletrodos convencionais. Após a otimização de alguns parâmetros experimentais, avaliou-se a quantidade de partículas magnéticas sobre

a superfície do eletrodo de trabalho, variando de 10 a 60 μL . A Figura 35 apresenta o gráfico de corrente em função do volume de NPs/CS-DADD-PEP, onde se observa um aumento de corrente em função do aumento no volume de NPs/CS-DADD-PEP até 30 μL . A partir desse volume, ocorre uma diminuição no valor de corrente que pode estar relacionada ao excesso de partículas sobre a superfície do eletrodo dificultando o processo de transferência de carga na interface eletrodo/solução.

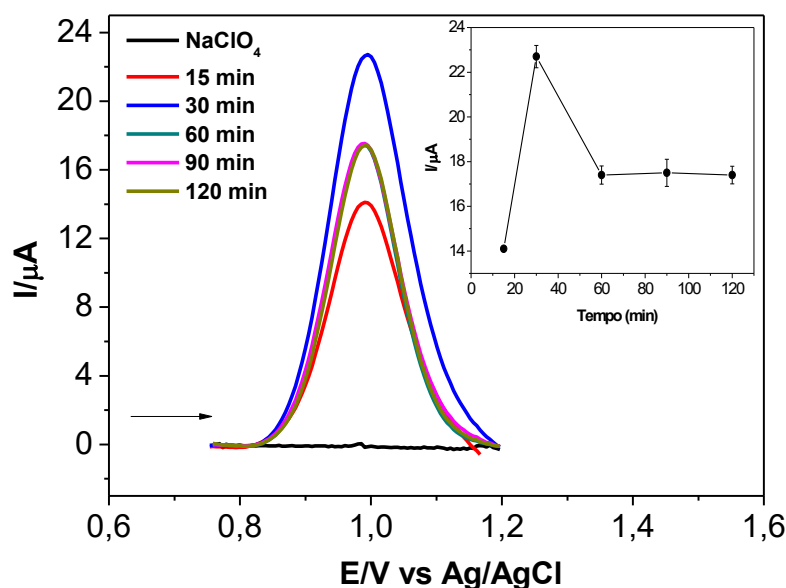
Figura 35: Gráfico da corrente de pico de oxidação vs volume de solução contendo as NPs com peptídeo imobilizado. E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP. Inset: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO_4 0,1 mol L^{-1} . Parâmetros utilizados: $f = 25$ Hz, $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV.



Fonte: autoria própria.

O tempo de reação do DADD com as nanopartículas magnéticas modificadas com quitosana também foi otimizado. Variou-se o tempo de contato de 15 a 120 minutos. A Figura 36 mostra os voltamogramas de onda quadrada, onde se verifica que no intervalo de tempo estudado ocorreu uma pequena variação da corrente de pico, o tempo de 30 minutos foi o que apresentou maior corrente, ou seja, 30 minutos é o tempo suficiente para ocorrer a reação entre o DADD e as NPs/CS.

Figura 36: Voltamogramas de onda quadrada em meio NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. Inset: Gráfico da corrente de pico de oxidação vs tempo de contato das NPs com DADD. E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS.

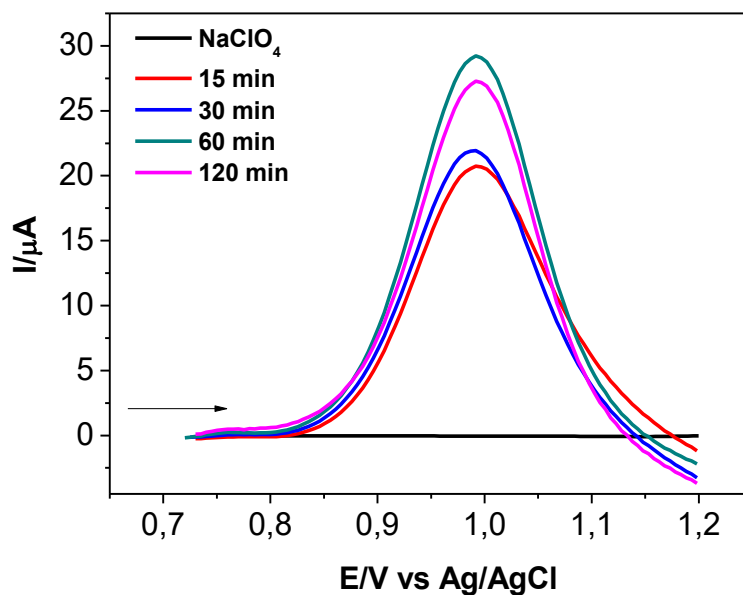


Fonte: autoria própria.

4.9.5 Tempo de ativação do peptídeo com EDC/NHS

Verificou-se anteriormente que uma das estratégias mais comuns de imobilizar agentes biosseletivos é o uso de agentes EDC/NHS. Com base nesse estudo, otimizou-se o tempo de reação necessário para ativar os grupos presentes na SEQPEP1. A Figura 37 mostra que a eficiência da reação de ativação com EDC/NHS ocorre em 60 minutos, ou seja, observa-se um aumento na intensidade de corrente até esse tempo, podendo estar associado com o aumento no número de grupos carboxílicos ativados com EDC/NHS. A partir de 60 minutos, ocorre uma pequena diminuição da corrente de pico que pode estar relacionado a diminuição da eficiência dos agentes de reticulação EDC/NHS.

Figura 37: Voltamogramas de onda quadrada em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5. Efeito do tempo de ativação do PEP. Parâmetros utilizados: $f = 25 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP.



Fonte: autoria própria.

4.9.6 Efeito da concentração do peptídeo ativado e tempo de contato com as NPs.

O uso de ferramentas estatísticas tais como o planejamento fatorial, já foram empregados para otimização de métodos eletroanalíticos obtendo-se bons resultados, uma vez que é possível selecionar as variáveis experimentais que influenciam significativamente na resposta analítica (123,124).

Para otimização das condições experimentais estabelecidas neste item, utilizou-se uma matriz de planejamento fatorial completo 2^2 e um ponto central. As variáveis estudadas foram: concentração do peptídeo ativado com EDC/NHS e o tempo de contato desse peptídeo ativado com as NPs/CS-DADD. A Tabela 7 apresenta as diversas combinações de valores de concentração e tempo de incubação geradas pelo software para a realização dos experimentos e os respectivos valores de intensidade de corrente obtido utilizando voltametria de onda quadrada.

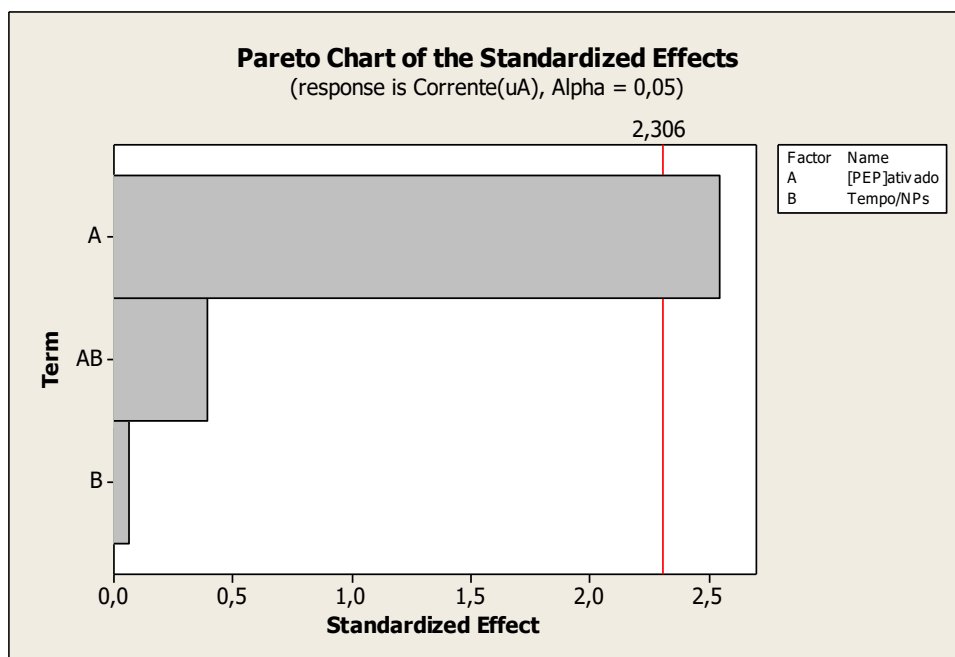
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa *Minitab*® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).

Experimento	PEP _{ativado} (mol L ⁻¹)	T _{contato} (min)	I (μA)
1	5,0 x 10 ⁻⁵	30	49,0
2	5,0 x 10 ⁻⁴	30	31,6
3	5,0 x 10 ⁻⁵	60	40,5
4	5,0 x 10 ⁻⁴	60	28,5
5	5,0 x 10 ⁻⁵	30	38,2
6	5,0 x 10 ⁻⁴	30	32,4
7	5,0 x 10 ⁻⁵	60	49,0
8	5,0 x 10 ⁻⁴	60	31,9
9	5,0 x 10 ⁻⁵	30	29,6
10	5,0 x 10 ⁻⁴	30	28,4
11	5,0 x 10 ⁻⁵	60	32,5
12	5,0 x 10 ⁻⁴	60	28,3
13 (PC)	2,75 x 10 ⁻⁴	45	31,4

*PC= ponto central

Através dos resultados apresentados na Tabela 7 e com o auxílio do *Minitab*® 15 Statistical Software foi possível avaliar a influência de cada parâmetro sobre o sistema. Observa-se no Gráfico de Pareto (Figura 38) que a variável que influencia significativamente na resposta do sistema é a concentração do peptídeo. Por outro lado, o tempo de contato do peptídeo ativado sobre as partículas não apresentou influência significativa no processo de imobilização.

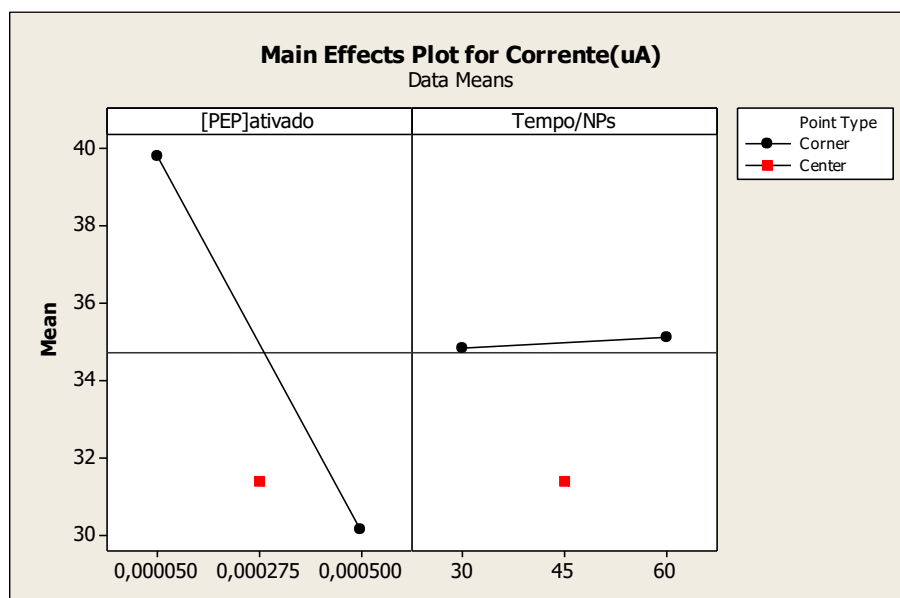
Figura 38: Gráfico de Pareto: influência das variáveis na imobilização do peptídeo sobre as partículas magnéticas. Sendo A, a concentração do peptídeo ativado, B, o tempo de incubação e AB, influência das duas variáveis juntas.



Fonte: autoria própria.

Uma outra forma de analisar as variáveis estudadas e as respostas de corrente obtida é através do Gráfico dos Efeitos Principais (Figura 39), o qual permite analisar os dados a partir de uma reta, ou seja, quanto mais inclinada a reta, maior o coeficiente angular e mais forte será o efeito da alteração naquela variável. De acordo com os resultados, verifica-se que a concentração do peptídeo é a variável com maior influência sobre a resposta, que tende a ser maior quando a concentração do peptídeo empregada é mais baixa, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (nível mínimo). Já o tempo de contato do peptídeo ativado com as partículas não tem interferência significativa sobre o sistema, ou seja, de acordo com o gráfico de tendência, podem ser utilizados 30 ou 60 minutos. Desta maneira, para estudos seguintes, utilizou-se 30 minutos.

Figura 39: Gráfico de tendência: intensidade de corrente para o nível máximo e mínimo de cada variável.



Fonte: autoria própria.

4.9.7 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada foi selecionada como técnica voltamétrica por se tratar de uma técnica rápida e sensível. Portanto, afim de se obter as melhores condições de trabalho, otimizou-se os parâmetros de SWV através de planejamento fatorial, a qual nos permite medir os efeitos (ou influências) que cada parâmetro exerce sobre o outro e sobre o sistema em estudo. A Tabela 8 mostra a matriz de planejamento fatorial e as respostas voltamétrica obtida na varredura com onda quadrada.

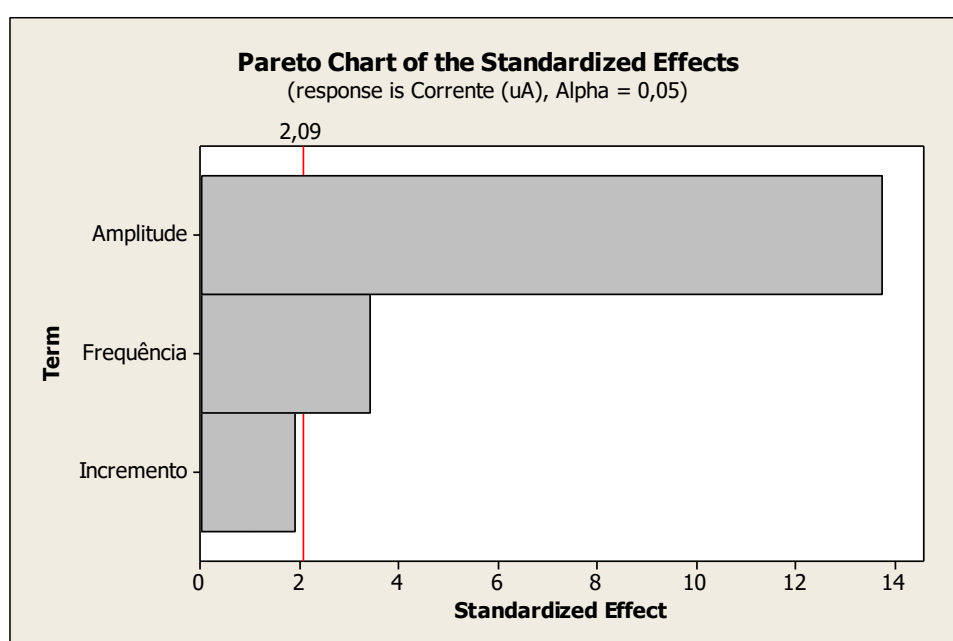
Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial gerada pelo programa Minitab® 15 Statistical Software e suas respectivas respostas instrumentais para a otimização da SWV. Estudo realizado em triplicata (n=3).

Experimento	f (Hz)	a (mV)	ΔE_s (mV)	I (μA)
1	20	10	2	19,1
2	100	10	2	26,6
3	20	90	2	82,2
4	100	90	2	194
5	20	10	10	24,6
6	100	10	10	23,8
7	20	90	10	146
8	100	90	10	184
9	20	10	2	18,1
10	100	10	2	30,7
11	20	90	2	99,5
12	100	90	2	175
13	20	10	10	27,2
14	100	10	10	28,0
15	20	90	10	131
16	100	90	10	165
17	20	10	2	14,7
18	100	10	2	27,6
19	20	90	2	98,4
20	100	90	2	171
21	20	10	10	27,6
22	100	10	10	27,7
23	20	90	10	184
24	100	90	10	196
25*	60	50	6	122

*PC= ponto central

A Figura 40 apresenta o diagrama de Pareto, expressando as variáveis consideradas significativas a 95% de nível de confiança. De acordo com gráfico, pode-se evidenciar uma maior influência da amplitude, seguida pela frequência na resposta do sistema, ou seja, os parâmetros amplitude e frequência são significativos na otimização das medidas. Por outro lado, o incremento de varredura não tem efeito significativo sobre o sistema.

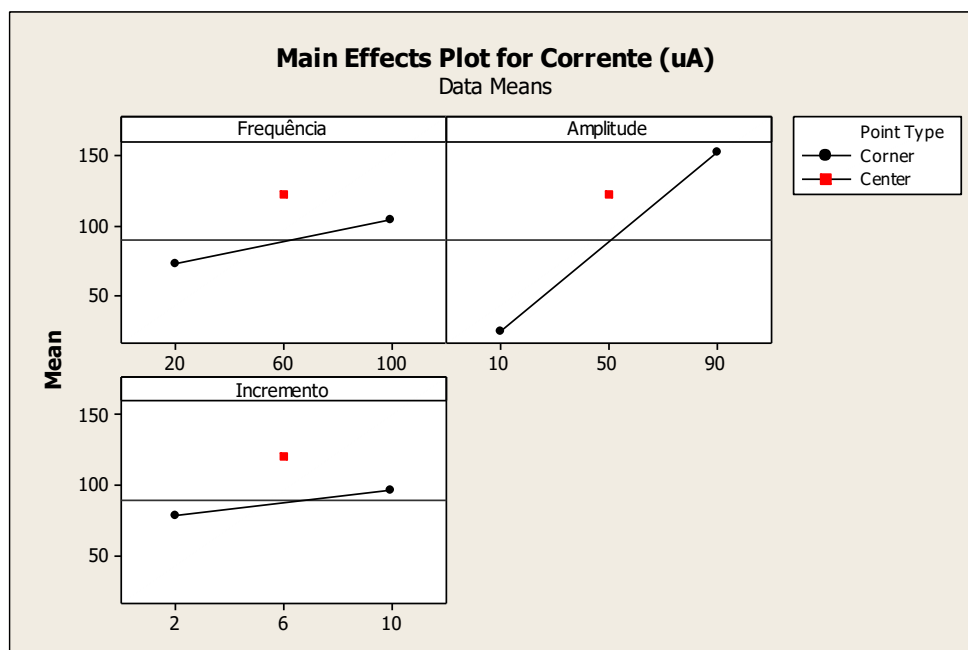
Figura 40: Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial completo para três variáveis: frequência (Hz), amplitude de pulso (mV) e incremento de varredura (mV).



Fonte: autoria própria.

O gráfico de tendência (Figura 41) mostra que os parâmetros frequência e incremento de varredura apresentaram melhores resultados em torno do ponto central, enquanto que a amplitude apresentou melhores resultados no seu nível mais alto. Apesar do incremento de varredura não apresentar efeito significativo sobre o sistema, como é evidenciado no Gráfico de Pareto, o gráfico de tendência sugere que se trabalhe no valor do ponto central. Portanto, de acordo com os dados estatísticos, optou-se em trabalhar com frequência de 100 Hz, amplitude de 90 mV e incremento de varredura de 6 mV.

Figura 41: Gráfico de tendência: intensidade de corrente para o nível máximo e mínimo de cada variável.

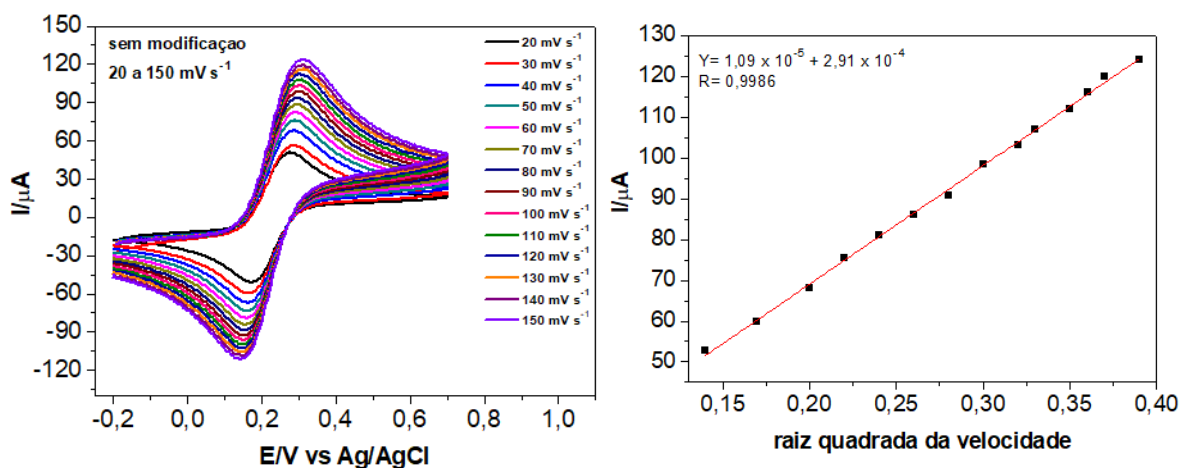


Fonte: autoria própria.

4.10 Determinação da superfície eletroativa do eletrodo de trabalho

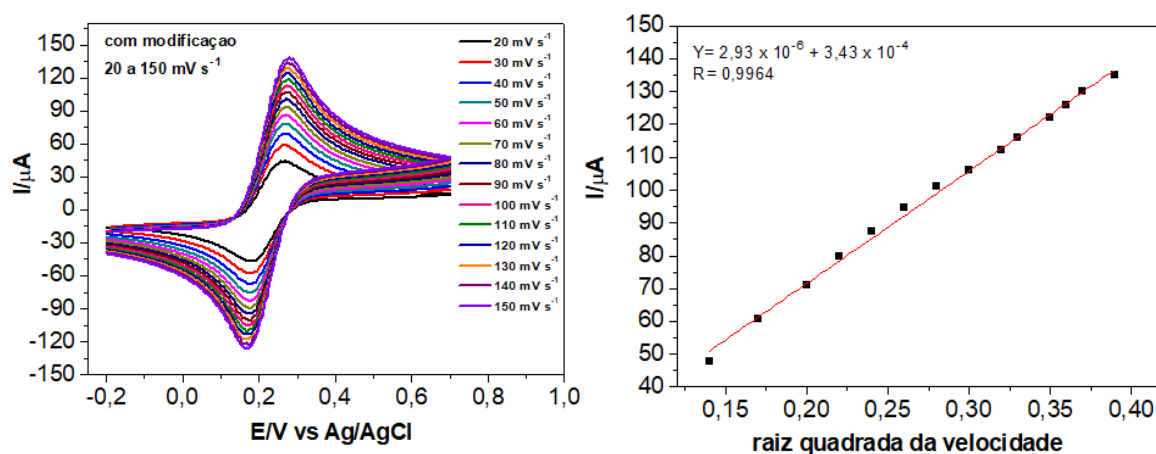
Após a imobilização do peptídeo sobre as NPs, foi investigado a área eletroativa do eletrodo de trabalho antes e após a modificação com 30 μL de NPs/CS-DADD-PEP, em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio utilizando-se voltametria cíclica. As Figuras 42 e 43, mostram os voltamogramas cíclicos do eletrodo antes, após a modificação da superfície e as respectivas curva de regressão linear obtidas a partir da relação da corrente de pico anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

Figura 42: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s^{-1}) para o eletrodo de trabalho sem modificação e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).



Fonte: autoria própria.

Figura 43: Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (20 a 150 mV s^{-1}) para o eletrodo de trabalho modificado com NPs/CS-DADD-PEP e curva de regressão linear construída a partir das correntes de pico anódica (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).



Fonte: autoria própria.

Os valores de corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura foram lineares no intervalo de velocidade de 20 a 150 mV s^{-1} , como pode ser observado na curva de regressão linear (Figura 42 e 43). Com o auxílio da Equação de Randles e Sevcik (Equação 1), calculou-se a área eletroativa do eletrodo, onde o coeficiente angular obtido a partir da curva de regressão linear representa o valor da relação $I_p/v^{1/2}$.

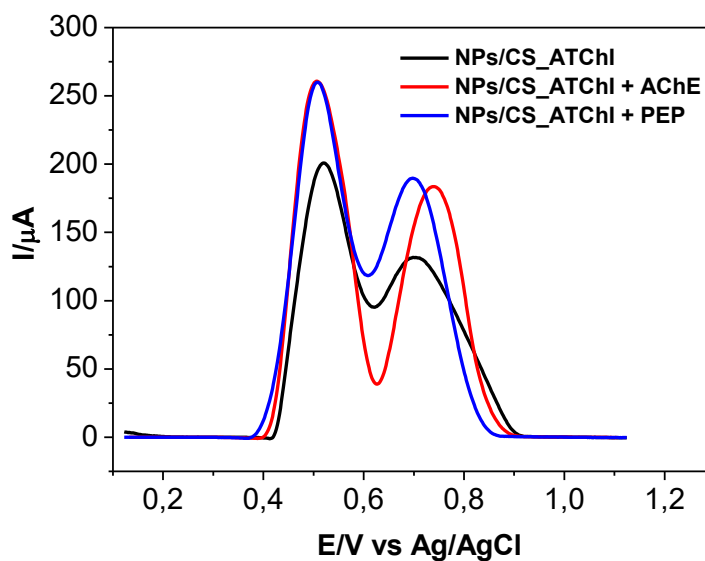
O eletrodo de trabalho possui 3,0 mm de diâmetro, com área geométrica de $7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. A área eletroativa do eletrodo é de $7,8 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ e após a modificação com 30 μL de NPs/CS-DADD-PEP ocorreu um aumento da área ativa para $9,2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Segundo Welch e Compton (122), existe algumas vantagens para o uso de eletrodos modificados com nanopartículas quando comparado a um eletrodo não modificado, dentre os benefícios estão o aumento da velocidade de transferência de carga na interface eletrodo/solução, efeito eletrocatalítico e aumento da área ativa do dispositivo.

4.11 Avaliação da sequência peptídica na catálise de acetiltiocolina

Foi visto anteriormente que existem dois critérios para que moléculas sejam consideradas biomiméticos ou bioinspirados da AChE. Esses critérios sugerem que a molécula catalise a hidrólise do substrato acetiltiocolina e que a molécula possua interação com pesticidas. Mediante esses critérios, a sequência peptídica foi avaliada na catálise da hidrólise do substrato iodeto de acetiltiocolina (ATChI). A Figura 44 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos.

De acordo com Jeyapragasam e Saraswathi (125) a oxidação da tiocolina em eletrodo de carbono vítreo ocorre em +0,72 V, valor este próximo ao obtido neste trabalho. Além disso, observa-se a oxidação do iodeto em +0,55 V potencial próximo ao da oxidação do produto da reação (tiocolina). O iodeto é eletroquimicamente ativo em solução e uma questão importante no uso de substrato contendo iodeto é o excesso de substrato em comparação com a tiocolina que é produzida na hidrólise enzimática: a concentração do substrato está no intervalo de mmol L^{-1} , enquanto que a tiocolina é produzida em concentrações baixas da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ (126). Os resultados apresentados (Figura 44) indicam que de fato a sequência peptídica catalisa a reação de hidrólise de acetiltiocolina, podendo ser utilizada para mimetizar o sítio ativo da enzima AChE.

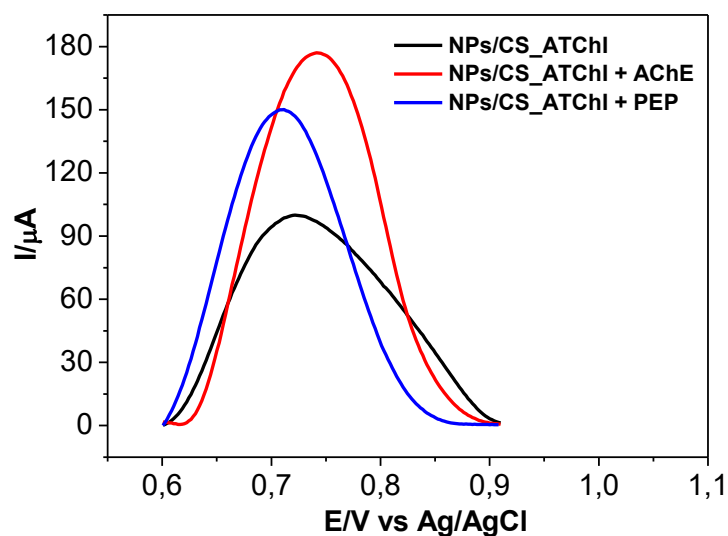
Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 da hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: $f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. ET = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura.



Fonte: autoria própria

A Figura 45 mostra o potencial de oxidação da tiocolina no intervalo de varredura de +0,6 a +0,9 V. Analisando a intensidade de corrente, observa-se que a enzima AChE tem uma maior eficiência catalítica, quando comparado a sequência peptídica, uma vez que a intensidade de corrente de oxidação da tiocolina é mais intensa. Apesar disso, a sequência peptídica pode ser utilizada na catálise da reação de hidrólise de acetiltiocolina.

Figura 45: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação da tiocolina em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Reação de hidrólise do substrato ATChI catalisado pela AChE e SEQPEP1. Parâmetros utilizados: $f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. ET = carbono vítreo modificado conforme inserido na figura

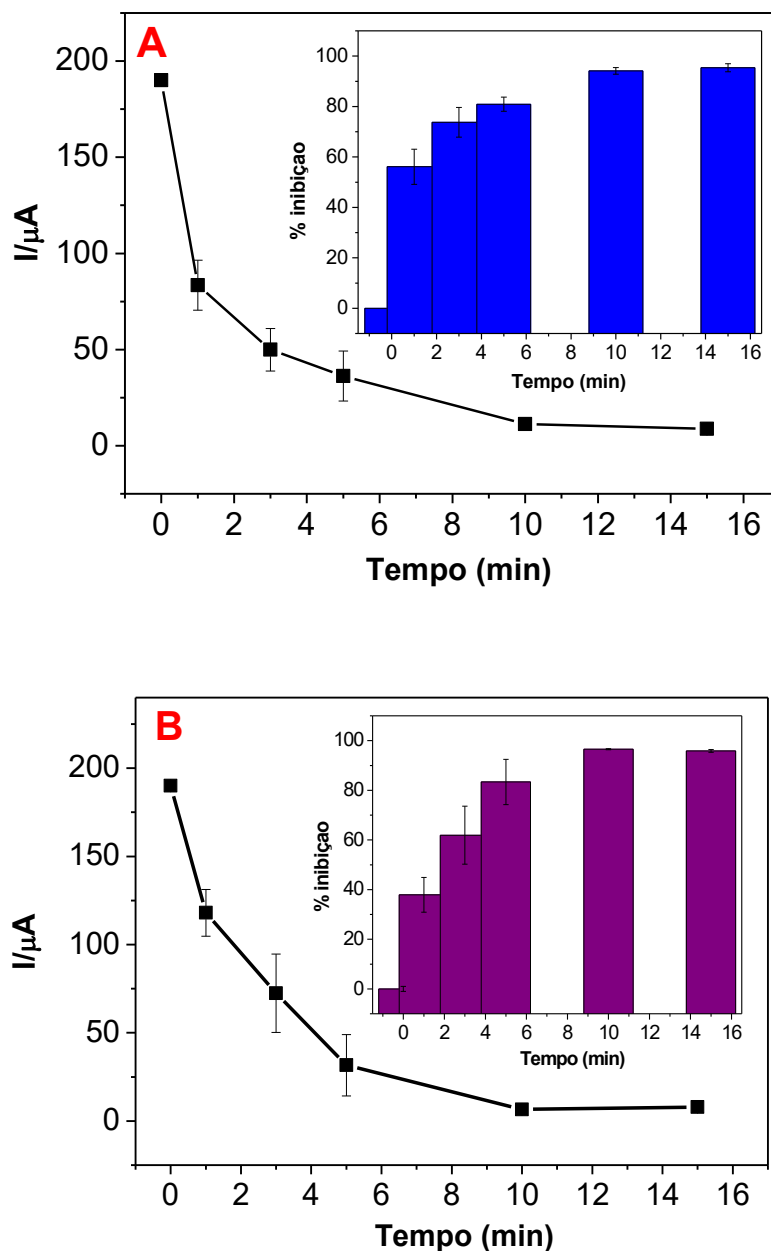


Fonte: autoria própria.

4.12 Estudo do tempo de incubação do pesticida sobre o sensor bioinspirado

Após verificar que o pesticida carbofurano e clorpirifós não interagem com as nanopartículas magnéticas, avaliou-se o tempo de inibição dos pesticidas pelo sensor bioinspirado, aplicando todos os parâmetros já otimizados. O tempo de permanência do sensor bioinspirado em solução do pesticida é um parâmetro importante frente à determinação de pesticidas por inibição. Na Figura 46, observa-se que o percentual de inibição aumenta com o tempo de pré-concentração em solução com o pesticida até 10 minutos (isso para ambos). Em tempos maiores não ocorre uma variação significativa no percentual de inibição, isso pode estar relacionado com a saturação dos sítios ativos do peptídeo na superfície do eletrodo. Pode-se observar que a partir de 5 minutos houve uma pequena diferença em relação ao tempo de 10 minutos, desta forma, optou-se por fixar o tempo de incubação em 5 minutos.

Figura 46: Gráfico da intensidade de corrente em função do tempo de incubação do pesticida, em (A) carbofurano e (B) clorpirifós. Ambos na concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do tempo de pré-concentração.

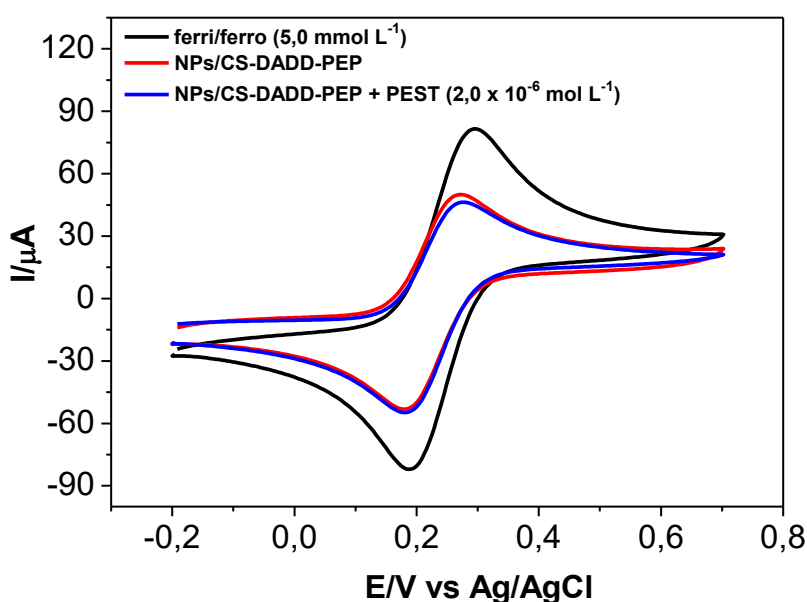


Fonte: autoria própria.

Após otimizar o tempo de incubação do pesticida com sensor bioinspirado, avaliou-se o comportamento eletroquímico do sensor em meio a solução eletrolítica de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio (ferri/ferro), usando voltametria cíclica. O comportamento do eletrodo foi avaliado antes, após a modificação da

superfície com NPs/CS-DADD-PEP e após etapa de interação com o pesticida na concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 47 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos, nos quais observa-se que houve diminuição dos picos anódico/catódico e um pequeno deslocamento nos potenciais de pico (E_p) em relação ao eletrodo de carbono vítreo não modificado. O decréscimo nas correntes anódica/catódica indica que houve uma modificação da superfície do carbono vítreo, e o aumento na diferença do potencial de pico ($\Delta E_p = 31,6 \text{ mV}$) sugere uma cinética mais lenta para o processo redox. A presença do pesticida tem pouco efeito no voltamograma cíclico no intervalo investigado.

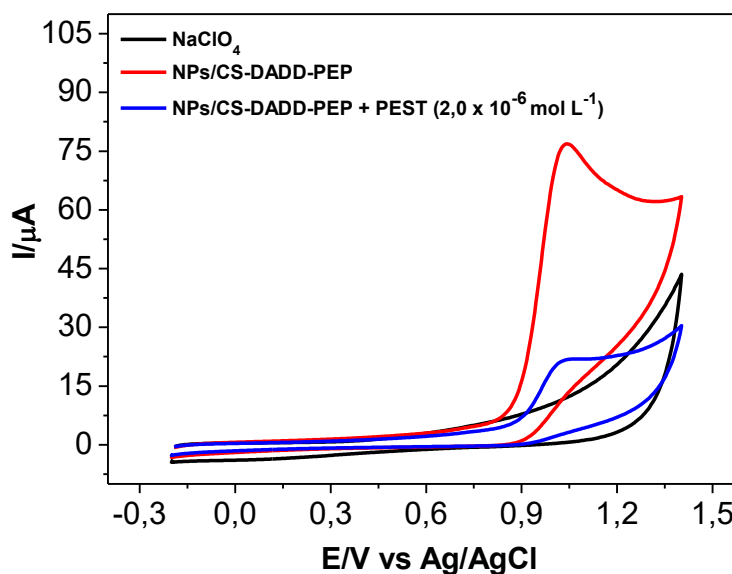
Figura 47: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do peptídeo com o pesticida (—) em meio de ferri/ferro $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ vs $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$ no intervalo de potencial de $-0,2$ a $+1,3 \text{ V}$ com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: autoria própria.

A Figura 48 mostra o perfil voltamétrico do sensor bioinspirado em meio a solução de NaClO_4 , no qual se nota um pico ao redor de $1,0 \text{ V}$, após a modificação da superfície do eletrodo com o NPs/CS-DADD-PEP. Esse pico tem sua intensidade diminuída após contato de NPs/CS-DADD-PEP com o pesticida, o que confirma a modificação da superfície do eletrodo e a interação do peptídeo com o pesticida.

Figura 48: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (—), após a pré-concentração das NPs/CS-DADD-PEP (—) e após a interação do peptídeo com o pesticida (—) em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs $\text{Ag|AgCl|KCl}_{\text{sat}}$ no intervalo de potencial de $-0,2$ a $+1,3 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: autoria própria.

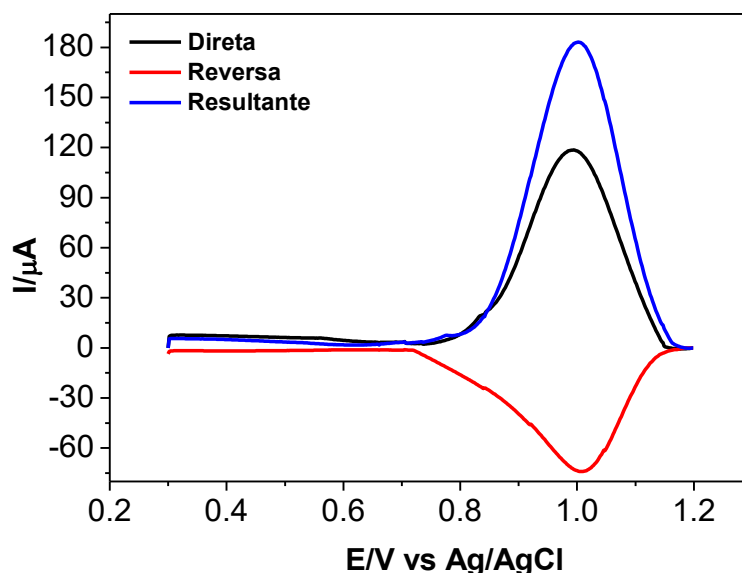
4.13 Componentes de corrente

A SWV é uma técnica voltamétrica de pulso, na qual a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando elevada sensibilidade e diminuição da corrente capacitiva (127,128).

A separação das correntes é uma ferramenta utilizada para diagnosticar o tipo de reação, ou seja, a reversibilidade do sistema. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com NPs/CS-DADD-PEP mostraram pico ao redor de $+1,0 \text{ V}$ utilizando a SWV, potencial este próximo ao obtido na CV. A Figura 49 apresenta as componentes direta e reversa do voltamograma de onda quadrada da sequência peptídica imobilizada sobre NPs/CS-DADD. As correntes direta, reversa e resultante mostraram que o sistema apresenta comportamento típico de processos totalmente reversíveis, ocorrendo assim, uma

maior intensidade da corrente direta comparada a corrente reversa, logo há uma maior contribuição para a corrente resultante.

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

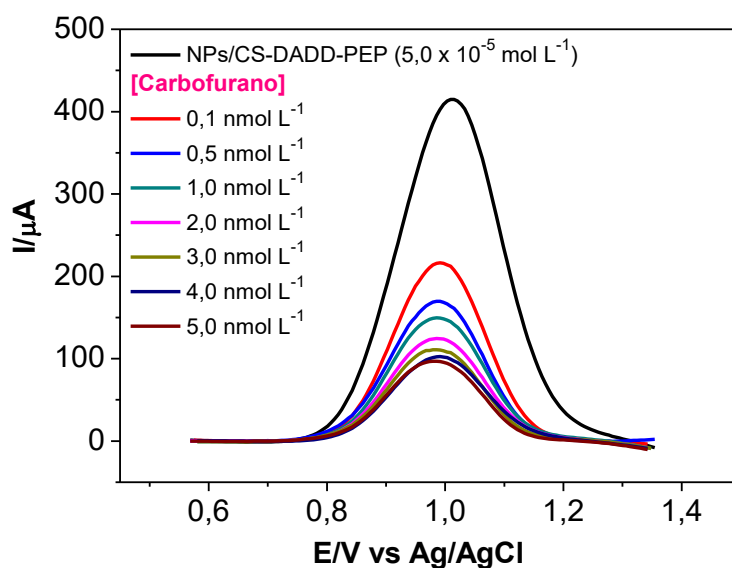


Fonte: autoria própria.

4.14 Curva analítica para o pesticida Carbofurano e Clorpirifós

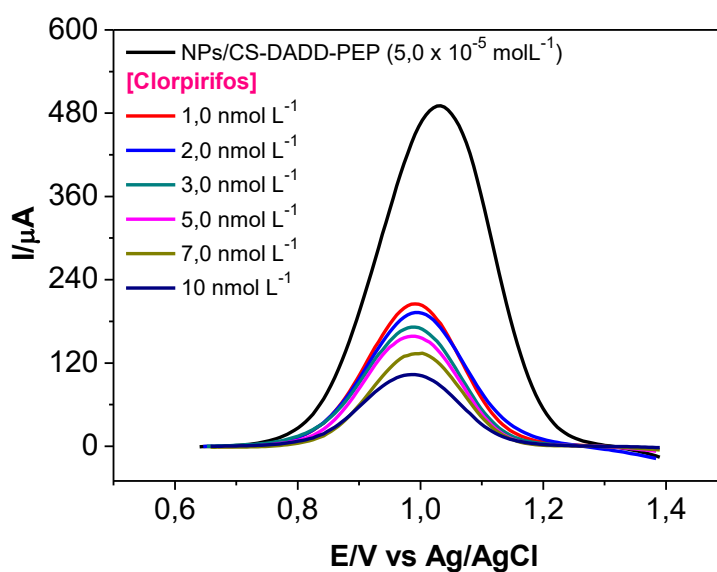
Após otimização de todos os parâmetros experimentais e operacionais, construiu-se a curva analítica para os pesticidas carbofurano (carbamato) e clorpirifós (organofosforado). As Figuras 50 e 51 mostram os voltamogramas obtidos em diferentes concentrações do pesticida carbofurano e clorpirifós, respectivamente, nos quais se observa que, à medida em que a concentração de pesticida aumenta, há uma diminuição (supressão) na corrente de pico em relação à medida na ausência do pesticida (pico base). Este fato ocorre tanto para o pesticida carbofurano como para o clorpirifós.

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



Fonte: autoria própria.

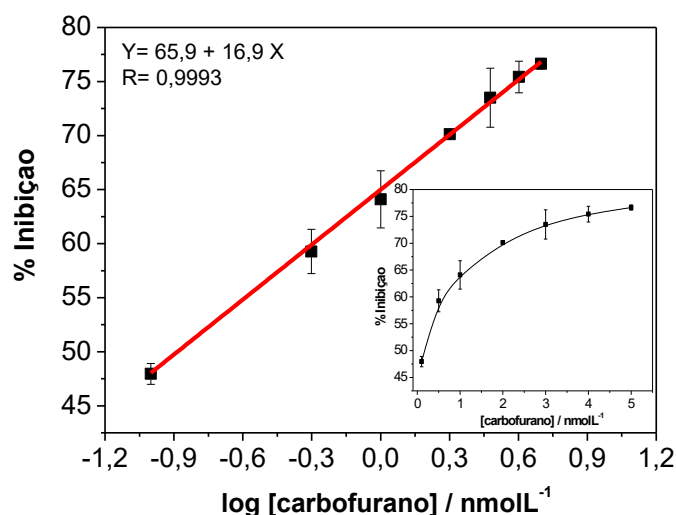
Figura 51: Voltamogramas de onda quadrada em meio a solução de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 na presença de diferentes concentrações do pesticida clorpirifós em solução. Parâmetros utilizados: $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. E_T = carbono vítreo modificado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



Fonte: autoria própria

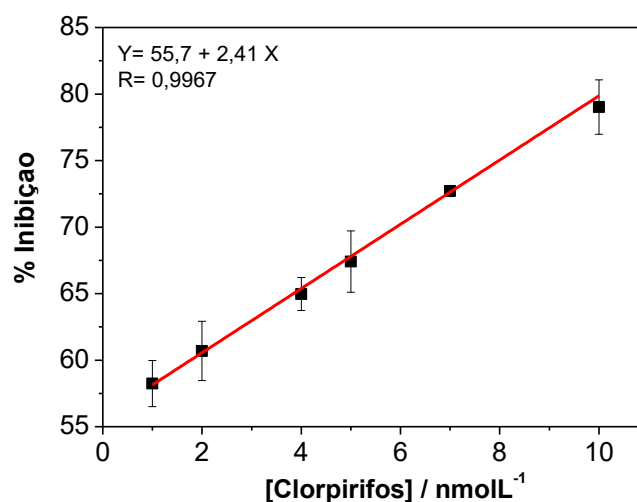
As curvas analíticas do percentual de inibição em função da concentração dos pesticidas em estudo, foram obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada (Figura 50 e 51). As Figuras 52 e 53 mostram as curvas analíticas obtidas para o pesticida carbofurano e clorpirifós, respectivamente. O sensor bioinspirado apresentou resposta linear na faixa de trabalho estudada.

Figura 52: Curva analítica do percentual de inibição em função do log da concentração do pesticida carbofurano. Faixa de trabalho de 0,10 a 5,0 nmol L⁻¹. Inset: Gráfico do percentual de inibição em função da concentração em nmol L⁻¹.



Fonte: autoria própria

Figura 53: Curva analítica do percentual de inibição em função da concentração do pesticida clorpirifós. Faixa de trabalho de 1,0 a 10 nmol L⁻¹.



Fonte: autoria própria

A Tabela 9, traz um resumo da faixa de trabalho, coeficiente de correlação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos a partir da curva analítica. Os LD e LQ do método desenvolvido foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica, em que LD equivale a $3 S_D/b$ e LQ $10 S_D/b$, onde S_D representa o desvio padrão da curva analítica e b o coeficiente angular.

Tabela 9: Dados obtidos a partir da curva analítica do pesticida carbofurano e clorpirifós.

Pesticida	Faixa de trabalho (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S _D	R
Carbofurano	$1,0 \times 10^{-10}$ a $5,0 \times 10^{-9}$	$6,0 \times 10^{-11}$	$1,7 \times 10^{-10}$	0,29	0,9993
Clorpirifós	$1,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-9}$	0,30	0,9967

Os valores dos limites de detecção e quantificação do método desenvolvido (Tabela 9) estão abaixo das concentrações médias definidas como LMR (Limite Máximo de Resíduos) aceitáveis pela ANVISA para amostras de alimentos. De acordo com a Resolução RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012, ANEXO IV, publicada no Diário Oficial da União de 19 de janeiro de 2012 é possível definir o LD a partir do valor de LMR. Cabe ressaltar que os valores de LD estipulados pela ANVISA foram calculados a partir dos valores de LMR publicados no relatório PARA (2013-2015), onde o LD para o carbofurano é de $4,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e para clorpirifós $2,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (129).

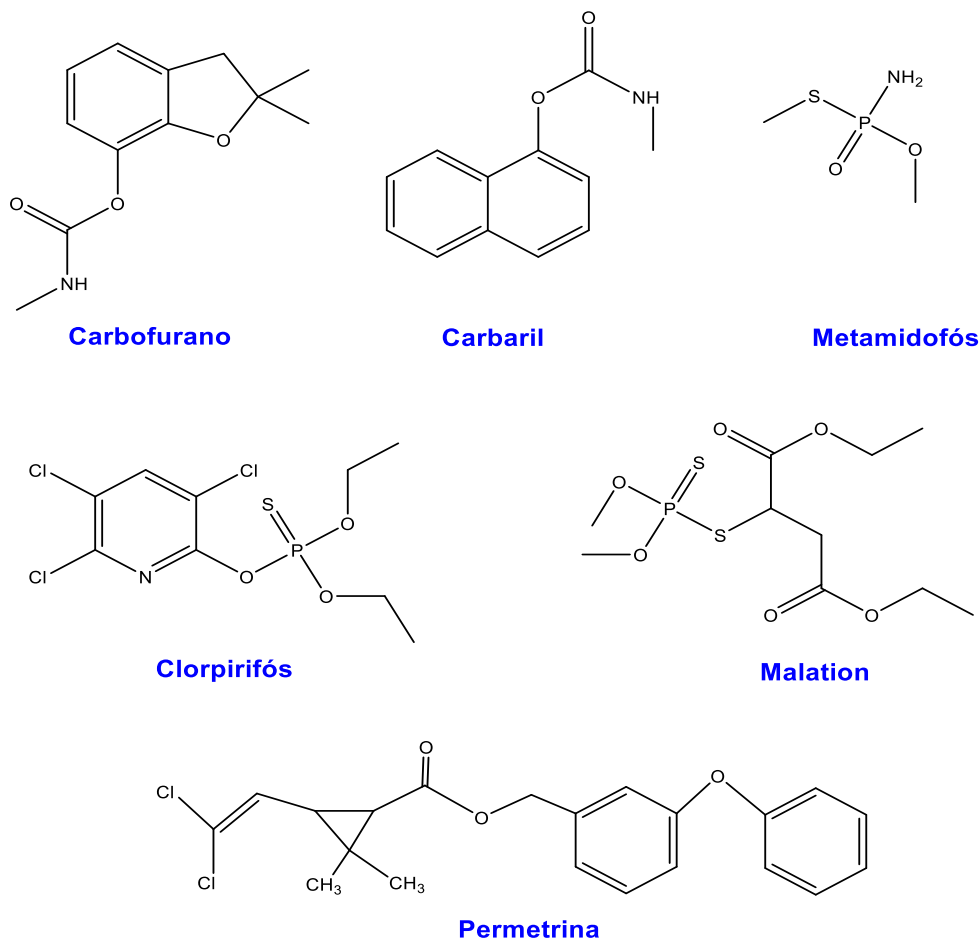
Analisando o LD obtido para o sensor desenvolvido e comparando com dados apresentados nos estudos de Kostelnik et al. (130) para o carbofurano (LD= $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e de Chauhan et al. (131) para o clorpirifós (LD= $1,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹) utilizando, para ambos, nanopartículas de óxido de ferro na imobilização da enzima AChE para detecção destes pesticidas, nota-se que os valores de LD estão acima dos encontrados neste trabalho (Tabela 9).

4.15 Estudo de seletividade do sensor

Além do carbofurano e clorpirifós, outros pesticidas, tais como carbaril, malation, metamidofós e permetrina, cujas fórmulas estruturais estão apresentadas na Figura 54, foram investigados com o objetivo avaliar a interação com o sensor

bioinspirado. A etapa de pré-concentração consistiu na adição de 20 μL de uma solução $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ dos pesticidas por um tempo de incubação de 5 minutos sobre a superfície do eletrodo contendo NPs/CS-DADD-PEP.

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



Fonte: autoria própria.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que além do carbofurano e clorpirifós, os pesticidas metamidofós, malation, carbaril e permetrina também apresentam interação com o peptídeo, ou seja, o sensor bioinspirado pode ser utilizado para determinação de outros pesticidas da classe dos organofosforados, carbamatos e piretróide.

Tabela 10: Avaliação da seletividade do sensor bioinspirado desenvolvido.

Pesticida	Porcentagem de inibição (%)
Carbofurano	79,4 ± 0,2
Carbaril	79,2 ± 2,7
Clorpirifós	87,1 ± 0,9
Metamidofós	83,2 ± 4,7
Malation	81,4 ± 1,8
Permetrina	80,7 ± 3,2

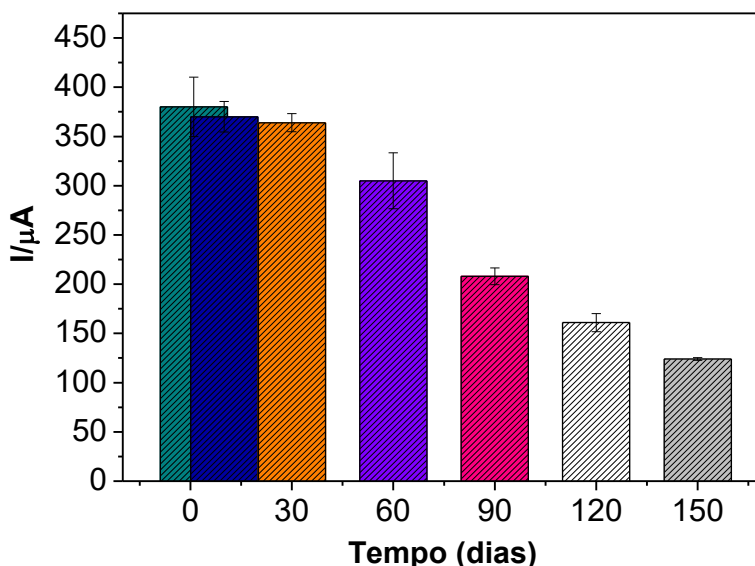
4.16 Estudo da estabilidade do peptídeo imobilizado em NPs/CS-DADD.

A estabilidade do sensor ou biossensor é um parâmetro importante a ser determinado, uma vez que um dos maiores entraves ao emprego dos biossensores enzimáticos é baixa estabilidade enzimática para uso contínuo, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional. A estabilidade do sensor refere-se à capacidade da molécula biológica ou sintética manter sua atividade durante o período entre sua produção e seu uso. Desta forma a estabilidade do sensor bioinspirado foi avaliada após a etapa de imobilização do peptídeo sobre as NPs/CS-DADD conforme descrito no 3.13.

A Figura 55 apresenta o histograma da intensidade de corrente de oxidação do peptídeo imobilizado sobre NPs/CS-DADD estocado durante alguns dias na geladeira, observa-se que o melhor tempo de estocagem do material imobilizado é de até 60 dias, mantendo a intensidade de corrente cerca de 82%. Esta estabilidade pode estar atribuída ao fato da forte interação entre o peptídeo que está imobilizado em uma matriz modificada com quitosana e DADD. Após 90 dias, observou-se um decréscimo mais pronunciado da intensidade de corrente (56%), ou seja, o sensor tem sua eficiência reduzida a qual pode estar relacionado à degradação do peptídeo imobilizado. Já os estudos desenvolvidos por Chauhan e Pundir (132) mostraram que o biossensor de AChE imobilizado sobre nanopartículas de óxido de ferro manteve estabilidade de 40% num período de armazenamento de até 90 dias a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Portanto, estes resultados obtidos para o sensor bioinspirado, apresentam maior

estabilidade comparativamente ao estudo citado, possibilitando a estocagem deste dispositivo para futuras determinações de pesticidas.

Figura 55: Histograma da intensidade de corrente do peptídeo imobilizado sobre NPs/CS-DADD estocado durante alguns dias na geladeira a 4°C.



Fonte: autoria própria.

3.12 Aplicação em amostras de alimentos

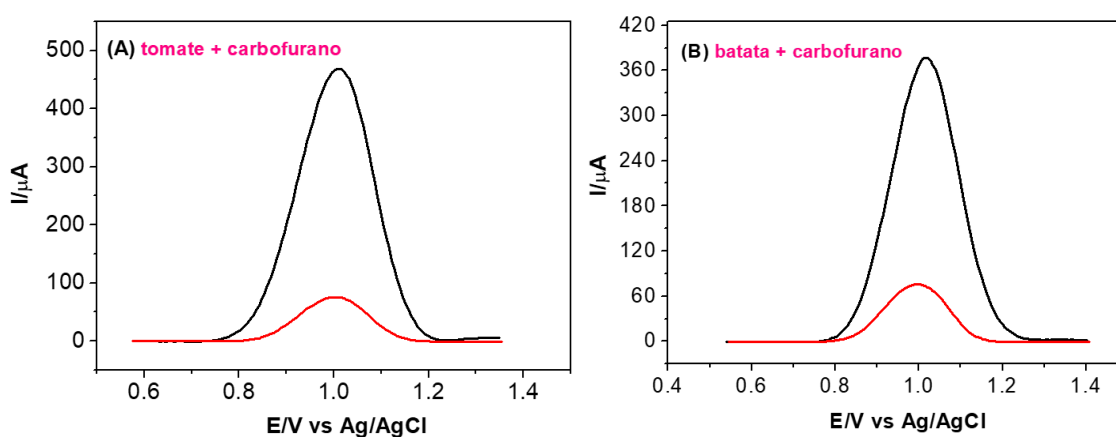
Em análises de qualidade de alimentos, os biossensores são aplicados, sobretudo, na detecção de contaminantes químicos e biológicos. De acordo com a ANVISA os pesticidas carbofurano e clorpirifós podem ser aplicados na agricultura no cultivo de diversas hortaliças, frutas e grãos. Entretanto, em decorrência de reavaliação toxicológica, conforme dispõe a Resolução RDC nº185, de 18 de outubro de 2017, publicada no Diário Oficial da União de 19 de outubro de 2017, o pesticida carbofurano está proibido, desde a data de publicação no DOU, em algodão, amendoim, arroz, batata, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo e será proibido na banana, a partir de 19 de abril de 2018. O LMR de carbofurano na banana passou de 0,1 para 0,02 mg/kg.

Embora a aplicação de clorpirifós não seja autorizada em culturas de tomate, de acordo com o relatório PARA (2013-2015), um estudo anterior revelou que 22,3% das amostras analisadas continham o referido pesticida (129)

Amostras de batata e tomate orgânico foram adquiridas no comercio local para os ensaios de recuperação, de acordo com metodologia descrita no item 3.13.

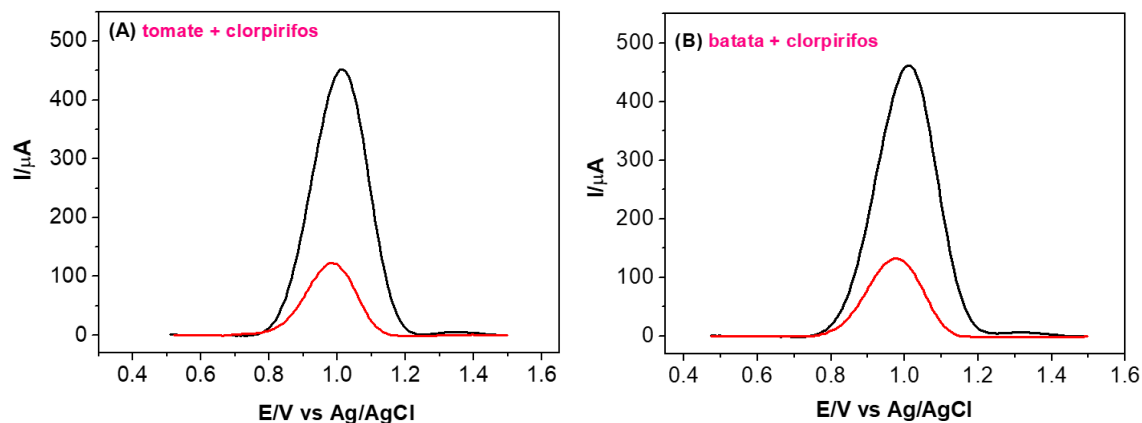
As amostras de tomate e batata foram fortificadas e analisadas utilizando o sensor bioinspirado. As Figura 56 e 57 mostram os voltamogramas de onda quadrada obtidos em meio de NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após a fortificação das amostras com o pesticida carbofurano e clorpirifós, respectivamente. O percentual de inibição foi calculado através da comparação da intensidade de corrente obtida para o sensor, na presença e ausência do pesticida. O valor da concentração do analito foi obtido pela interpolação na curva analítica.

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



Fonte: autoria própria.

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



Fonte: autoria própria.

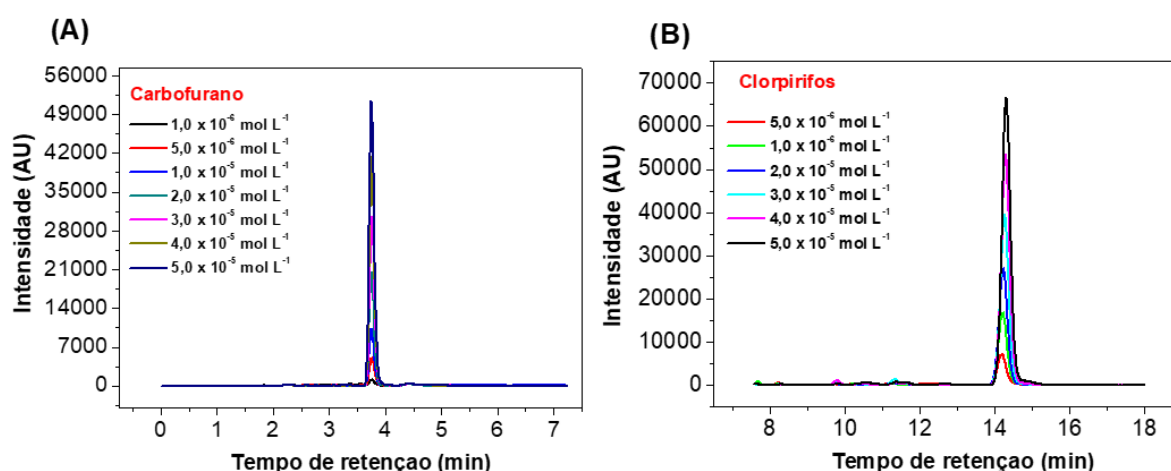
A Tabela 11 apresenta os percentuais de recuperação obtido a partir da aplicação do sensor em amostras de alimentos na determinação eletroquímica do pesticida carbofurano e clorpirifós. Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação utilizando amostras de tomate e batata apresentaram taxa de recuperação na faixa de 100 a 118%, o que indica que não houve efeito de matriz ou substâncias químicas que influenciasse na resposta eletroquímica do sensor. Os resultados demonstram que a metodologia desenvolvida é sensível e está na faixa de 80 a 120% exigida pela ANVISA para determinação quantitativa do analito em estudo (133).

Tabela 11: Percentual de recuperação do pesticida carbofurano e clorpirifós em amostra de tomate e batata. Medida realizada em triplicata.

Amostra / Pesticida	[adicionada] (mol L^{-1})	[encontrada] (mol L^{-1})	Recuperação (%)
tomate/carbofurano	$1,0 \times 10^{-9}$	$1,1 \times 10^{-9}$	110 ($\pm 2,0$)
batata/carbofurano	$1,0 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-9}$	100 ($\pm 0,30$)
tomate/clorpirifós	$6,0 \times 10^{-9}$	$7,1 \times 10^{-9}$	118 ($\pm 0,31$)
batata/clorpirifós	$6,0 \times 10^{-9}$	$6,5 \times 10^{-9}$	108 ($\pm 4,0$)

Afim de avaliar o desempenho do sensor, os pesticidas carbofurano e clorpirifós foram determinados empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Visível (HPLC/UV). A Figura 58 apresenta os cromatogramas obtidos a partir das soluções padrão dos pesticidas carbofurano e clorpirifós, respectivamente. O tempo de retenção do pesticida carbofurano foi de 3,8 minutos, enquanto que para o pesticida clorpirifós foi de 14,2 minutos, utilizando fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e água deionizada na proporção 70:30 (v/v).

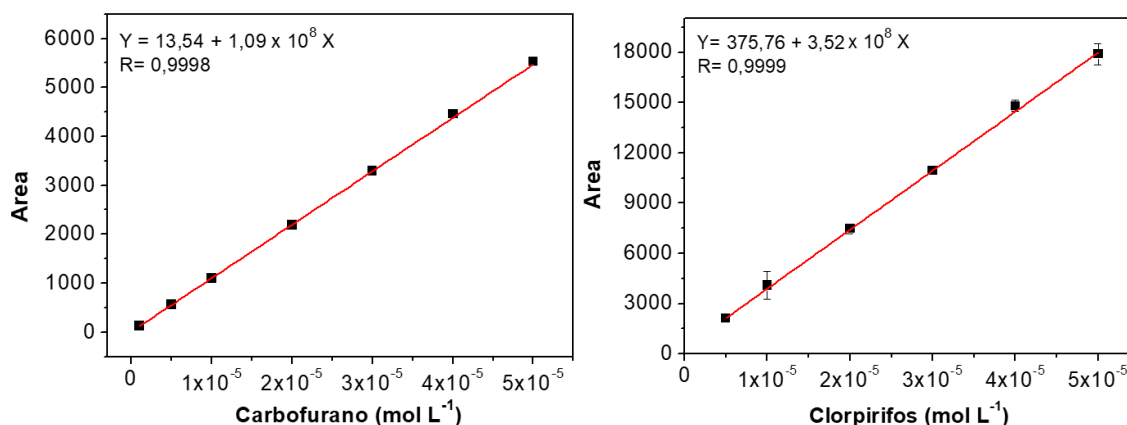
Figura 58: Cromatogramas do pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B). Condições de análises: acetonitrila/água deionizada na razão 70:30 (v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra injetada de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento de onda de 230 nm .



Fonte: autoria própria.

A partir dos dados obtidos nos cromatogramas (Figura 58) foram construídas as curvas analíticas (Figura 59), nas quais se observa resposta linear num intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para carbofurano e de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para clorpirifós, com limite de detecção de $7,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para carbofurano e $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para clorpirifós.

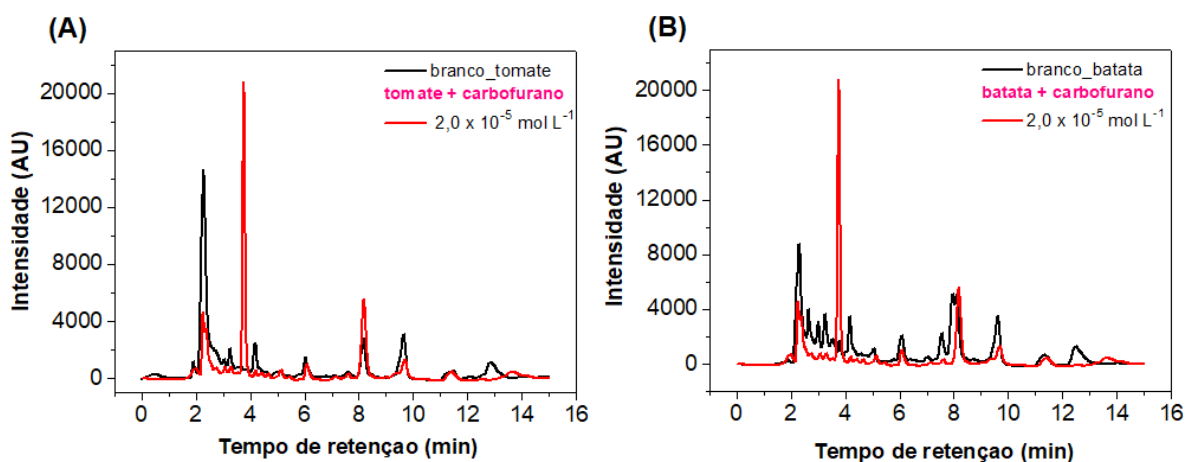
Figura 59: Curva analítica obtida para o pesticida carbofurano (A) e clorpirifós (B) empregando HPLC/UV, fase móvel acetonitrila/água 70:30 (v/v) e comprimento de onda de 230 nm.



Fonte: autoria própria.

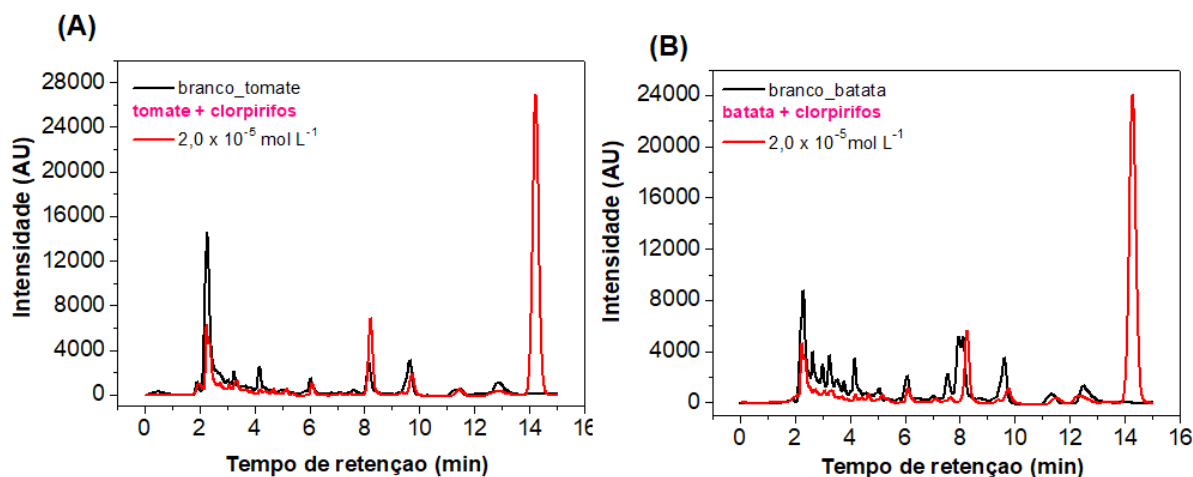
Após otimização das condições experimentais e a determinação dos parâmetros empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, as amostras de batata e tomate foram preparadas utilizando o método de extração QuEChERS. Em seguida, os extratos dos vegetais obtidos após extração foram fortificados com concentração conhecida dos pesticidas e analisados por HPLC/UV. As Figuras 60 e 61 apresentam os cromatogramas obtidos para as amostras fortificadas com o pesticida carbofurano e clorpirifós, respectivamente.

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



Fonte: autoria própria.

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



Fonte: autoria própria.

A partir dos dados obtidos nos cromatogramas apresentados (Figura 60 e 61) o valor da concentração do analito foi obtido pela interpolação na curva analítica (Figura 59).

A Tabela 12 apresenta os valores de recuperação obtidos utilizando HPLC/UV e também faz um comparativo da técnica com dados obtidos na aplicação do sensor bioinspirado em amostras de alimentos na determinação eletroquímica do pesticida carbofurano e clorpirifós.

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

Amostra real- HPLC/UV			
Amostra / Pesticida	[adicionada] (mol L ⁻¹)	[encontrada] (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
tomate/carbofurano	2,0 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻⁵	105 (±1,8)
batata/carbofurano	2,0 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻⁵	105 (±1,6)
tomate/clorpirifós	2,0 x 10 ⁻⁵	2,0 x 10 ⁻⁵	100 (±3,0)
batata/clorpirifós	2,0 x 10 ⁻⁵	1,9 x 10 ⁻⁵	95 (±0,2)
Amostra real - SWV			
Amostra / Pesticida	[adicionada] (mol L ⁻¹)	[encontrada] (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
tomate/carbofurano	1,0 x 10 ⁻⁹	1,1 x 10 ⁻⁹	110 (±1,9)
batata/carbofurano	1,0 x 10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻⁹	100 (±0,3)
tomate/clorpirifós	6,0 x 10 ⁻⁹	7,1 x 10 ⁻⁹	118 (±0,3)
batata/clorpirifós	6,0 x 10 ⁻⁹	6,5 x 10 ⁻⁹	108 (±3,9)

Quando comparado os percentuais de recuperação obtidos a partir do sensor bioinspirado com o HPLC/UV, observa-se resultados similares, comprovando que o sensor proposto pode ser utilizado na determinação de carbofurano e clorpirifós nesse tipo de matriz.

Mediante os índices de recuperação empregando a metodologia proposta, pode-se inferir que o sensor bioinspirado se mostrou como método alternativo para determinação de pesticidas em amostras de alimentos, apresentando vantagens aliadas a rapidez nas análises, baixo custo, economia de reagentes e equipamentos, além de tempo menor de análise quando comparado aos métodos cromatográficos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

A sequência peptídica foi imobilizada sobre nanopartículas magnéticas, que foram sintetizadas e funcionalizadas com quitosana. A presença de um anel aromático na estrutura da histidina dificultou a imobilização pelo grupamento amino (sequência peptídica). A estratégia de reagir o DADD com $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$, proporcionou de fato a imobilização do peptídeo que foi comprovado por CV e SWV, onde observou-se pico de oxidação da histidina em torno de +1,0 V.

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

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

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

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

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

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

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

132 CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe_3O_4 nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides. **Electrochimica Acta**, v. 67, p. 79–86, 2012.

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