

MARICELY JANETTE URIA TORO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES BASEADO EM  
EXTRATO DE AÇAÍ E SENSOR BIOMIMÉTICO PARA  
DETECÇÃO DE HEXAZINONA

Teses apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos parcial para obtenção do título  
Doutor em química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara-SP  
2014

# MARICELY JANETTE URIA TORO

Teses apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos parcial para obtenção do título  
Doutor em química.

Araraquara 25 de abril de 2014

## BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor  
Instituto de Química- UNESP- Araraquara

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Amalia Fireman Dutra  
Universidade Federal de Pernambuco –Centro de  
Tecnologia e Geociência

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
Universidade Estadual de Londrina – Departamento de  
Química

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira  
Instituto de Química- Unesp- Araraquara

Prof. Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira  
Instituto de Química- Unesp-Araraquara

## DADOS CURRICULARES

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Maricely Janette Uria Toro

**Nascimento:** 12/08/1963

**Nacionalidade:** Peruana

**Naturalidade:** Lima/Perú

**Estado Civil:** Casada

### 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### 2.1 **Graduação:**

Bacharel em Química – *Universidad Nacional Mayor De San Marcos*, Lima – Peru, 1988.

#### 2.2 **Pós-graduação:**

Mestrado em Química de Produtos Naturais – Universidade Federal Do Pará  
Período: 1996-1998.

Especialização em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Pará.  
Período: 2000-2001.

### 3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

TORO. M.U.; SOTOMAYOR, M. D.P.T. Desenvolvimento de biossensor eletroquímico à base de extrato do licor de acaí (*euterpe oleraceae* mart.) para detecção de hidroquinona. **XVIII Simpósio Brasileiro de eletroquímica e analítica (SIBEE)**, 2011, Bento Gonçalves. R.S.

TORO, M. U.; WONG. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. síntese de polímero de impressão molecular para a triazina hexazinona por técnica de polimerização em bulk. **17º Encontro Nacional de Química. Analítica (ENQA)**, 2013, Belo horizonte, M.G.

#### **4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

5ª Escola de Eletroquímica (Instituto de Química da Universidade de São Paulo USP), Período: 5 a 10 de Dezembro de 2010

#### **5. OUTROS**

Estagio na Universidade de MASARIK no Departamento de Bioquímica na Republica Tcheca, no projeto" Biomimetic sensors as new generation of biotechnological devices for food safety and quality monitoring BIOMIMIC",realized within the PEOPLE - MARIE CURIE ACTIONS International, Período: 28 de novembro de 2011 a 13 de fevereiro de 2012.

#### **6. TRABALHOS PUBLICADOS**

TORO, M. U.; Müller. A. H.; ARRUDA. M. S.P.; ARRUDA, A.C. Alkaloids and coumarins from *ticorea longiflora*. **Phytochemistry**, vol. 45, n. 4, p. 851-853, 1997.

TORO, M.U.; MARESTONI. L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. A new biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers for highly sensitive and selective determination of herbicide hexazinone. **Sensors & Actuators: B. Chemical** (Trabalho submetido em 2014).

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meu esposo Oscar e a meus filhos Maricely, Oscar e Adriana, pelo amor e apoio em todos os momentos, vocês são a luz de meu caminho.*

# AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a força e a sabedoria necessária todos os dias;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, por sua orientação, ensinamentos e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Hideko Yamanaka, Nelson R. Stradiotto, Maria Valnice, Antonio Pupim, pelos ensinamentos, e convívio.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira, por seus ensinamentos e valiosa colaboração nos análises da enzima.

A Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite, pela grande ajuda paciência nos análise da enzima.

Aos integrantes e integrantes do grupo de Eletroanalítica do IQ, pela convivência;

Ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelas oportunidades e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

As funcionarias da biblioteca e da pós-graduação pela sua valiosa colaboração.

Aos amigos do grupo de Trabalho: Rosario, Bryan, Diego, Mayara, Marcos, Ademar, Elsa, Andre, Eduardo, Matheus, Lucas, Tati e Sabir, pela convivência durante estes quatro anos.

As amigas que tive o grande prazer de conhecer em Araraquara, Iris, Eliane, Teresa, Margarita, Rosseane e Fátima, que me deram momentos espirituais e alegres.

A Vani e sua família pela sua amizade, obrigado pela compreensão nos momentos difíceis e pela alegria que vocês deram para mim, ficaram em meu coração para sempre.

A você Anayza, pela sua amizade, carinho e sua incondicional ajuda.

A minha família, meus pais e irmãs que desde longe com sua sabedoria me deram fortaleza e muito amor.

A meus queridos filhos, Maricely, Oscar e Adriana, sem vocês nada sou, vocês são meu caminho, meu existir, obrigada pela compreensão e seu infinito amor.

A meu esposo, Oscar, por seu amor, sua preocupação, compreensão, por sua incondicional ajuda você e minha fortaleza, peço a Deus que sempre este meu lado.

A universidade Federal do Pará UFPA, Universidade do Estado do Pará UEPA. pela licença concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

# RESUMO

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de biossensor baseado em extrato de açaí e sensor biomimético baseado em polímeros de impressão molecular, para a determinação eletroquímica da hexazinona–HXZ (3-ciclohexila-6-(dimetilamino)-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona) empregando eletrodos de pasta de carbono e de ouro. O sensor biomimético à base de pasta de carbono foi construído usando polímeros biomiméticos, MIPs (*Molecularly Imprinted Polymer*). As sínteses dos MIPs e dos respectivos polímeros de controle NIPs, foram realizadas pelos métodos de *bulk* e de precipitação. O comportamento eletroquímico do sensor biomimético foi estudado por voltametria cíclica e a quantificação da hexazinona foi realizada utilizando voltametria adsortiva de pulso diferencial com redissolução catódica (DPAdCSV). Sob estas condições, obteve-se uma faixa de resposta para HXZ, entre  $2,0 \times 10^{-11}$  e  $1,1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, e um limite de detecção de  $5,8 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>, o sensor biomimético foi aplicado para a determinação de hexazinona em água utilizada em uma plantação de cana de açúcar, obtendo-se uma recuperação de 98%. No biossensor, a base do extrato de açaí usou-se um eletrodo de ouro cuja superfície foi modificada com monocamadas auto-arranjadas (SAM) de cistamina sobre a qual foi imobilizada a enzima peroxidase extraída da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). A voltametria de onda quadrada foi a técnica utilizada na otimização e quantificação do herbicida, obtendo-se uma resposta para HXZ de  $2,0 \times 10^{-5}$  até  $1,1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de  $6,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos mostram que os sensores propostos são promissores para a quantificação da hexazinona.

**Palavras chaves:** Hexazinona, Polímeros de Impressão Molecular (MIP), Sensores biomiméticos, Biossensores, Açaí.



# ABSTRACT

The present work describe the development of electrochemical biosensors and biomimetic sensor for the determination of hexazinone-HXZ (3-ciclohexyl-6-(dimethylamino)-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione) employing carbon paste and gold electrodes. The biomimetic sensor based on carbon paste was prepared using molecularly imprinted polymers (MIPs). The syntheses of MIPs and the respective control polymers, NIPs, were performed by bulk and precipitation methods. The electrochemical behavior of biomimetic sensor was studied by cyclic voltammetry and the quantification of hexazinone was performed using differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry (DPAdCSV). Under these conditions response range was obtained for HXZ between  $2.0 \times 10^{-11}$  e  $1.1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> and detection limit of  $5.8 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>. the biomimetic sensor was applied to real samples of a sugar plantation, the recovery was 98% The In the second sensor gold electrode was used whose surface was modified with self-assembled monolayers (SAM) of cystamine on which was immobilized peroxidase enzyme extracted from the pulp of Açai (*Euterpe oleracea*). The square wave voltammetry technique was used in the optimization and quantification of the herbicide having response for HXZ  $2.0 \times 10^{-5}$  up to  $1.1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> and detection limit of  $6.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The results obtained show that the proposed sensors are promising for the quantification of this pesticide.

**Keywords:** Hexazinone, Molecularly imprinted polymers (MIP), biomimetic sensors, Biosensors, Açai.

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fórmula estrutural do herbicida hexazinona.	20
<b>Figura 2</b>	Curva de Energia de Ativação vs tempo de reação na presença/ausência de catalisador. <sup>16</sup>	23
<b>Figura 3</b>	Estrutura química do grupo heme das peroxidases. <sup>19</sup>	25
<b>Figura 4</b>	Fruto do açaí: açaí. Fonte: Kjnutricional Wordpress. <sup>27</sup>	27
<b>Figura 5</b>	Diagrama esquemático dos métodos de imobilização de enzimas mais empregados na construção de biossensores. <sup>30</sup>	29
<b>Figura 6</b>	Princípios da Impressão Molecular. (A) impressão não covalente. (B) impressão covalente/semi-covalente. Fonte: Hayes e Davidson, 2002. <sup>37</sup>	31
<b>Figura 7</b>	Exemplos de estrutura química de reagentes de ligação cruzada. (a) etileno glicol dimetacrilato (EDGMA); (b) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (c) <i>p</i> -divinilbenzeno (DVB); (d) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP); (e) <i>N,O</i> - <i>bis</i> -acrilóil-L-fenilalaninol; (f) 2,6- <i>bis</i> -acrilóilamidopiridina; (g) 1,4-fenilenodiacrilamina; (h) 1,4-diacrilol; (i) <i>N,N'</i> -metileno <i>bis</i> -acrilamida; (j) anidroeritrotol dimetacrilato; (l) <i>iso</i> -propileno- <i>bis</i> -(1,4-fenileno) dimetacrilato; (m) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM).	33
<b>Figura 8</b>	Estruturas moleculares dos iniciadores radiculares empregados na síntese de MIP, (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo- <i>bis</i> -dimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).	34
<b>Figura 9</b>	Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida (SPE). <sup>61</sup>	37
<b>Figura 10</b>	Mecanismo de redução da Hexazinona.	39
<b>Figura 11</b>	Representação da voltametria de pulso diferencial. <sup>72</sup>	40
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática do processo de formação do MIP. <sup>21</sup>	57
<b>Figura 13</b>	Curva da cromatografia em Sephadex G-100 do extrato de açaí em tampão fosfato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> a pH 7,0, indicando as frações contendo a POD e as outras enzimas e componentes do extrato para 2,0 de eluato por fração, em um fluxo constante. Os eluatos do açaí foram acompanhados com leituras de absorbância em 280 nm.	67
<b>Figura 14</b>	Gráfico de Lineweaver–Burk ou duplo recíproco para o extrato de licor de açaí em função do substrato guaiacol. <sup>63,66</sup>	69

<b>Figura 15</b>	Curva analítica experimental para determinação do coeficiente de absortividade molar da soro albumina bovina (BSA).	69
<b>Figura 16</b>	Cromatograma experimental para determinação das proteínas.	70
<b>Figura 17</b>	Perfil de eluição das frações enzimáticas e atividade específica de peroxidase extraída de açaí por cromatografia de exclusão molecular em coluna gel Sephadex G-100.	71
<b>Figura 18</b>	Otimização da frequência da SWV para o biossensor de hidroquinona.	73
<b>Figura 19</b>	Otimização da amplitude de pulso da SWV para o biossensor de hidroquinona.	74
<b>Figura 20</b>	Otimização do incremento de pulso na SWV para o biossensor de hidroquinona.	74
<b>Figura 21</b>	Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor à base de açaí e adições crescentes de hidroquinona, nas condições de pH e eletroquímicas otimizadas.	75
<b>Figura 22</b>	Curva analítica correspondente às adições de HQ até a concentração da saturação.	76
<b>Figura 23</b>	Gráfico de Lineweaver–Burk ou duplo recíproco para o biossensor à base de licor de açaí para sua resposta mediada pela HQ.	77
<b>Figura 24</b>	Otimização do incremento de potencial na SWV para a resposta do biossensor de hexazinona.	79
<b>Figura 25</b>	Otimização da amplitude de pulso na SWV para a resposta do biossensor para hexazinona.	80
<b>Figura 26</b>	Otimização da frequência na SWV para a resposta do biossensor para hexazinona.	80
<b>Figura 27</b>	Voltamogramas de onda quadrada para o biossensor à base de SAM e POD extraída do açaí na presença do herbicida hexazinona. Condições de medida: 10 Hz de frequência, 100 mV de amplitude e 10 mV de incremento. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 6,0) contendo 60 µmol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e adiciones de HXZ entre 30 e 160 µmol L <sup>-1</sup> .	82
<b>Figura 28</b>	Curva de calibração para a quantificação da hexazinona usando o eletrodo de ouro modificado com monocamada de cistamina e extrato de açaí.	83
<b>Figura 29</b>	Média do resultado das simulações realizadas para avaliar a energia de interação da hexazinona com os 20 monômeros propostos da Tabela 3.	85

<b>Figura 30</b>	Estrutura química dos monômeros usados neste trabalho.	86
<b>Figura 31</b>	Microscopias eletrônicas de varredura MEV dos diversos MIP e NIP sintetizados neste trabalho.	87
<b>Figura 32</b>	Microscopia eletrônica de varredura MEV dos diversos MIP e NIP sintetizados neste trabalho. Continuação.	88
<b>Figura 33</b>	MEV do (A) MIP17 e (B) NIP17 obtido pelo método de <i>bulk</i> com amplificação de 50000x.	90
<b>Figura 34</b>	Espectros de FTIR do EDGMA.	91
<b>Figura 35</b>	Espectros de FTIR do MIP e NIP sintetizados com o monômero acrilamida.	91
<b>Figura 36</b>	Espectro de FTIR do polímero MIP17 preparado com 2-vinilpiridina (2-VP).	92
<b>Figura 37</b>	Espectro de FTIR do polímero NIP17 preparado com 2-vinilpiridina (2-VP).	93
<b>Figura 38</b>	Espectro de FTIR da hexazinona.	94
<b>Figura 39</b>	Perfil da adsorção de HXZ apresentado pelos MIP17 e NIP17.	95
<b>Figura 40</b>	Isotermas de Freundlich linearizadas usadas para estimar as características de ligação da Hexazinona para o MIP17.	97
<b>Figura 41</b>	Isotermas de Freundlich para estimar as características de ligação da Hexazinona para o NIP17.	97
<b>Figura 42</b>	Perfil cromatográfico para a detecção de HXZ e um interferente (simazina) antes e após experimento de afinidade.	101
<b>Figura 43</b>	Perfil cromatográfico para a detecção de HXZ e um interferente (atrazina) antes e após experimento de afinidade.	102
<b>Figura 44</b>	Voltamogramas cíclicos de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HXZ na superfície dos eletrodos MIPCPE, NIPCPE e CPE. Medidas realizadas em HCl (pH 2,5) e velocidade de varredura de 50 $\text{mV s}^{-1}$ .	104
<b>Figura 45</b>	Voltamogramas de pulso diferencial com redissolução catódica de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de hexazinona na superfície dos eletrodos de MIPCPE, NIPCPE e CPE. Condições das medidas: HCl a pH = 2,5, potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ) = -0,5 V, tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ) = 200 s, $v$ = 60 $\text{mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso = 50 mV, largura de pulso 40 ms.	105
<b>Figura 46</b>	Voltamogramas de pulso diferencial com redissolução catódica de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de hexazinona na superfície dos eletrodos de pasta de carbono modificados com MIP17, MIP5 e MIP12. Condições das medidas: HCl a pH = 2,5, $E_{ac}$ = -0,5 V, $t_{ac}$ = 200 s, de velocidade de varredura em 50 $\text{mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso de 100 mV e largura de	107

	pulso de 50 ms.	
<b>Figura 47</b>	Otimização do pH do eletrólito para o sensor biomimético proposto, na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HXZ.	108
<b>Figura 48</b>	Otimização do tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ) na SWV para o sensor biomimético proposto. Análise realizada na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HXZ, em solução de HCl com pH 2,5, agitação da solução de 200 s e potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ) $-0,5 \text{ V}$ .	109
<b>Figura 49</b>	Típicos voltamogramas de DPCSV para HXZ obtidos com o sensor biomimético proposto, nas condições previamente otimizadas. Eletrólito: HCl a pH 2,5; $t_{ac} = 200 \text{ s}$ ; $E_{ac} = -0.5 \text{ V}$ ; velocidade de varredura = $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; amplitude de pulso = $100 \text{ mV}$ e largura de pulso = $50 \text{ ms}$ . E forma adicionadas soluções de (a) $1,90 \times 10^{-11}$ ; (b) $3,85 \times 10^{-11}$ (c) $5,66 \times 10^{-11}$ (d) $7,41 \times 10^{-11}$ (e) $9,09 \times 10^{-11}$ e (f) $1,10 \times 10^{-10}$ .	110
<b>Figura 50</b>	Curva de calibração para HXZ obtida com os dados da Figura 49.	111
<b>Figura 51</b>	Cromatogramas obtidos para padrões de HXZ, tal como descrito na parte experimental.	115
<b>Figura 52</b>	Cromatogramas comparativos para um padrão de $100 \text{ mg L}^{-1}$ de HXZ e o cromatograma resultante da aplicação do MIP17 como MISPE, após pré-concentração de 10 vezes.	116

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Alguns dos principais grupos, funções e classes de pesticidas.	19
<b>Tabela 2:</b>	Monômeros comumente usados no preparo de MIP.	32
<b>Tabela 3:</b>	Monômeros comumente usados na síntese de MIP escolhidos para realizar as simulações computacionais	53
<b>Tabela 4:</b>	Quantidade de reagentes e métodos empregados na síntese dos polímeros para 0,1 mmol de hexazinona.	56
<b>Tabela 5 :</b>	Valores de área superficial específica dos polímeros sintetizados por <i>bulk</i> e polimerizados por aquecimento a 60 °C (MIP5) e (70 °C) MIP17.	88
<b>Tabela 6</b>	Resultados da análise do ajuste de Freundlich para HXZ em MIP17 e NIP17.	97
<b>Tabela 7:</b>	Parâmetros de afinidade do modelo de Freundlich para a triazina, atrazina e Hexazinona.	99
<b>Tabela 8:</b>	Agrotóxicos analisados no estudo da seletividade.	111

# LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	Ampere
BSA	Soro Albumina Bovina
CE	Eletrodo Auxiliar
CV	Voltametria Cíclica
E	Potencial
HXZ	Hexazinona
LOD	Limite de Quantificação
LOQ	Limite de Detecção
MIP	Polímero Molecularmente Impresso ( <i>Molecularly imprinted polymer</i> )
NIP	Polímero sem impressão molecular ( <i>non-imprinted polymer</i> )
POD	Peroxidase
PVP	Polivilpirrilodina
RE	Eletrodo de Referência
RPM	Rotações por Minuto
SWV	Voltametria de Onda Quadrada
V	Volt
WE	Eletrodo de Trabalho

# SUMARIO

## CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
1.1. Agrotóxicos	18
1.1.1. Triazinas	19
1.1.1.1. HEXAZINONA	21
1.2. Biossensores	21
1.3. Enzimas	22
1.3.1. Classificação das Enzimas	23
1.3.2. Peroxidase (POD)	24
1.3.2.1. AÇÃO CATALÍTICA DA POD	25
1.3.3. Fontes naturais de POD:	27
1.3.4. Processo de imobilização de enzimas na construção de biossensor	28
1.4. Polímeros biomiméticos ou molecularmente impressos: MIP ( <i>molecularly imprinted polymers</i> )	29
1.4.1. Síntese de polímeros de impressão molecular	30
1.4.1.1. EMPREGO DOS MIP COMO MATÉRIAS SORVENTES	36
1.5. Fundamentação da estratégias adotadas neste trabalho	38
1.5.1. Eletroatividade das triazinas	38
1.5.2. Voltametria de pulso diferencial	40
1.6. Objetivos	42
1.6.1. Geral	42
1.6.2. Específicos	43

## CAPITULO II

<b>2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	45
2.1. Aparelhagem e instrumentação básica	45
2.2. Reagentes e soluções	45
2.3. Preparo das soluções utilizadas	46
2.3.1. Solução estoque de Hexazinona (HXZ)	46



2.3.2.	Solução tampão fosfato pH 6	47
2.3.3.	Solução de guaiacol 0,4 mol L <sup>-1</sup>	47
2.3.4.	Solução de peróxido de hidrogênio	47
2.3.5.	Solução azul brilhante de Coomassie	48
2.3.6.	Preparo do gel Sephadex G-100 (30 a 80 kD)	48
2.3.7.	Solução dos agrotóxicos usados no estudo de interferentes	48
2.3.8.	Obtenção e preparação das amostras ambientais	49
2.4.	Extração da peroxidase da polpa de açaí e purificação parcial	49
2.4.1.	Purificação parcial da POD – Cromatografia por exclusão molecular em gel Sephadex G-100	50
2.4.2.	Análise qualitativa para detecção de peroxidase e polifenoloxidase	51
2.4.3.	Determinação das constantes cinéticas K <sub>MM</sub> e V <sub>max</sub> para a POD extraída de açaí	51
2.4.4.	Determinação da Atividade Enzimática	52
2.5.	Simulação computacional empregada na escolha do monomero funcional para síntese do MIP hexazinona	53
2.6.	Sínteses dos MIP.	55
2.6.1.	Caracterização dos polímeros de impressão molecular MIP e NIP	59
2.6.1.1.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MIP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	59
2.6.1.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	59
2.6.1.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS POR EXPERIMENTOS AFINIDADE	60
2.7.	Construção dos sensores	61
2.7.1.	Construção do biossensor à base de extrato vegetal de açaí	61
2.7.1.1.	BIOSENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA	61
2.7.1.2.	BIOSENSOR À BASE DE MONOCAMADAS AUTOARRANJADAS (SAM) EM SUPERFÍCIE DE OURO	61
		62

2.7.2.	Construção do sensor biomimético à base de polímero de impressão molecular	
2.8.	Medidas eletroquímicas	63
2.8.1.	Medidas eletroquímicas para os biossensores à base de pasta de carbono e eletrodo de ouro – SAM	63
2.8.2.	Medidas eletroquímicas para o sensor biomimético à base de pasta de carbono modificado com polímeros de impressão molecular (MIP).	64

## **CAPÍTULO III**

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3.1.	Biossensores à base de peroxidase extraída da polpa de açaí	66
3.1.1.	Extração e purificação da POD obtida do extrato de açaí	66
3.1.1.1.	PURIFICAÇÃO PARCIAL DA POD POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA EM GEL SEPHADEX G-100.	66
3.1.1.2.	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE $K_{MM}$ E $V_{MAX}$ DA POD CONTIDA NA POLPA DE AÇAÍ	68
3.1.1.3.	DETERMINAÇÃO DO CONTEUDO PROTÉICO DO EXTRATO DE AÇAÍ E DAS CORRESPONDENTES DILUIÇÕES	68
3.1.1.4.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO EXTRATO DE AÇAÍ E DAS CORRESPONDENTES DILUIÇÕES	71
3.1.2.	Aplicação da peroxidase extraída da polpa de açaí na construção de biossensores voltamétricos	72
3.1.2.1	BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA	72
	a) Otimização dos parâmetros experimentais	72
	b) Perfil de resposta do biossensor para hidroquinona	75
3.1.2.2.	BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO HEXAZINONA	78
	a) Otimização dos parâmetros experimentais	78
	b) Perfil de resposta do biossensor para hexazinona	81
3.2.	Sensor biomimético para detecção de hexazinona	84
3.2.1.	Simulações computacionais: Obtenção dos dados teóricos para	84

escolha do monômero funcional	
3.2.2. Caracterização dos MIP sintetizados	87
3.2.2.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MIP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	87
3.2.2.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	90
3.2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTETIZADOS COM 2-VP ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	94
3.2.3. Sensor biomimético à base de polímeros de impressão molecular para determinação de hexazinona	102
3.2.3.1. OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM MIP OU NIP	103
3.2.3.2. PERFIL DA PESPOSTA DO SENSOR MIPCPE PARA HXZ	104
3.2.3.3. OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SENSOR	107
3.2.3.4. PERFIL DE RESPOSTA DO SENSOR	109
3.2.3.5. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO SENSOR	112
3.2.4. Aplicação do MIP17 em amostras de interesse ambiental em água proveniente de uma plantação de cana-de-açúcar	113
3.2.4.1. APLICAÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO	113
3.2.4.2. APLICAÇÃO DO MIP17 COMO MATERIAL ADSORVENTE EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	114

## **CAPÍTULO 4**

<b>4. CONCLUSÕES</b>	118
<b>REFERÊNCIAS</b>	120

# **CAPITULO 1**

# 1 - INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Agrotóxicos

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) agrotóxicos são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados da madeira.<sup>1</sup>

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (grupo funcional) em organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, triazinas, clorofenóis, entre outros, e com base no tipo de pragas alvo que combatem, tal como mostrado na Tabela 1.<sup>2</sup>

O Brasil é o maior produtor de açúcar-de-cana do mundo, seguido pela Índia e Austrália, com os menores custos de produção, e também o maior exportador do produto, sendo que o Estado de São Paulo é o responsável por 60% de todo o açúcar produzido no país e por 70% das exportações nacionais.<sup>3</sup>

**Tabela 1: Alguns dos principais grupos, funções e classes de agrotóxicos.<sup>2</sup>**

<b>Grupo e função</b>	<b>Classes</b>
<b>Inseticidas</b> (controle de insetos)	Organofosforados, organoclorados, carbamatos, benzoiluréias e organometálicos.
<b>Herbicidas</b> (controle de plantas daninhas)	Triazinas, uréias, tiocarbamatos, amidas substituídas, ácidos benzóicos, piridinas, dinitrofenóis.
<b>Fungicidas</b> (controle de fungos)	Ditiocarbamatos, dicaroximidas, ftalimidas, benzimidazóis, imidazóis, acilaminas, sais inorgânicos (sulfato de cobre) fosfito de zinco, fósforo branco, cumarina.
<b>Rodenticidas</b> (controle de roedores)	Sais de ferro, acetato de fentina, clinoclamina, cloretos, brometos de alquibenzilamônio, hipocloritos de cálcio metanal.
<b>Algicidas</b> (controle de algas)	Sais de ferro, acetato de fentina, clinoclamina, cloretos, brometos de alquibenzilamônio, hipocloritos de cálcio.
<b>Molusquicidas</b> (controle de moluscos)	Metaldeído.
<b>Nematicidas</b>	Metilcarbamatos de benzofuralina, metilcarbamadto de oxima e organofosforados.

### **1.1.1. Triazinas**

As triazinas são muito utilizadas como herbicidas no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas nas mais variadas culturas, tais como a cana-de-açúcar, milho, sorgo, abacaxi, banana, café, uvas, entre outras.<sup>4</sup> As s-triazinas possuem um anel heterocíclico de seis membros onde os átomos de carbono e nitrogênio são simetricamente localizados e os substituintes das posições 2, 4 e 6, constituem-se no diferencial entre as várias formulações disponíveis

comercialmente.<sup>5</sup> Dentre as mais importantes, temos a atrazina, ametrina e a hexazinona mostrada na Figura 1.

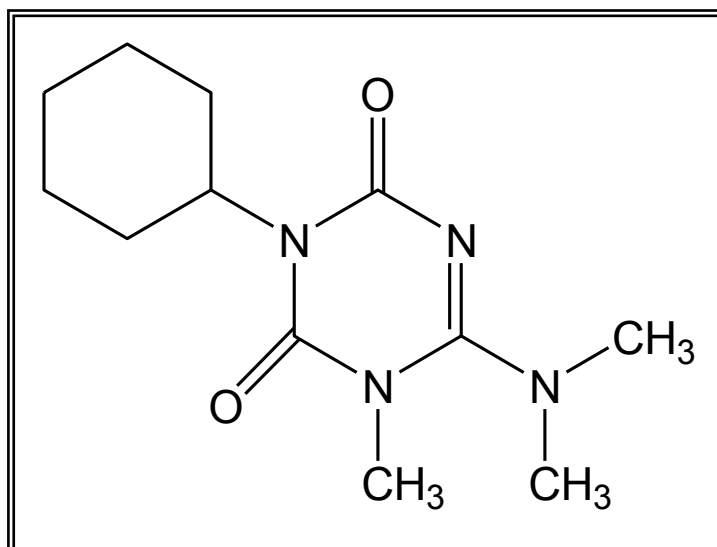


Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida hexazinona.

Os níveis de triazinas no ambiente são normalmente quantificados usando uma ou mais combinações de técnicas cromatográficas.<sup>6</sup> Apesar dos métodos cromatográficos serem precisos, sensíveis e seletivos, eles são trabalhosos e relativamente caros, quando comparados com outras técnicas de análise. Isto tem despertado o interesse para a detecção e quantificação de herbicidas por técnicas eletroquímicas, pois, além de simples e de baixo custo, elas oferecem a possibilidade de se determinar a concentração do herbicida diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações químicas.<sup>1</sup> Entre as mais utilizadas atualmente, destaca-se a voltametria de onda quadrada (SWV), e a voltametria de pulso diferencial (DPV), que são técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis.<sup>7,8</sup>

### **1.1.1.1. HEXAZINONA**

A hexazinona é um herbicida do grupo das triazinonas, sendo que as suas formulações tem diferentes seletividades na cultura da cana-de-açúcar. As formulações da hexazinona (diuron + hexazinona e azafenidin + hexazinona) são aplicadas em pós-emergência inicial e tardia das plantas de cana-de-açúcar, na época das chuvas, em soqueira de terceiro corte, após colheita com queima prévia do canavial. A mistura diuron + hexazinona é o único produto que não afeta as características tecnológicas e o rendimento do açúcar, porém possui fator bio-acumulativo em peixes, facilidade de translocação em solos e, por isso, pode contaminar poços e águas subterrâneas. Vapores tóxicos e sua formulação têm altíssima resistência à temperatura, podendo se manter no meio ambiente de forma inalterada.<sup>9</sup>

## **1.2. Biossensores**

Um biossensor, segundo a definição mais tradicional pode ser definido como sendo um dispositivo que apresenta um elemento biológico sensível a um dado analito intimamente ligado a um transdutor. Como transdutor entende-se que é o componente do biossensor capaz de converter sinais físicos e químicos em sinais mensuráveis, usualmente sinais eletrônicos, cuja magnitude seja proporcional à concentração da espécie ou grupo químico.<sup>10, 11</sup>

O material biológico utilizado como reconhecedor da reação bioquímica nos biossensores pode ser uma enzima, um anticorpo, um tecido animal ou vegetal.<sup>12</sup> Entretanto, atualmente, também são considerados biossensores, àqueles dispositivos que empregam como reconhecedor compostos biomiméticos, como



catalisadores redox e polímeros molecularmente impressos (MIP).<sup>13,14</sup> Sendo que para a obtenção do biossensor, este material deve ser imobilizado sobre a superfície do transdutor (elétrico, óptico, piezoeletrico, etc.)<sup>10,12,15</sup> e o sinal obtido é relacionado à concentração do analito. Quando o material biológico usado na construção de um biossensor é uma enzima, por exemplo, este é denominado biossensor enzimático<sup>16</sup> e no caso do uso de catalisadores redox ou MIP é denominado de sensor biomimético.<sup>13</sup>

### **1.3. Enzimas**

As enzimas são proteínas que, atuam como catalisadores na maioria das reações bioquímicas. Por serem catalisadores eficientes, são aproveitadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica e na alimentar.

As enzimas diminuem a barreira da energia de ativação das reações químicas (Figura 2) sem alterar a constante de equilíbrio, isto é facilitando a formação do estado de transição (ES) entre enzima e substrato. Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas concentrações e como não são consumidas na reação podem ser recuperadas. Visto que elas são proteínas, perdem suas propriedades catalíticas se submetidas a agentes extremos como calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes ou outros materiais que provoquem a sua desnaturação. As características mais intrínsecas das enzimas são a especificidade e poder catalítico.<sup>17,18</sup>

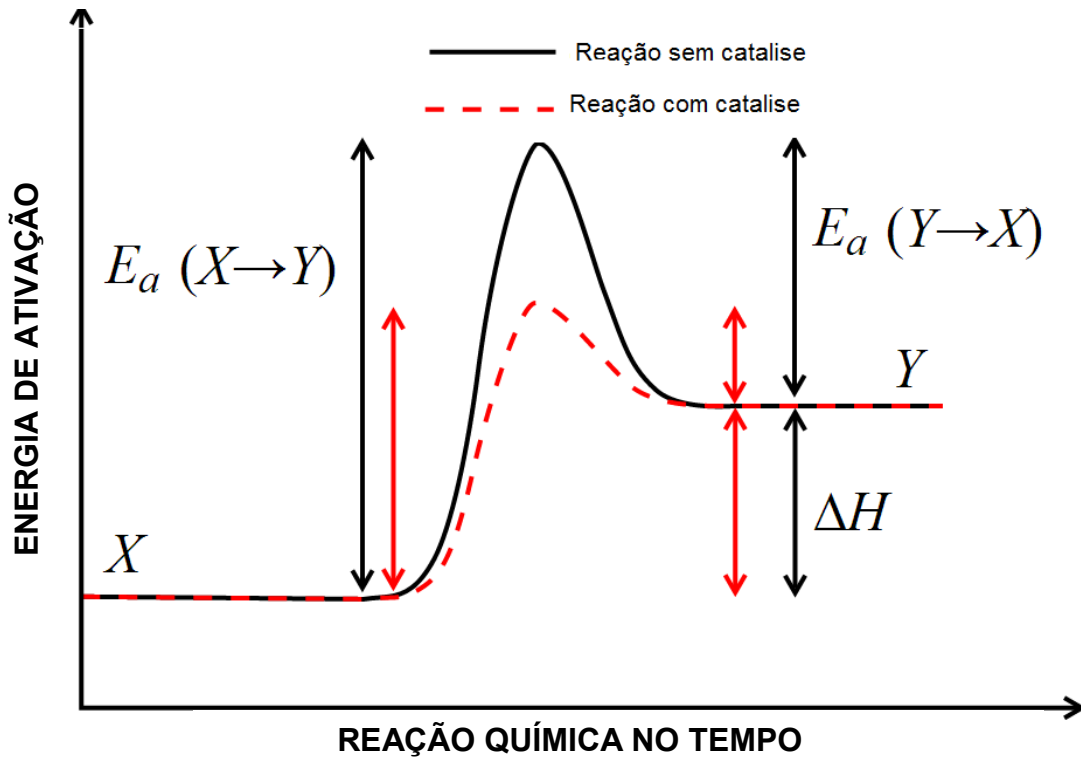


Figura 2. Curva de Energia de Ativação vs tempo de reação na presença /ausência de catalisador.<sup>18</sup>

Devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas possuem um alto grau de especificidade sendo esta uma importante característica das mesmas. Uma enzima biotransforma uma substância para reagir devido à configuração da molécula proteica, da singularidade de seu sítio ativo e da conformação estrutural da molécula do substrato. Cada enzima tem seu próprio e único mecanismo de catálise.<sup>17</sup>

### 1.3.1. Classificação das Enzimas

As enzimas são classificadas em seis principais grupos de acordo com as reações que catalisam. Assim, têm-se às óxido-redutases (reações de transferência de elétrons); transferases (reações de transferência de grupos funcionais); hidrolases (reações de hidrólise – promovem a cisão de um material orgânico

através do uso de água); liases (adição de grupos a duplas ligações ou o inverso, rompem ligações glicosídicas); isomerases (catalisam rearranjos intramoleculares – transferência de grupos dentro de moléculas produzindo formas isoméricas) e ligases (formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP).<sup>17,18</sup>

### 1.3.2. Peroxidase (POD)

A peroxidase é uma enzima que pertence ao grupo das oxido-redutases, as enzimas pertencentes a este grupo estão relacionadas com as oxidações e reduções biológicas, e conseqüentemente, com os processos fermentativos e respiratórios.<sup>17,18</sup>

Os estudos preliminares com as peroxidases deram início em 1809, devido à variação na coloração de tecidos vegetais e leite, na presença de peróxidos. No entanto, o nome peroxidase só foi usado um século depois, em pesquisa de enzimas da raiz forte (*Armoracia lapathifolia*) e por isso muitas vezes a enzima peroxidase é referida como HRP (*horseradish peroxidase*), visto que esta enzima foi amplamente estudada em todos os aspectos cinético-enzimático, tornando-se referência para estudos de peroxidases de diferentes fontes. Estes estudos mostraram uma atividade oxidativa durante o amadurecimento de frutos. Para esses estudos e de peroxidases em geral foi estabelecido metodologia de ensaio usando guaiacol (como substrato modelo) e peróxido de hidrogênio, que é necessário para a formação do composto I (HRP-I), para posterior catálise de oxidação do substrato via composto (II).<sup>19,20</sup>

### 1.3.2.1. AÇÃO CATALÍTICA DA POD

A ação catalítica da POD consiste inicialmente em uma reação com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , transferindo dois elétrons para o grupo prostético de ferro heme. Muitas peroxidases são heme proteínas e contém como grupo prostético a porfirina de ferro (III) conhecida também como protoporfirina IX (Figura 3).<sup>20,21</sup>

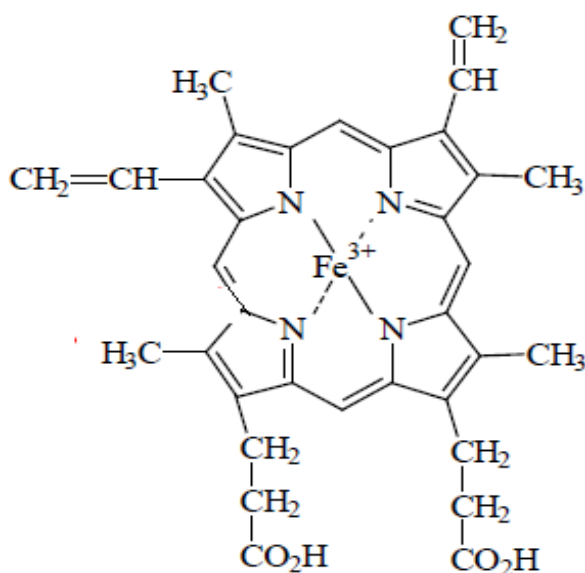
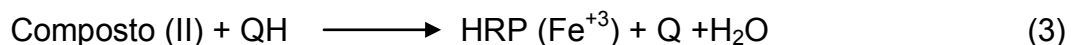


Figura 3. Estrutura química do grupo heme das peroxidases.<sup>21</sup>

O mecanismo catalítico da HRP pode ser descrito como demonstrado nas reações a seguir:<sup>21</sup>



O seu ciclo catalítico ocorre em três etapas: (1) a forma férrica da enzima é oxidada com a transferência direta de dois elétrons pelo peróxido de hidrogênio (seu substrato natural) ao chamado composto I, que é constituído pelo radical oxiferril e a

porfirina protonada ( $O=Fe^{4+},P^+$ ), fornecendo uma carga formal e positiva igual a 5+ ao composto (I) (reação 1). (ii) A seguir, através da transferência de um elétron de um doador (QH), o composto (I) é então reduzido à forma conhecida como composto (II), que corresponde ao íon oxiferril ( $O=Fe^{4+}$ ) (reação 2) e, (iii) finalmente retorna a sua forma nativa [ $HRP(Fe^{3+})$ ] por uma nova transferência de elétron da molécula doadora (reação 3). Nas etapas (ii) e (iii) a espécie doadora de elétrons é oxidada, a qual pode ser regenerada a seu estado inicial pela sua redução eletroquímica. Quando espécies fenólicas, como hidroquinonas, catecois e fenilaminas, atuam como doadores de elétrons na regeneração da forma nativa da HRP, ocorre o que se conhece como a transferência eletrônica mediada. Assim, em biossensores amperométricos e voltamétricos à base da POD e na presença de peróxido de hidrogênio, compostos fenólicos podem ser quantificados através da redução destes compostos na superfície do eletrodo (reação 4), após eles terem sido oxidados durante a regeneração da enzima.<sup>21-24</sup>

Por outro lado, quando mantém-se fixa a concentração do doador de elétrons, e varia-se a de  $H_2O_2$  a corrente de redução será proporcional à concentração do substrato no meio, sendo que esta corrente pode ser relacionada em termos de atividade enzimática.<sup>25</sup>

Quando um inibidor é introduzido no meio reacional, ele pode se coordenar com o composto intermediário (I), o que acarreta em decréscimo da atividade enzimática e conseqüente decréscimo no sinal de corrente. Para esse caso, a inibição é do tipo incompetitiva.<sup>25</sup>

Yulaeva e colaboradores<sup>26</sup> desenvolveram um biossensor potenciométrico à base da enzima peroxidase para detecção de simazina em alimentos. Este

biossensor foi baseado na quantificação direta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuja concentração diminui como consequência de inibição competitiva da enzima pelo pesticida.

### 1.3.3. Fontes naturais de POD: Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart)

O açaizeiro (*Euterpe oleraceae* Mart)<sup>27</sup> é uma palmeira de ampla distribuição na Amazônia. Seu fruto o açaí (Figura 4) constitui um produto de grande relevância sócio-ambiental e econômico para a região norte do Brasil. Explorado principalmente de forma extrativista, dadas as grandes populações da espécie na floresta, predomina nos estados do Amapá e Pará. Rico em enzimas, antocianinas e gordura é muito consumido na região Amazônica. Entretanto, um dos grandes problemas do consumo do açaí é sua alta perecibilidade, devido à presença de certas enzimas presentes no fruto.<sup>28</sup> Desta forma, o suco, mesmo refrigerado, apresenta um tempo de conservação máximo de 24 horas. Alterações ocorrem devido à ação de microrganismos e em função de enzimas presentes no açaí, dentre essas, as peroxidases e polifenoloxidasas, que participam de reações oxidativas alterando as características sensoriais, originando *off-flavors*, degradação na cor e na qualidade nutricional<sup>28</sup>.



Figura 4. Fruto do açaizeiro: açaí. Fonte: Kjnutricional Wordpress.<sup>29</sup>

Segundo o Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa n.º 12, de 10 de setembro de 1999, que estipula o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para o açaí, os produtos obtidos do fruto são classificados de acordo com a adição ou não de água e seus quantitativos (% de sólidos totais), em: *(i)* polpa de açaí (polpa extraída sem adição de água e sem filtração); *(ii)* açaí grosso, especial ou tipo A (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais acima de 14% e uma aparência muito densa); *(iii)* açaí médio, regular ou tipo B (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais entre 11 e 14% e uma aparência densa); e *(iv)* açaí fino, popular ou tipo C (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando sólidos totais entre 8 e 11% e uma aparência pouco densa)<sup>30</sup>.

#### **1.3.4. Processo de imobilização de enzimas na construção de biossensores**

Um processo de imobilização eficiente de enzimas consistirá em fixar ou ligar este catalisador biológico em um determinado suporte sem perda considerável de sua ação catalítica<sup>12</sup>. As características apresentadas pelas enzimas depois de imobilizadas dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização, visando manter a integridade do sítio ativo da enzima<sup>31</sup>. Existem vários métodos que utilizam diferentes suportes, diversos agentes reticulantes ou ativadores para imobilização de enzimas.<sup>32</sup>

Diversos procedimentos têm sido empregados na construção de biossensores enzimáticos, sendo que todos podem ser encaixados na classificação geral dos procedimentos de imobilização de material biológico esquematizados na Figura 5, sendo: (a) adsorção; (b) encapsulação; (c) ligação covalente, e (d) ligação covalente

cruzada (*crosslinking*). A descrição de cada um deles está amplamente discutido na literatura.<sup>32-34</sup>

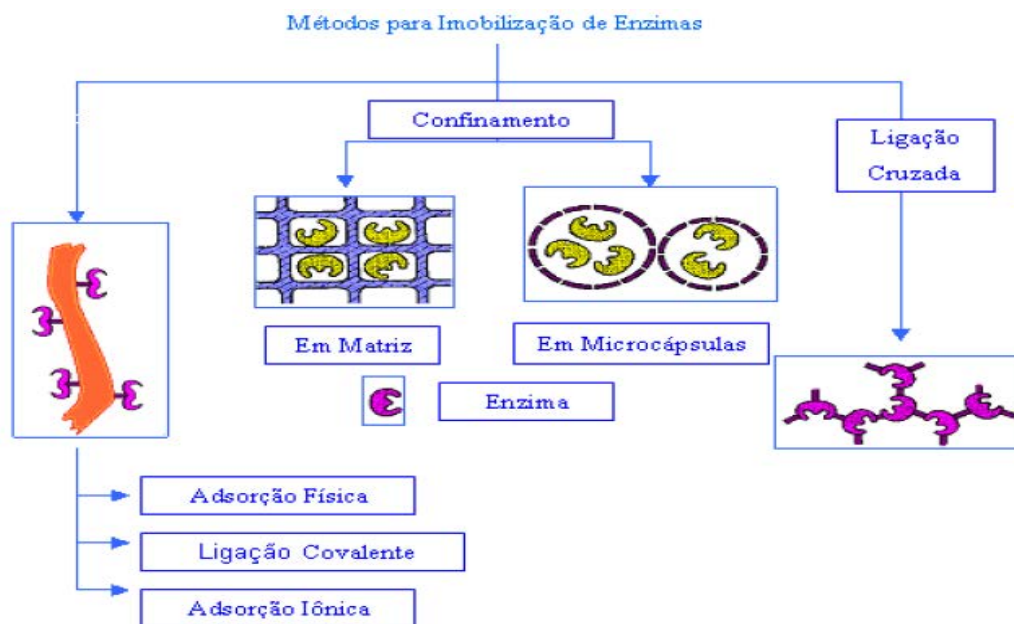


Figura 5. Diagrama esquemático dos métodos de imobilização de enzimas mais empregados na construção de biossensores.<sup>32</sup>

## 1.4. Polímeros Biomiméticos ou Molecularmente Impressos: *MIP* (*molecularly imprinting polymers*)

Em linhas gerais os MIP são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga<sup>35</sup> Após a polimerização, a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito de interesse.<sup>36</sup>



Com esta estratégia, o resultado é uma “memória” molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito. Devido aos sítios de ligação dos MIP, que apresentam afinidades e seletividades aproximadas aos dos sistemas anticorpo-antígeno, estes materiais são designados como polímeros biomiméticos.<sup>36</sup>

### **1.4.1. Síntese de polímeros de impressão molecular**

O princípio da impressão molecular é baseado em três etapas principais:

(i) O primeiro passo para realizar a síntese dos MIP é a pré-polimerização que consiste na escolha do monômero funcional mais adequado para o analito em estudo, para permitir a formação de um complexo estável “monômero funcional – *template*”. Para isto, o analito (*template*) deve apresentar em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir com esses monômeros. Devido a que a interação é realizada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores do monômero funcional em relação ao analito devem ser empregadas com o intuito de deslocar o equilíbrio para a formação do complexo e desta forma, permitir a formação de maior quantidade de sítios específicos de reconhecimento.<sup>36,37</sup>

A interação do analito e monômero pode ser por meio de ligação covalente ou não covalente (Figura 6). Na ligação não covalente a interação pode ser por ligações de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica, transferência de carga ou por interação hidrofóbica.<sup>38</sup>

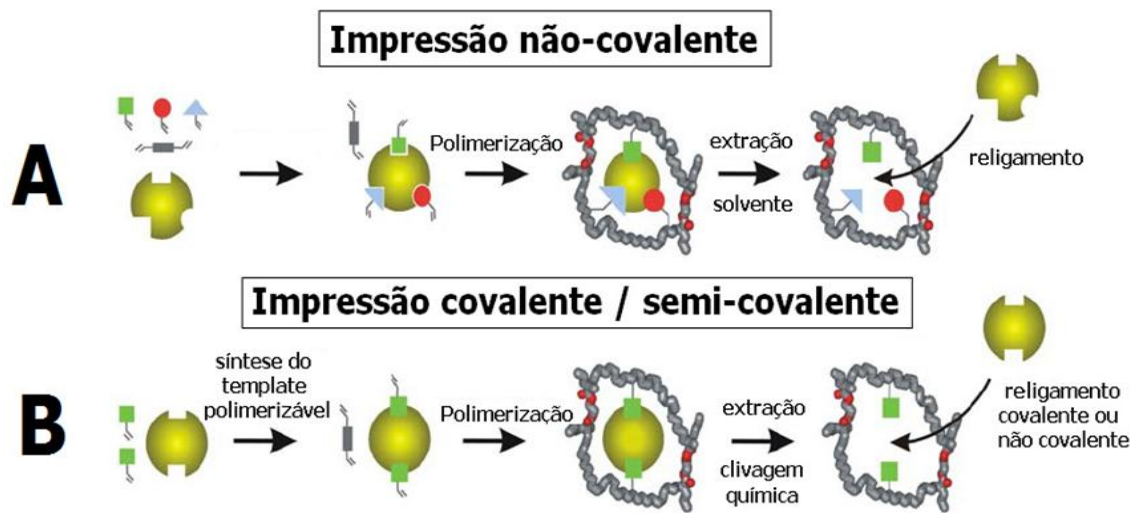
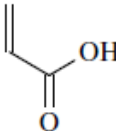
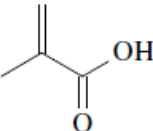
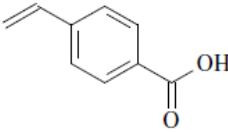
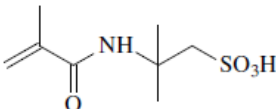
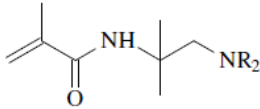
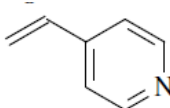
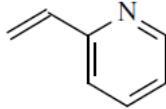
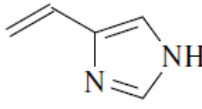
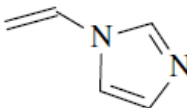
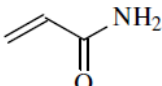


Figura 6. Princípios da Impressão Molecular. (A) impressão não covalente. (B) impressão covalente/semi-covalente. Fonte: Hayes e Davidson, 2002.<sup>39</sup>

A Tabela 2 apresenta alguns monômeros funcionais usados na síntese de MIP<sup>35</sup> repostados na literatura para diversos analitos.

**Tabela 2. Monômeros comumente usados no preparo de MIP.**

Monômero funcional	Estrutura química
Ácido acrílico	
Ácido meta-acrílico	
Ácido <i>p</i> -vinilbenzóico	
Ácido acrilamidossulfônico	
Amino-metacrilaminada	
4-Vinilpiridina	
2-Vinilpiridina	
4-Vinilimidazol	
1-Vinilimidazol	
Acrilamida	

(ii) No segundo passo inicia-se a polimerização na presença de um reagente de ligação cruzada, este reagente na síntese de um MIP é responsável pela estabilidade mecânica da matriz polimérica, e pela textura do material.<sup>40</sup>

Na Figura 7 se apresentam os reagentes de ligação cruzada mais utilizados na síntese de MIP.

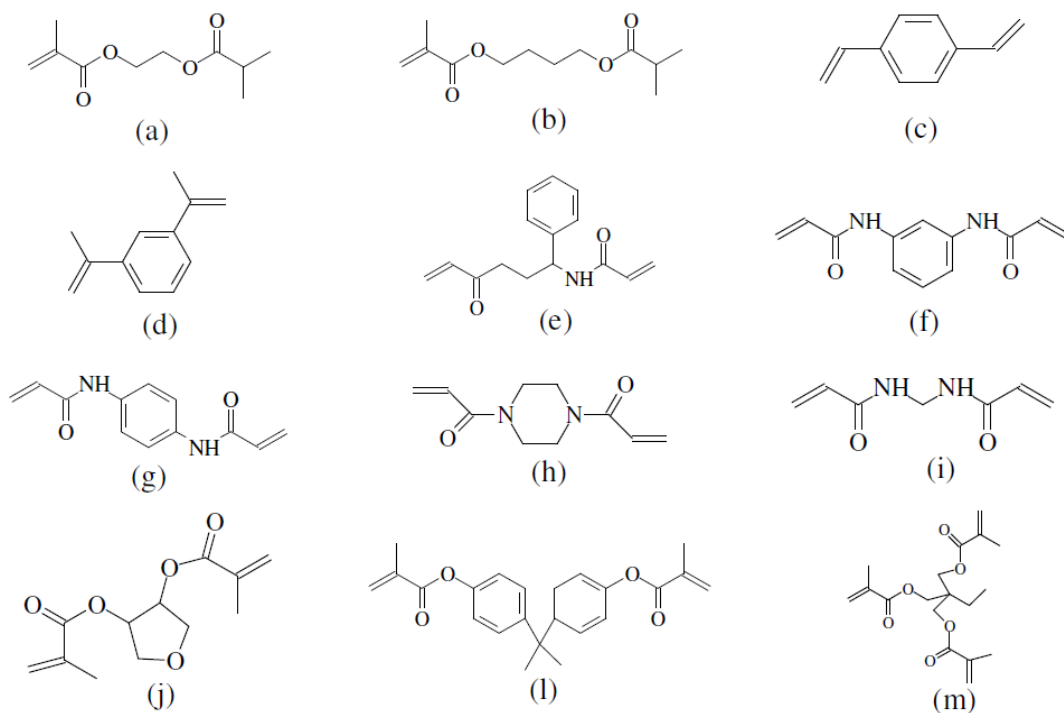
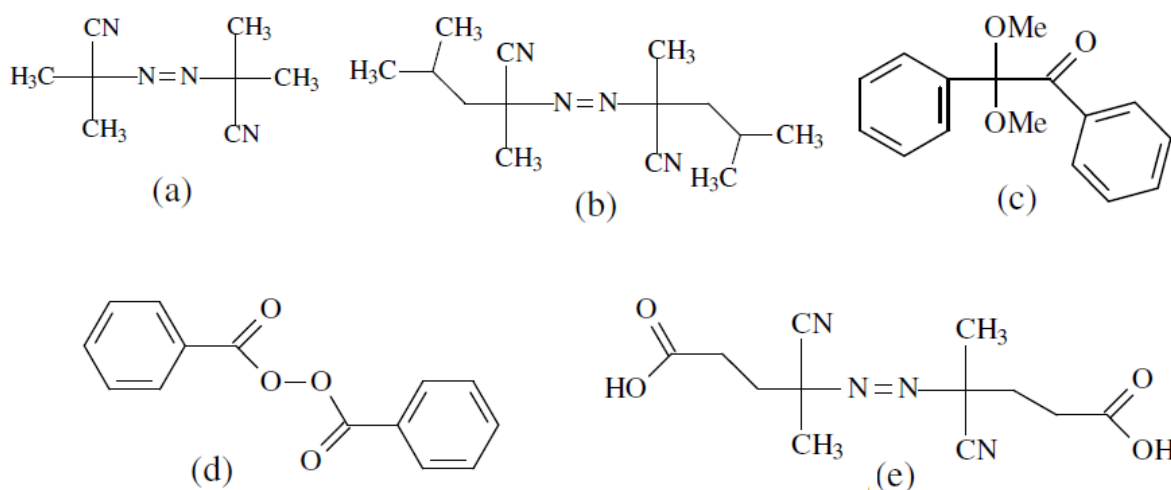


Figura 7. Exemplos de estrutura química de reagentes de ligação cruzada. (a) etileno glicol dimetacrilato (EDGMA); (b) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (c) *p*-divinilbenzeno (DVB); (d) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP); (e) N,O-*bis*-acriloyl-L-fenilalaninol; (f) 2,6-*bis*-acriloylamidopiridina; (g) 1,4-fenilenodiacrilamina; (h) 1,4-diacrilol; (i) N,N'-metileno *bis*-acrilamida; (j) anidroeritrotol dimetacrilato; (l) *iso*-propileno-*bis*-(1,4-fenileno) dimetacrilato; (m) trimetilpropanotrimetacrilato (TRIM).

Para que se inicie a reação de polimerização do reagente de ligação cruzada em torno do complexo “*template*-monômero funcional” é necessário acrescentar um iniciador radicalar (Figura 8) ao meio. Este iniciador radicalar é responsável pela geração de radicais livres, que são responsáveis pelo início da polimerização, a formação de radicais é induzida com aquecimento e/ou radiação UV. O agente radicalar mais utilizado na síntese dos MIP é o 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila (AIBN), mas outros também podem ser utilizados.<sup>41</sup>



**Figura 8. Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares empregados na síntese de MIP, (a) 2,2'-azo-*bis*-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-*bis*-dimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-*bis* (4-ciano pentaenóico).**

(iii) Na terceira etapa o polímero resultante é moído (se necessário), peneirado e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, obtendo-se assim o polímero de impressão molecular<sup>41</sup>. Durante o processo de quebra e trituração do polímero, alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos, o que diminui a capacidade seletiva de retenção do polímero.<sup>35</sup>

O solvente é um parâmetro importante na síntese de MIP que tem como finalidade solubilizar os reagentes da síntese, além de contribuir na formação adequada de poros e, por essa razão, eles são conhecidos de solventes porogênicos.<sup>35</sup> O aumento do volume do solvente porogênico aumenta a área superficial do polímero.<sup>38</sup>

A síntese dos MIP é realizada convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em “*bulk*”, onde a reação é realizada em sistema homogêneo. Esta reação se inicia com a formação do complexo “*template*-monômero funcional” em presença do solvente porogênico, logo são adicionados o reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio sob fluxo de N<sub>2</sub> ou Ar e induzida com aquecimento e/ou radiação UV em frascos selados. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar.<sup>38</sup>

As sínteses dos MIP podem ser realizadas por outras metodologias como métodos de polimerização heterogênea. Ao contrário do método de polimerização em “*bulk*”, cuja síntese é realizada em sistema homogêneo, a maioria dos novos métodos de preparo contemplam reações em sistemas heterogêneos, incluindo a polimerização por suspensão<sup>41</sup>, por precipitação<sup>42</sup> e por expansão em multi-etapas.<sup>43</sup>

Outros métodos de preparo dos MIP contemplam reações de polimerização dentro de poros de sólidos (sílica e resinas)<sup>43-45</sup> e reações de polimerização sobre superfície modificada de suporte sólido.<sup>46</sup>

#### 1.4.1.1. EMPREGO DOS MIP COMO MATERIAIS SORVENTES

A extração em fase sólida (SPE) é um método amplamente empregado na extração e concentração de analitos, quando os mesmos estão presentes em baixos níveis de concentração, na remoção de compostos interferentes em matrizes complexas e na mudança do meio de solubilização de um analito antes de sua análise cromatográfica.<sup>47</sup>

Os sorventes utilizados na SPE podem apresentar baixa seletividade em uma matriz complexa, pois neste caso, substâncias interferentes de polaridade similar ao analito podem ser retidas e concentradas.<sup>41,47,48</sup>

O emprego de MIP como material adsorvente na técnica de extração em fase sólida recebe a designação de extração em fase sólida com impressão molecular (*Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction*, MISPE).<sup>35,49</sup> Um procedimento de SPE consiste na percolação da amostra no material sorvente disposto em cartuchos, onde a espécie de interesse fica retida seletivamente quando do uso do MIP. Em seguida, ao se empregar amostras complexas, faz-se necessário efetuar uma etapa de limpeza com um solvente adequado, no intuito de extrair as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações não específicas. Nesta etapa, a espécie de interesse não deve ser co-eluída. A etapa final é efetuada mediante a eluição do analito na ausência dos interferentes<sup>50,51,52,53</sup>. Nestes procedimentos, etapas de "clean up" e de pré-concentração são, quando possível, executadas simultaneamente, o que confere também aos MIP características de materiais pré-concentradores. Na Figura 9 se apresentam as principais etapas empregadas na extração em fase sólida.<sup>47,49-51</sup>

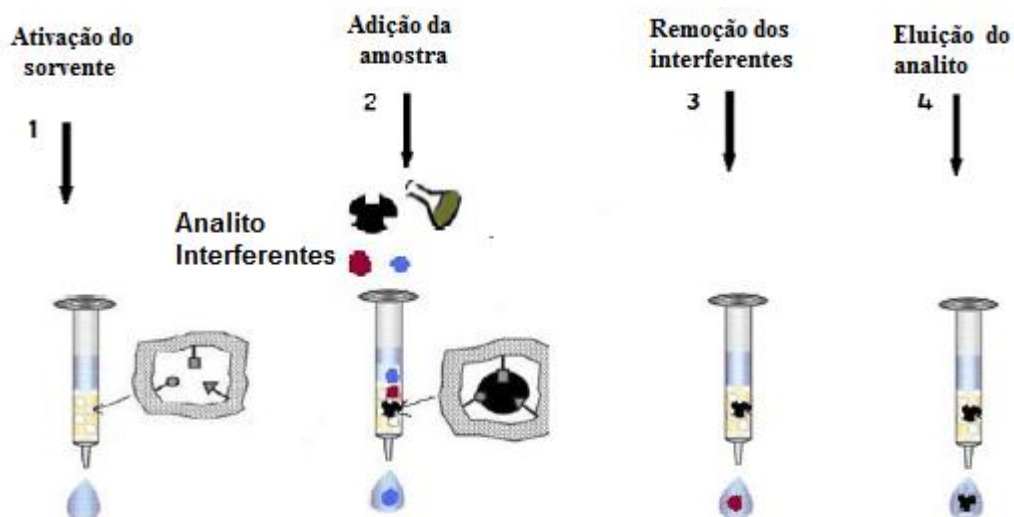


Figura 9. Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida (SPE).<sup>54</sup>

Para avaliar o desempenho dos MIP em técnicas de separação deve-se considerar duas características importantes: (i) a capacidade seletiva do MIP na presença de concomitantes; e (ii) o efeito de impressão do MIP para uma molécula molde (*template*) em relação a um polímero não impresso, conhecido como NIP ("Non-imprinted polymer")<sup>51</sup>.

A quantidade de adsorção ( $Q$ ,  $\text{mmol g}^{-1}$ ) é calculado com base na diferença de concentração hexazinona antes e depois da adsorção em um volume constante de metanol e um peso constante do MIP ou NIP, de acordo com a seguinte equação 1:

$$Q = \frac{(C_o - C)V}{M} \quad (\text{eq. 1})$$



Onde  $C_0$  é a concentração inicial do analito ( $\text{mmol L}^{-1}$ ),  $C$  é a concentração após a absorção,  $V$  é o volume da solução (mL), e  $M$  é o peso de MIP ou NIP (g). A quantidade de adsorção aumenta com o aumento da concentração do analito, o que representa a saturação de cavidades de ligação ativos do polímero.

## **1.5. Fundamentação das estratégias adotadas neste trabalho**

### **1.5.1. Eletroatividade das triazinas**

A maior parte dos trabalhos envolvendo determinação eletroanalítica das triazinas relatam a detecção utilizando eletrodos de mercúrio. Como reportado, as triazinas apresentam um ou mais picos referentes à redução das formas mono- e diprotonadas, picos estes que podem ser utilizados para determinação eletroanalítica de triazinas em diferentes amostras.<sup>55,56</sup>

Privman e Zuman,<sup>56</sup> pesquisaram a redução da hexazinona por polarografia de pulso diferencial e mencionam o aparecimento de dois processos de redução correspondente à transferência de dois elétrons de uma molécula que tem um único grupo eletroativo ( $\text{C=N}$ ), tal como representado na Figura 10 (reações 5 a 9).

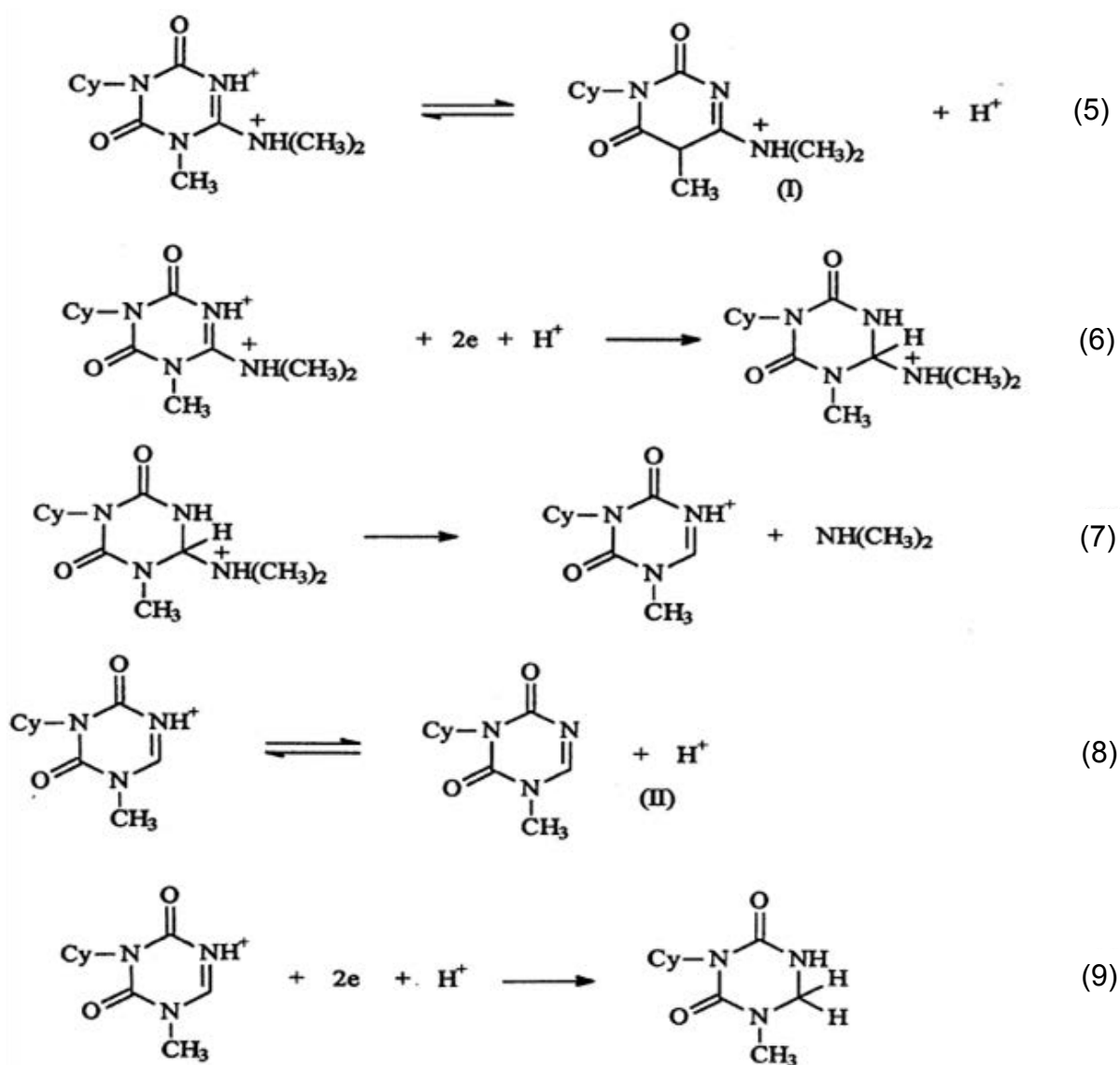


Figura 10. Mecanismo de redução da Hexaminona.

## 1.5.2. Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A diferença entre as correntes no final e no início do pulso faz com que a contribuição da corrente capacitiva seja minimizada. Como anteriormente indicado, a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final do pulso (S2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado<sup>57</sup> tal como se observa na Figura 11. Esta diferença de corrente em função do potencial de pulso fornece gráficos na forma de picos nos quais parâmetros como amplitude da modulação conhecido como amplitude de pulso ( $\Delta E$ ) e largura do pulso ( $\tau$ ) são parâmetros que devem se devidamente otimizados.

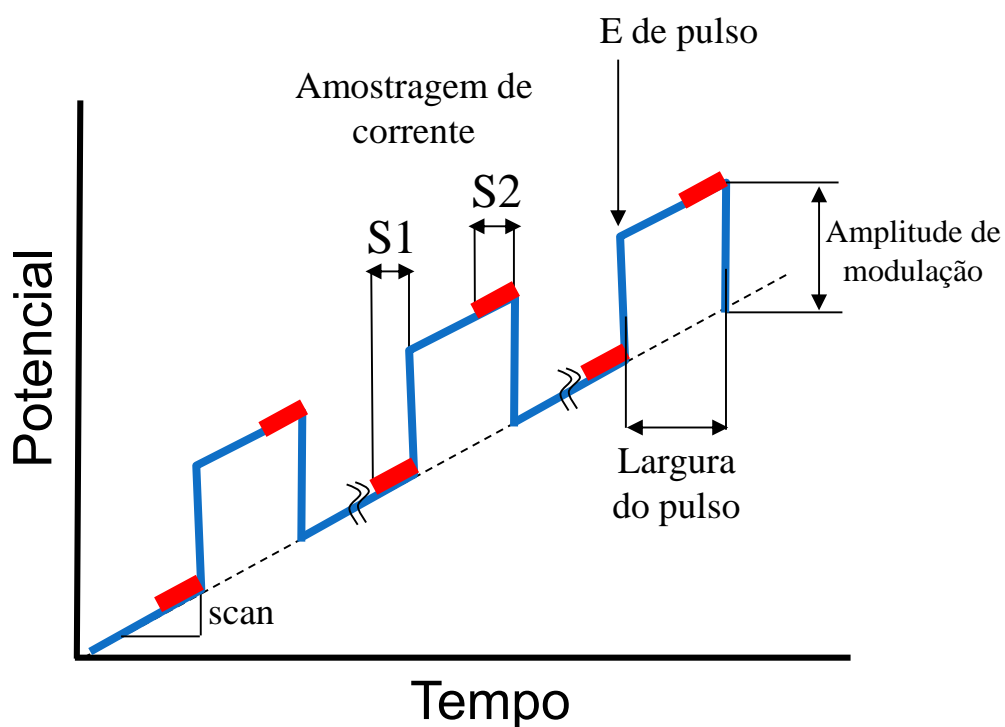


Figura 11. Representação da voltametria de pulso diferencial.<sup>57</sup>

Na voltametria de redissolução, uma reação eletroquímica entre o analito com o eletrodo de trabalho deve ocorrer antes da varredura e aquisição de sinal inicial. Devido a esse procedimento, o analito pode ser pré-concentrado no eletrodo de trabalho. Como consequência, um aumento da magnitude da corrente medida é obtido, com diminuição significativa dos limites de detecção alcançados para estas espécies químicas. A pré-concentração do analito na superfície do eletrodo ocorre sob aplicação de um potencial controlado durante um tempo determinado, e em condições hidrodinâmicas (transporte de massa) controladas e reproduzíveis. Após esta etapa de pré-concentração, é feita uma varredura de potencial no qual o analito é redissolvido (*stripping*) para a solução. A análise voltamétrica por redissolução possui duas variantes, a catódica e a anódica, a qual é aplicada dependendo das características eletroquímicas da espécie a ser analisada.<sup>57,58</sup>

Gholivand e colaboradores<sup>59</sup> desenvolveram um sensor à base de pasta de carbono modificado com polímero de impressão molecular, para determinação do herbicida cianizina em alimentos, eles usaram a técnica eletroanalítica de pulso diferencial com redissolução catódica e encontraram um limite de detecção e quantificação de  $3,9 \times 10^{-9}$  e  $1,1 \times 10^{-7}$  respectivamente, mostrando que a técnica foi sensível para a determinação deste pesticida.

Yulaeva e colaboradores<sup>26</sup> utilizaram um biossensor potenciométrico com enzima peroxidase para detecção de simazina em alimentos. Este biossensor foi baseado na detecção potenciométrica da água oxigenada gerada pela reação da enzima peroxidase com o substrato, que é inibida após a reação competitiva com o pesticida. O mecanismo de resposta do biossensor é função da reação competitiva entre a simazina e o substrato pelos sítios ativos da enzima diminuindo, assim, a formação do produto da reação entre substrato e enzima. Neste trabalho, a

superfície que apresentou melhor eficiência como suporte para o biossensor foi o ouro.

Moccelini<sup>60</sup> desenvolveu biossensores com monocamadas auto-organizadas de tióis para determinação do agrotóxico tiodicarbe, nesse estudo a enzima peroxidase foi extraída dos brotos de feijão, e sua ação catalítica foi verificada através da oxidação da dopamina. A quantificação do tiodicarbe foi determinada através da inibição enzimática, usando a técnica eletroanalítica de onda quadrada.

Zeraik e colaboradores<sup>61</sup> desenvolveram um procedimento de purificação de peroxidase de batata doce e um *spot test* para determinação qualitativa de peroxidase nas frações eluídas de uma coluna cromatográfica por exclusão molecular contendo Sephadex G-100. Ao final do processo de pré-purificação, obtiveram um fator de purificação dessa enzima de 8,57 vezes.

Com base do fundamento teórico aqui apresentado, este trabalho apresenta o desenvolvimento de sensores para a determinação do herbicida hexazinona, visando obter sensores com alta detectabilidade e seletividade.

## **1.6. OBJETIVOS**

### **1.6.1. Geral**

O objetivo deste trabalho é desenvolver sensores eletroquímicos com alta detectabilidade e seletividade para a determinação do herbicida hexazinona.

## **1.6.2. Específicos:**

- 1.6.2.1. Desenvolver, otimizar e aplicar um sensor biomimético a base de polímero de impressão molecular. Para tal, a síntese de obtenção do MIP deverá ser otimizada através de simulações teóricas para encontrar o monômero funcional mais adequado para a síntese do MIP. O material obtido será adequadamente otimizado, através da caracterização do polímero usando diversas técnicas como MEV, FTIR, estudos de porosidade e experimentos de afinidade. E a seguir, usado na construção de sensor para detecção direta de HXZ, para o qual deverão ser otimizadas as variáveis analíticas e de construção do sensor.
  
- 1.6.2.2. Desenvolver e otimizar biossensores à base da enzima peroxidase extraída de licor de açaí. Para isto, será otimizado um processo inédito da extração e purificação da enzima POD do extrato de açaí do tipo A, e a seguir será avaliada a atividade enzimática da enzima no extrato purificado. Uma vez obtido o extrato já caracterizado, serão construídos biossensores immobilizando esse extrato, e otimizando o tipo de eletrodo, o tipo de imobilização, o tipo de substrato enzimático, e as condições de análise para obter a melhor resposta para HXZ através do processo de inibição enzimática.

# CAPÍTULO 2

## 2 - PARTE EXPERIMENTAL

---

### 2.1. Aparelhagem e instrumentação básica

As medidas de volume foram efetuadas com micropipetas Eppendorf<sup>®</sup> (10 – 100  $\mu\text{L}$ ) e (100 – 1000  $\mu\text{L}$ ). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica (Mettler-Toledo<sup>®</sup>) que possui calibração externa e tara automática, possibilitando pesagens rápidas e precisas.

O pH das soluções tampão foi medido com pH-metro da Thermo Scientific<sup>®</sup> (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA) empregando um eletrodo de vidro combinado.

As vidrarias empregadas neste trabalho foram previamente lavadas com uma solução de HCl 10% (v/v) por 24 h e posteriormente enxaguadas com água deionizada ( $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA).

### 2.2. Reagentes e soluções

Os reagentes usados para este trabalho foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada obtida do sistema descrito em 2.1.

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os agrotóxicos atrazina, s-atrazina, simazina e hexazinona (HXZ); como monômeros funcionais (MF) foram usados o ácido acrílico (AC), ácido metacrílico (AMA), acrilamida (AA) e 2-vinilpiridina (2VP), agente de ligação cruzada etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), e



como iniciador radical 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN, 98% sigma), todos da Sigma-Aldrich®. Os solventes usados foram tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano e ácido acético da Tedia® (Rio de Janeiro, Brasil); metanol, acetonitrila, tolueno, clorofórmio e a dimetilformamida (DMF) da VETEC®. Para a elaboração do biossensor de tecido vegetal da polpa de açaí, foram utilizados, os solventes acetona, etanol, os reagentes foram: dihidrogênio fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), o acetato de sódio, peróxido de hidrogênio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e o hidróxido de sódio foram da Synth®; ácido fosfórico da Mallincrodt®, Azul Brilhante de Coomassie G-250 (Vetec), gel Sephadex G-100, solução de guaiacol, polivinilpirrolidona (PVP), BSA (Albumina bobina) também foram usados óleo mineral; grafite em pó, glutaraldeído (25% m/v); e cistamina.

## **2.3. Preparo das soluções utilizadas**

### **2.3.1. Solução estoque da Hexazinona (HXZ)**

Para o biossensor do açaí a solução estoque do analito foi preparada pela dissolução de 3,0 mg de HXZ em 5 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0), esta mistura foi submetida a agitação até total solubilização, a solução resultante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10,0 mL tendo seu volume completado com a mesma solução tampão. Obtendo-se solução de concentração na faixa de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

Para o sensor biomimético e para avaliar a capacidade de adsorção do MIP as soluções de estoque do analito foram preparadas em dimetilformamida e metanol, respectivamente.

### **2.3.2. Solução tampão fostato pH 6,0**

Preparada pela dissolução do  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  em água destilada fim de obter uma solução  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , o preparo dessa solução foi através do recomendado pela tabela de Gomori.

### **2.3.3. Solução de guaiacol $0,4 \text{ mol L}^{-1}$**

A solução de guaiacol em concentração de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizada para determinação da atividade da enzima peroxidase (POD), foi preparada a partir da diluição de 4,97 g deste reagente (Merck;  $\rho = 1,1287 \text{ g L}^{-1}$ ; 98% v/v) em 100,0 mL de água deionizada contendo 0,1% (v/v) de etanol.

### **2.3.4. Solução de peróxido de hidrogênio**

A solução de peróxido de hidrogênio para a determinação da atividade da peroxidase, foi preparada a partir da diluição de 1,0 mL de solução concentrada de peróxido de hidrogênio (Reagen<sup>®</sup>, 31% m/m) em 8,0 mL de solução tampão fostato pH 7, e a seguir foi feita a dosagem da concentração real no espectrofotômetro a 230 nm, usando como coeficiente de extinção molar o valor  $80 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e caminho óptico de 1 cm.

### **2.3.5. Solução de azul brilhante de Coomassie**

A solução de azul brilhante de Coomassie G-250 (Vetec<sup>®</sup>) utilizada na determinação de proteínas totais pelo método de Bradford<sup>62</sup>, foi preparada a partir da solubilização de 50,0 mg deste reagente em 50 mL de ácido fosfórico (Synth<sup>®</sup>) e posterior diluição desta solução em 500,0 mL de água deionizada.

### **2.3.6. Preparo do gel Sephadex G-100 (30 a 80 kD)**

O gel Sephadex<sup>60</sup> G-100 (30 a 80 kD) empregado na coluna cromatográfica foi preparado da seguinte forma: a 35 g de Sephadex G-100 foram adicionados 700 mL de solução tampão fosfato 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0) preparados com água destilada deareada. Depois de homogeneizada, a mistura foi mantida em repouso por 12 h para estabilização do gel formado. Uma coluna de vidro (70 x 2,5 cm) foi então preenchida com 500 mL do gel de Sephadex, sendo utilizado algodão e gaze, na extremidade inferior da coluna, para controlar o fluxo e reter o gel na coluna.

### **2.3.7. Solução dos agrotóxicos usados no estudo de interferentes**

Para o estudo da seletividade foi pesada uma massa equivalente à quantidade necessária para preparar soluções com concentração na faixa de (1,0 x 10<sup>-3</sup> a 1,0 x 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) de cada um dos agrotóxicos.

### **2.3.8. Obtenção e preparação das amostras ambientais**

Foram coletadas amostras de água utilizadas na irrigação de plantação de cana oriunda de um sítio localizado na cidade de Araraquara no Estado de São Paulo, as amostras foram enriquecidas com HXZ na faixa de concentração de  $1,0 \times 10^{-1}$  a  $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e a seguir, analisadas pelo sensor biomimético proposto para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.

## **2.4. Extração da peroxidase da polpa de açaí e purificação parcial**

O açaí (*Euterpe oleraceae* Mart)<sup>28</sup> foi proveniente do estado do Pará e obtido em supermercado local da cidade de Belém – PA. Uma massa de 20 g da polpa de açaí foi homogeneizada por 5 min em um liquidificador com 60 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0), contendo 2,0 g de PVP. Em seguida, o homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 18000 rpm durante 15 min, a 4 °C. O filtrado obtido foi armazenado em frasco âmbar a 4 °C, até seu uso. Obtendo-se assim o extrato concentrado.

### **2.4.1. Purificação parcial da POD – Cromatografia por exclusão molecular em gel Sephadex G-100**

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento de purificação de peroxidase da polpa de açaí, para determinação qualitativa da peroxidase nas frações eluídas de uma coluna cromatográfica contendo Sephadex G-100.

Os extratos brutos de açaí foram submetidos à cromatografia em coluna de gel Sephadex G-100 (46 x 1,2 cm), previamente equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. As amostras foram eluídas com o mesmo tampão, coletando-se frações de 2,0 mL por cada tubo de ensaio. Os eluatos foram monitorados por espectroscopia de UV/VIS, com leitura da absorbância em 280 nm para detecção de proteínas e 470 nm para determinação da cinética enzimática da peroxidase. Antes da eluição da amostra o perfil de eluição da coluna cromatográfica foi checado com a eluição do padrão *blue dextran* com leituras a 620 nm.

Foram feitos ensaios preliminares com diferentes diluições do extrato bruto, foi escolhida a diluição 1/10 por que deu uma boa separação dos picos quando monitorados por espectroscopia de UV/VIS, com leitura da absorbância em 280 nm para detecção de proteína. A amostra enzimática foi preparada realizando uma diluição de 1/10 do extrato concentrado, e 2,5 mL dessa diluição foi aplicada e eluída em coluna Sephadex G-100 (28 x 0,8 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), coletando-se automaticamente 95 frações de 2,0 mL por tubo de ensaio. Os eluatos foram seguidos através de leituras da absorbância à 280 nm no espectrofotômetro UV/VIS com detector de arranjo de diodos Modelo HP 5452 A, acoplado a uma “Chem Station”, para determinação de

picos de proteínas. Os tubos contendo proteínas foram analisados quanto à atividade enzimática.

## **2.4.2 Análise qualitativa para detecção de peroxidase e polifenoloxidase**

Para o teste qualitativo da presença de POD nas frações do extrato bruto de açaí eluídas na coluna Sephadex G-100, foram utilizadas solução de guaiacol  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em etanol 0,1% (v/v). Para detectar a polifenoloxidase foi utilizado catecol  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como substrato da enzima. As amostras foram incubadas por 40 minutos para acompanhamento da reação enzimática a cada 5 minutos, até a formação ou não de coloração no tubo. Para ambos os testes foram feitos controles negativos. O aparecimento de uma coloração marrom avermelhada indicou a presença da enzima peroxidase. Nessas frações a seguir foi monitorada a presença de proteínas por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm.

## **2.4.3. Determinação das constantes cinéticas $K_{MM}$ e $V_{max}$ para a POD extraída de açaí**

Para a obtenção das constantes cinéticas  $K_{MM}$  e  $V_{max}$  da enzima POD extraída do açaí, foi monitorada a cinética da reação em diferentes concentrações de substrato guaiacol obtendo-se assim os valores da velocidade inicial ( $v_0$ ) em função de cada concentração do substrato estudada. Através do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver–Burk foram determinadas as referidas constantes.

#### **2.4.4. Determinação da Atividade Enzimática**

O cálculo da atividade da enzima peroxidase nos extratos de açaí baseou-se no método de Khan e Robinson.<sup>63</sup> Para isto, em uma alíquota de 1,1 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7) foram adicionados 0,8 mL de guaiacol 0,04 mol L<sup>-1</sup> e 50 µL do extrato enzimático proveniente da pré-purificação após a homogeneização dessa solução, adicionaram-se a seguir 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,005 mol L<sup>-1</sup>. O aumento da absorbância a 470 nm, tendo o guaiacol como substrato, nas condições de ensaio previamente determinadas foi monitorado durante 2 minutos de reação a 25 °C, contra um branco, no qual a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi substituída pelo tampão.

A determinação da atividade enzimática da POD (UA mL<sup>-1</sup>) nas frações purificadas do extrato bruto de açaí foram feitas em triplicatas, utilizando-se amostras do extrato enzimático diluído, calculadas pela adaptação do método a partir dos princípios adotados por Clemente e colaboradores<sup>64</sup> onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que provoca um aumento na absorbância de 0,001 unidades por minuto, tendo o guaiacol como doador de elétrons. As leituras de absorbâncias foram realizadas a 470 nm, nas condições de ensaios previamente determinadas.

## 2.5. Simulação computacional empregada na escolha do monômero funcional para síntese do MIP para hexazinona

Para a obtenção de MIP altamente seletivos, é reconhecido que a interação entre o monômero funcional e o *template* é um dos fatores cruciais na síntese satisfatória destes materiais.<sup>65-67</sup> Desta forma, as simulações computacionais realizadas focaram-se na obtenção da informação que indicasse a maior afinidade entre o agrotóxico e diversos monômeros comercialmente disponíveis e que são comumente empregados na síntese de MIP para diferentes analitos. Para isto, foram empregados os seguintes programas:<sup>65,66</sup> **1) HyperChem® 8.0.5:** utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs. **2) OpenEye®** (pacote de *softwares*) contendo os programas: A) *VIDA 3.0.0:* Utilizados para visualizar as moléculas modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos. B) *Omega2:* Gera diversos confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros de cada pesticida, sendo escolhidos 03 deles ao acaso para realizar os testes simulatórios. C) *Szybki 1.2.2:* Programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portando, mais estável. **3) Autolt 3.3.6.0:** Aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos. **4) Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009:** Utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos.



MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

Assim, foram avaliados os 20 monômeros mostrados na Tabela 3 os quais foram nomeados de MP1 a MP20 para fins de simplicidade de análise dos resultados.

**Tabela 3. Monômeros comumente usados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.**

<b>Sigla</b>	<b>Monômero</b>
MP1	<i>bis</i> -acrilamida de <i>N,N</i> -metileno
MP2	Ácido imidazol-4-acrílico
MP3	Etil éster de imidazol-4-acrílico
MP4	Ácido acrílico
MP5	Acrilamida (AA)
MP6	Acroleína
MP7	Alilamina
MP8	Acrilonitrila
MP9	Etileno glicol dimetacrilato
MP10	2-(cianoetilamino)etilmetacrilato
MP11	Ácido metilenosuccinico
MP12	Ácido metacrílico (AMA)
MP13	3-divinilbenzeno
MP14	4-divinilbenzeno
MP16	1-vinilimidazol
MP17	2-vinilpiridina (2-VP)
MP18	4-vinilpiridina
MP19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico
MP20	2-hidroxietil metacrilato

## 2.6. Sínteses dos MIP

Os MIP para o herbicida hexazinona, foram sintetizados de acordo com o trabalho de Turner onde as interações entre analito e o monômero funcional (MP) foram de natureza não-covalente. Para a síntese por *bulk* empregou-se um tubo de ensaio de 10 mL de capacidade, no qual foram adicionados o solvente porogênico, o analito e o monômero funcional. A solução foi então homogeneizada por 10 minutos para permitir a interação entre o MP e o analito. Posteriormente, adicionou-se o agente de ligação cruzada (EGDMA) e o iniciador radical (AIBN). Antes do aquecimento o tubo de reação foi purgado com nitrogênio por 5 min. Essa etapa foi necessária para promover a eliminação de oxigênio uma vez que o mesmo causa problemas devido à formação de radicais livres que inibem a polimerização.<sup>58</sup> Terminada a etapa, o frasco reacional foi selado e colocado em um banho termostatizado a 60 °C. A temperatura favoreceu a reação que se processou por um período de 24 h. Após a completa polimerização, os tubos de ensaio foram quebrados e os polímeros triturados mecanicamente empregando um almofariz e pistilo. Fez-se uma seleção do tamanho das partículas empregando-se uma peneira de 100 mm de malha. A remoção do analito bem como dos reagentes remanescentes da síntese foram feitas através de extrator soxhlet com solução de metano/ácido acético 9:1 (v/v) por intervalo de 48 h. Por fim, os polímeros foram secos a 60 °C e estocados a temperatura ambiente.

Outro polímero a base de monômero funcional foi também sintetizado para ser empregado como controle. A síntese deste polímero seguiu o mesmo procedimento anterior, mas sem adição do analito, obtendo-se o respectivo NIP

(*non-imprinted polymer*). Foi realizada também a síntese do MIP para hexazinona usando radiação UV.

Para a síntese por precipitação empregou-se tubos de ensaio de 30 mL de capacidade, a metodologia é análoga à polimerização em *bulk*, a diferença é que nesta síntese utiliza-se excesso de solvente, obtendo-se assim uma mistura mais diluída, como consequência, as cadeias poliméricas em formação não são capazes de ocupar o volume total do solvente, produzindo uma dispersão de partículas esféricas na solução.

A seguir na Tabela 4 são apresentadas as quantidades dos reagentes e os métodos de síntese empregados para obtenção dos MIP avaliados nesta Tese. Conforme apresentado na Tabela 4, a síntese dos polímeros foi feita empregando-se a relação molar entre a molécula molde e o monômero funcional de 1:4. Este excesso de monômero tem como objetivo garantir que o mesmo possa interagir com todos os sítios disponíveis da molécula molde (*template*), favorecendo a formação das cavidades impressas. Além disso, as interações formadas pela molécula molde e o monômero funcional são responsáveis pela formação de um complexo pré-polimérico, que ocorre durante a reação de polimerização,<sup>62,64</sup> conforme mostra a Figura 12.

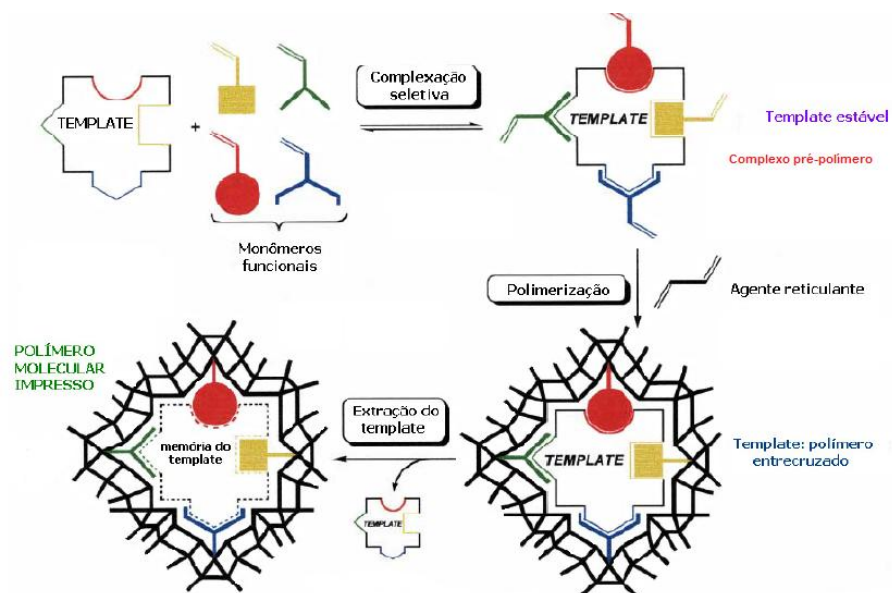


Figura 12. Representação esquemática do processo de formação do MIP.

Tabela 4. Quantidade de reagentes e métodos empregados na síntese dos polímeros para 0,1 mmol de hexazinona.

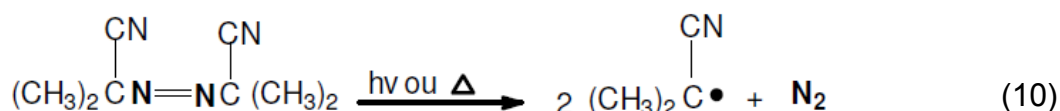
Polímero MIP	Solvente porogênico, volume e polimerização	Monômero Funcional (mmol)	Reagente de ligação cruzada (mmol)	Iniciador radicalar (mmol)	Forma de polimerização
MIP5	Diclorometano, 10 mL, <i>bulk</i>	AA (0,4)	EGDMA (2,0)	AIBN (0,1)	Aquecimento em banho de água 60 °C
MIP 5	Diclorometano, 10 mL, <i>bulk</i> e 20 mL, precipitação	AA (0,4)	EGDMA (2,0)	AIBN (0,1)	Aquecimento lâmpada UV (366 nm, 20 W)
MIP 12	Tolueno, 10 mL, <i>bulk</i> e 20 mL precipitação	AMA (0,4)	EGDMA (2,0)	AIBN (0,1)	Aquecimento em banho de água 60 °C
MIP 17	Tolueno, 10 mL, <i>bulk</i> e 20 mL precipitação	2-VP (0,4)	EGDMA (2,0)	AIBN (0,1)	Aquecimento em banho de água 70 °C

AMA: ácido metacrílico, AA: Acrilamida, 2-VP: 2-Vinilpiridina, EGDMA: etileno glicoldimetacrilato, AIBN: 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila. MIP codificação do polímero obtido.

O agente de ligação cruzada, o etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA) Figura 7, apresenta duas unidades vinílicas. Estes grupos vinílicos são reativos frente a radicais livres, cátions ou ânions e formam espécies de transição que podem ser adicionadas à duplas ligações. Tal processo gera um novo centro ativo e a repetição sucessiva do mesmo permite a formação do polímero.<sup>37</sup>

Assim, o EGDMA atua como um monômero estrutural uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação, por isto, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação à quantidade de monômero funcional, a fim de que a estabilidade mecânica do material seja garantida.<sup>36</sup> Com base nisto, foi utilizada a relação molar entre a molécula molde:monômero funcional:monômero estrutural de 1:4:20, uma vez que a mesma tem sido rotineiramente empregada em impressão molecular.<sup>36,39</sup>

A iniciação do processo de polimerização somente é possível quando radicais livres estão presentes no meio reacional. Estes, por sua vez, iniciam o mecanismo de síntese que ocorre por via radicalar.<sup>36,47,48</sup> Neste sentido, a presença do iniciador 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) fez-se necessária uma vez que esta substância sofre reação de homólise por irradiação (através de uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão em 345 nm) ou por aquecimento a 65 °C para gerar os radicais livres requeridos, conforme mostra a reação 10, a seguir.



## **2.6.1. Caracterização dos polímeros de impressão molecular MIP e NIP**

### **2.6.1.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MIP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Para isto, as medidas foram realizadas em um equipamento MEV da JEOL modelo JSM 7500F. As amostras primeiramente foram dispersas em álcool isopropílico, logo foram colocadas no STUB que continha o substrato de silício, que tem como finalidade dar o devido contraste, logo foi colocada cola de grafite, e a seguir foram colocados os STUB no porta-amostra do microscópio eletrônico de varredura, para realizar as medidas.

### **2.6.1.2. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO**

As análises de caracterização dos polímeros por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no instituto de química da UNESP, utilizando o equipamento Varian® 660-IR FT-IR Spectrometer com aplicação direta na amostra.

### 2.6.1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS POR EXPERIMENTOS DE AFINIDADE

Para avaliar a capacidade de adsorção do MIP obtido, foram realizados experimentos estáticos de adsorção. Para isto, 5 mg de polímero foram adicionados a um frasco pequeno, contendo 5,0 mL de soluções padrão de hexazinona em concentrações entre 2,0 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Após terem sido agitadas durante 12 h à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e filtradas. A seguir, a concentração hexazinona livre no filtrado foi quantificada por HPLC. Para isto, antes de cada análise o sobrenadante foi filtrado em membrana Milipore<sup>®</sup> 0,45 µm. A adsorção de hexazinona com NIP também foi medida de maneira semelhante.

Os experimentos em HPLC foram realizados usando um sistema cromatográfico da Shimatzu<sup>®</sup> com detector UV e injeção automática. As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático com fase móvel composta por água e acetonitrila (60:40 v/v) usando coluna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex<sup>®</sup> e fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> com injeção de 20 µL à temperatura ambiente (25 °C) usando detector de UV em 220 nm. As soluções padrão de HXZ e dos interferentes foram preparadas em metanol.

Desta forma, foi possível determinar a quantidade de HXZ ligada no polímero ( $Q$ , mmol g<sup>-1</sup>) subtraindo a concentração livre de HXZ ( $C$ ) da concentração inicial ( $C_0$ ), considerando o  $V$  de solvente e a massa de polímero, permitindo desta forma, construir as isotermas de adsorção apresentadas no 3º Capítulo desta Tese.

## **2.7. Construção dos sensores**

### **2.7.1. Construção do biossensor à base de extrato vegetal de açaí**

#### **2.7.1.1. BIOSSENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA**

O biossensor, nas condições otimizadas foi preparado misturando-se por 15 minutos, 250 mg de grafite em pó com 200 Unidades por mL de extrato-fosfato do licor de açaí e 1 mL de glutaraldeído ao 2,5% (m/v) preparado em tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0). A mistura foi deixada secar à temperatura ambiente por 12 h e a pasta de carbono modificada foi obtida pela adição de 80 mg de óleo mineral. Uma porção adequada da pasta foi tomada para preencher a cavidade de 4 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, de um eletrodo adequado para o uso de pastas de carbono.

#### **2.7.1.2. BIOSSENSOR À BASE DE MONOCAMADAS AUTOARRANJADAS (SAM) EM SUPERFÍCIE DE OURO**

Foram empregados eletrodos de ouro de 4 mm de diâmetro. A limpeza da superfície dos eletrodos de ouro foi realizada em três etapas: polimento mecânico, tratamento químico e limpeza eletroquímica. Inicialmente as superfícies foram polidas com uma suspensão aquosa de alumina de 0,3 e 0,05  $\mu\text{m}$  sobre uma flanela até adquirir aspecto espelhado, logo foram lavadas com água deionizada. Em seguida foram colocadas em um banho ultrassônico em água por 1 minuto, para eliminar resíduos de alumina da superfície do eletrodo. Após desta limpeza



mecânica, o eletrodo foi submetido a um tratamento químico através da imersão do eletrodo em uma solução “piranha” por um período de 2 minutos, seguido de lavagem com água deionizada. Após este tratamento químico o eletrodo foi limpo eletroquimicamente usando voltametria cíclica e em uma solução de ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  entre os potenciais  $0,0$  e  $1,7 \text{ V vs Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat}}$  e velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , até que os voltamogramas cíclicos característicos para um eletrodo de ouro limpo fosse obtido.<sup>67,68</sup> Após o pré-tratamento da superfície do eletrodo de ouro a construção do biossensor foi realizada com a modificação do eletrodo com  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  cistamina por um período (tempo de incubação,  $t_{\text{incub}}$ ) de 2h. O eletrodo modificado foi então retirado da solução de tiol, lavado com água e seco à temperatura ambiente. Após a formação da SAM de cistamina, 50 unidades por mL de peroxidase extraída do licor de açaí foram depositadas com auxílio de uma micropipeta na sua superfície. A seguir, o sensor foi seco à temperatura ambiente e logo foi mergulhado por uma hora em uma solução de glutaraldeído ao 2,5% (v/v) e seco a temperatura ambiente e armazenado à temperatura ambiente.

### **2.7.2. Construção do sensor biomimético à base de polímero de impressão molecular**

O eletrodo de pasta de carbono (CPE) que serviu para comparação dos resultados obtidos foi preparado misturando o pó de grafite e óleo mineral na proporção 60/40 (m/m). O sensor biomimético a base de polímero de impressão molecular foi preparado pela mistura de diferentes porcentagens de pó de grafite, óleo mineral e MIP ou NIP, estas misturas foram homogeneizadas por 10 minutos em almofariz de ágata, e a mistura colocada na cavidade do eletrodo adequado para

pasta de carbono de 4 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade. A superfície do eletrodo foi polida usando papel sulfite. O sinal eletroquímico destes eletrodos foi estudado usando a técnica de voltametria cíclica e os melhores resultados foram obtidos com a proporção 67:28:5 (m/m) de pó de grafite, óleo mineral e MIP ou NIP, esta pasta otimizada foi usada para a determinação eletroquímica da hexazinona.

## **2.8. Medidas eletroquímicas**

### **2.8.1. Medidas eletroquímicas para os biossensores à base de pasta de carbono e eletrodo de ouro – SAM**

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um micropotenciostato da Autolab<sup>®</sup> utilizando-se cela eletroquímica convencional de três eletrodos empregando como eletrodo de referência o de Ag|AgCl, KCl<sub>sat</sub>, uma espiral de Pt como eletrodo auxiliar e como eletrodos de trabalho o biossensor de pasta de carbono à base de licor de açaí e o eletrodo de ouro com monocamada de tiol. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -0,3 a 0,9 V e velocidade de varredura de 0,02 V s<sup>-1</sup>; e, voltametria de onda quadrada, nas condições otimizadas, em potencial de -0,2 a 0,2 V, frequência de 20 Hz, amplitude de 100 mV, incremento de 10 mV. Todas as medidas foram realizadas em 10,0 mL de eletrólito suporte de solução tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 5,0) contendo 3,9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. Alíquotas de solução padrão de hexazinona foram transferidas para a cela através de micropipeta, e após de um período de agitação de um minuto, para a homogeneização da solução, os voltamogramas foram registrados. Após o registro dos voltamogramas, foi construída

uma curva analítica, e realizados os estudos de recuperação e determinação de hexazinona em amostras de rio usando o método de adição padrão.

### **2.8.2. Medidas eletroquímicas para o sensor biomimético à base de pasta de carbono modificado com polímeros de impressão molecular (MIP)**

Um volume de 10,0 mL de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl (pH 2,5) foi usada na célula electroquímica, como eletrólito suporte. A solução foi purgada com nitrogênio puro durante 10 minutos. E a seguir, foi aplicado um potencial de acumulação de -0,5 V ao eletrodo durante 200 seg, ao mesmo tempo em que a solução era agitada. A agitação foi então cessada, e depois de 10 s de descanso, foram registrados voltamogramas de pulso diferencial na faixa de potencial de -0,6 a -1,4 V. Em seguida, um volume adequado de solução padrão de HXZ, ou de amostra, foi adicionada à célula voltamétrica, a solução foi purgada com nitrogênio durante 3 minutos e depois de 200 s de acumulação a -0,5 V, o voltamograma foi registrado.

O limite de detecção foi calculado através da relação 3S/N onde S/N corresponde à razão sinal/ruído da medida. Já o limite de quantificação foi calculado como 3,3 vezes o limite de detecção.

# CAPÍTULO 3

## ***3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

### **3.1. Biossensores à base de peroxidase extraída da polpa de açaí**

#### **3.1.1. Extração e purificação da POD obtida do extrato de açaí**

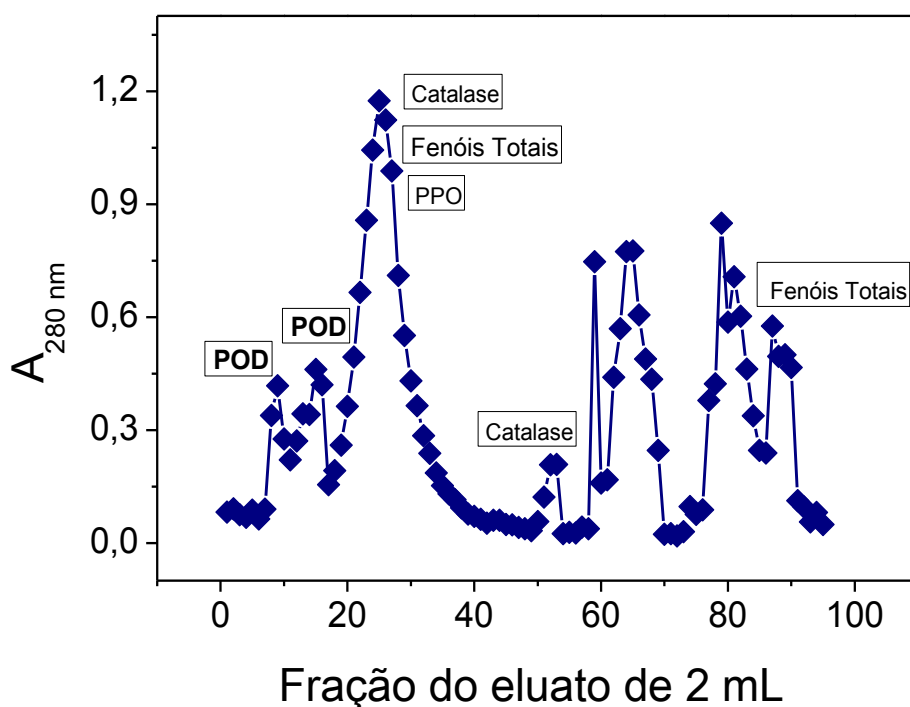
##### **3.1.1.1. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA POD POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA EM GEL SEPHADEX G-100**

Para a obtenção das frações da enzima purificada eluídas na coluna cromatográfica em gel sephadex G-100, foram realizados testes de extração do extrato bruto de açaí em  $\text{g mL}^{-1}$  de solução tampão, na proporção: 1:3, 1:5 e 1:10, determinando-se a concentração proteica ( $\text{g mL}^{-1}$ ) em cada diluição.

A melhor extração foi obtida na proporção 1/10 (v/v) com valores de absorvância entre 0,5 e 1,0. O extrato bruto de açaí na proporção 1/10 foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel Sephadex G-100, previamente equilibrada com solução tampão fosfato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e determinado o volume “morto” de separação com *blue dextran*. Foram coletadas frações de 2,0 mL por tubo de ensaio.

O perfil de eluição do extrato enzimático de açaí (Figura 13) revelou a presença de nove picos, em alguns foi possível identificar a presença de macro e micromoléculas, e em outros não. O primeiro e o segundo pico que estão na região das frações que correspondem ao “volume morto” correspondem principalmente à

presença de proteínas (macromoléculas com massa molecular (MM)  $\gg$  150.000 Da). Nessa mesma região foi detectada a presença da enzima peroxidase, alvo de estudo deste trabalho. O terceiro pico revelou a presença das enzimas polifenoloxidase e catalase fontes de investigação para construção de novos biossensores a base destas enzimas. O quarto pico também apresentou a presença de catalase, visto que, o seu *pool* quando submetido à reação catalítica na presença de peróxido de hidrogênio, liberou oxigênio em quantidade facilmente detectável. O nono pico revelado no cromatograma, mostrou a presença de moléculas com baixa massa molecular como fenóis totais, podendo conter compostos bioativos e outras micromoléculas.



**FIGURA 13.** Curva da cromatografia em Sephadex G-100 do extrato de açaí em tampão fosfato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 7,0, indicando as frações contendo a POD e as outras enzimas e componentes do extrato para 2,0 de eluato por fração, em um fluxo constante. Os eluatos do açaí foram acompanhados com leituras de absorbância em 280 nm.

A eluição em gel Sephadex G-100 propiciou uma separação bem definida entre macromoléculas e moléculas menores com  $MM < 150.000$ . O que possibilitou a purificação da enzima peroxidase e a determinação da sua atividade, sem a interferência de compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos.

### **3.1.1.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE $K_{MM}$ E $V_{MAX}$ DA POD CONTIDA NA POLPA DE AÇAÍ**

A atividade enzimática foi estimada frente ao peróxido de hidrogênio e guaiacol. A enzima apresentou afinidade para o guaiacol com um  $K_m$  de  $4,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e  $V_{max}$  de  $84 \text{ } \mu\text{mols s}^{-1}$ . Os dados correspondentes a estes estudos são mostrados na Figura 14. Os valores obtidos mostram uma boa afinidade da POD para o seu substrato (guaiacol), assim como mostra uma velocidade de reação máxima que indica que  $84 \text{ } \mu\text{mols}$  de guaiacol são convertidos em produto por cada segundo da reação.

### **3.1.1.3. DETERMINAÇÃO DO CONTEUDO PROTÉICO DO EXTRATO DE AÇAÍ E DAS CORRESPONDENTES DILUIÇÕES**

Sabe-se que a absorvância de um extrato vegetal é diretamente proporcional à concentração de proteína, até o limite da lei de Lambert-Beer. O cálculo do valor da concentração proteica das amostras foi realizado utilizando o coeficiente de absorvância, determinado por regressão linear ( $R = 0,9930$ ) da curva analítica de padrão proteico (Figura 15) soro albumina bovina (BSA), a saber, (eq. 2):

$$A_{540nm} = 1,1 \times 10^{-2} (\pm 8,0 \times 10^{-3}) + 1,4 \times 10^{-2} (\pm 5,3 \times 10^{-4}) C_{BSA} \quad (\text{eq. 2})$$

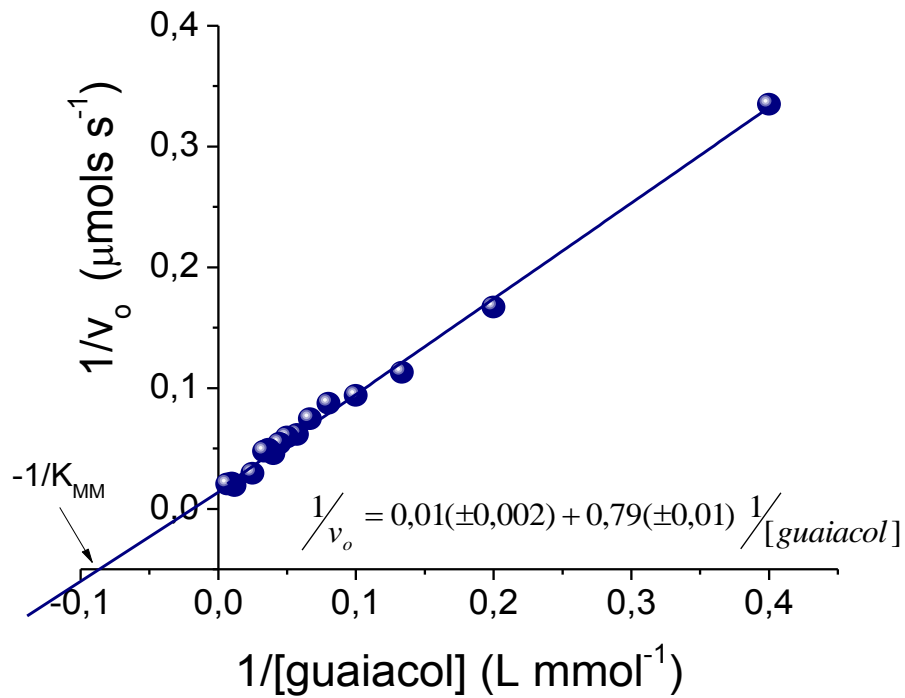


Figura 14. Gráfico de Lineweaver–Burk ou duplo recíproco para o extrato de licor de açaí em função do substrato guaiacol.<sup>63</sup>

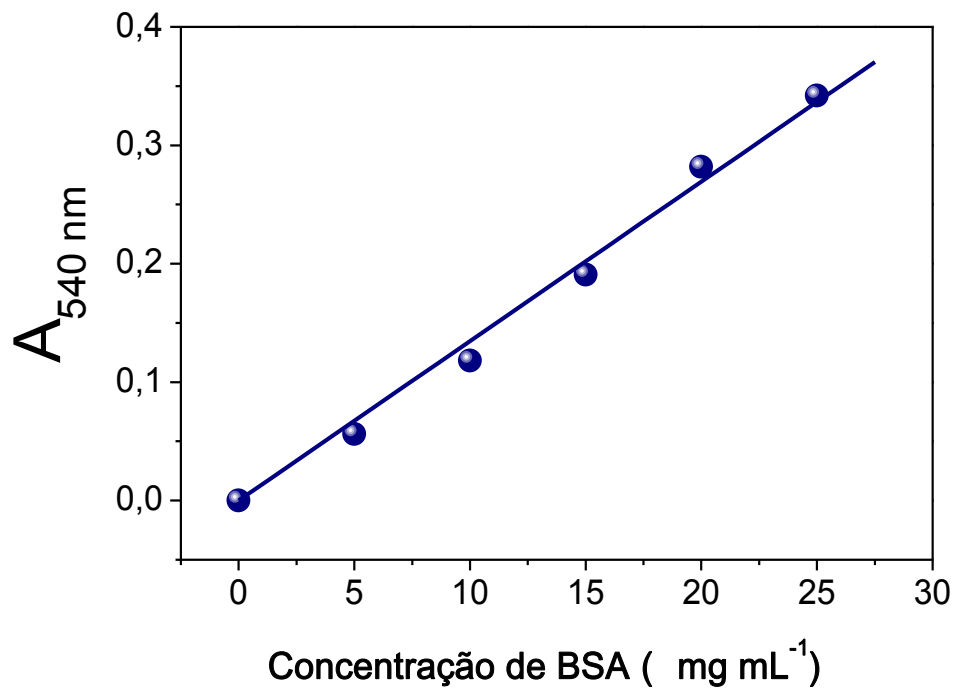


Figura 15. Curva analítica experimental para determinação do coeficiente de absorvidade molar da soro albumina bovina (BSA).



Através da curva foi determinado o conteúdo proteico das frações que deram teste positivo para a presença da enzima peroxidase.

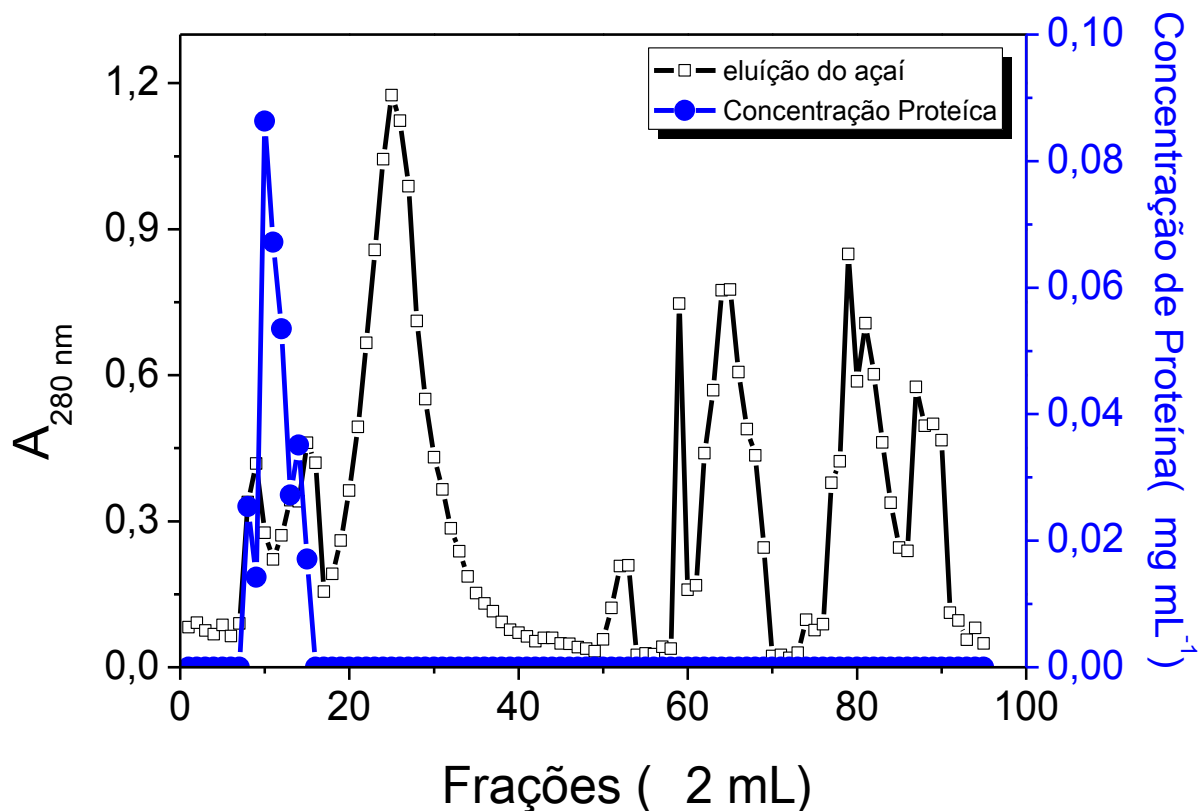


Figura 16. Cromatograma experimental para determinação das proteínas.

Em relação à concentração de proteína nas frações enzimáticas eluídas, o perfil de eluição mostrou que o conteúdo proteico encontra-se em 11 frações, entre as frações 08 a 18. Nota-se Figura 17 a presença de três picos com conteúdo proteico, porém, apenas o segundo pico apresenta maior concentração, destacando-se a fração 10 com  $8,63 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$ .

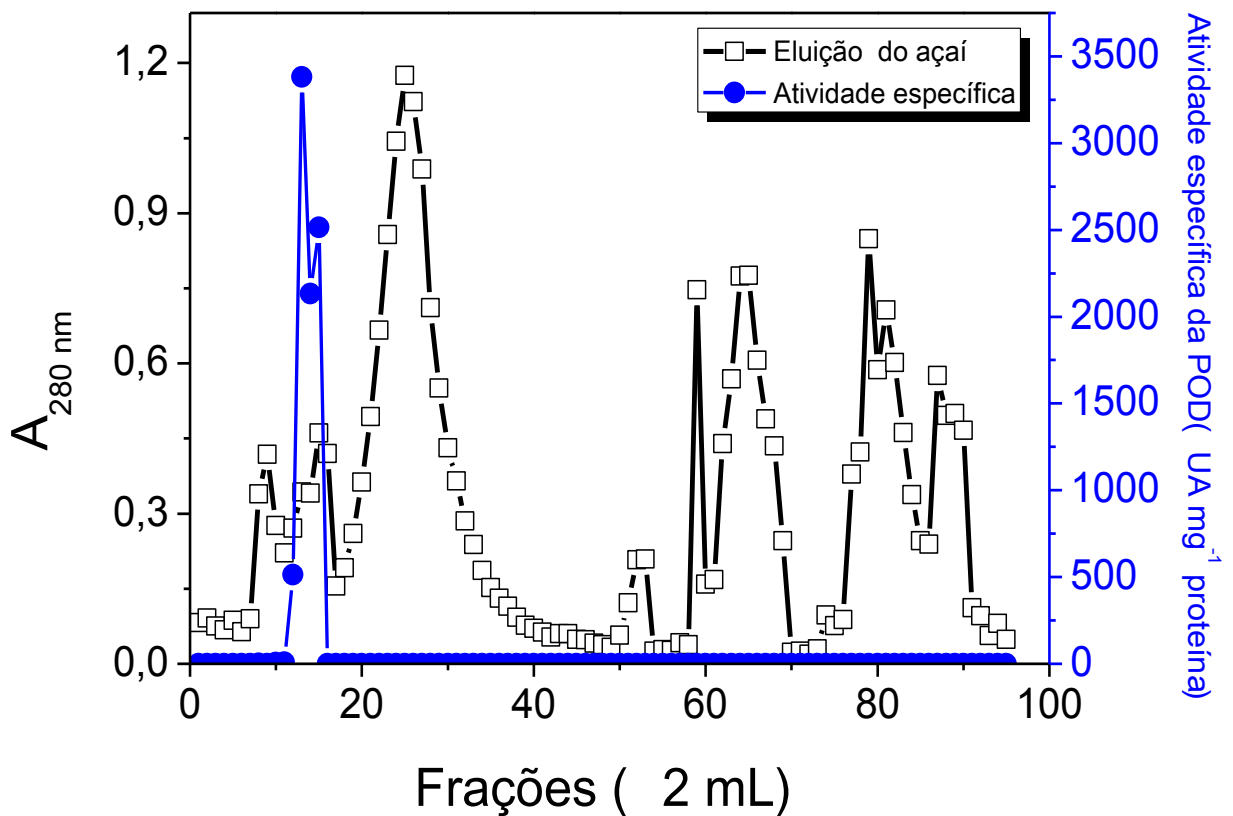


Figura 17. Perfil de eluição das frações enzimáticas e atividade específica de peroxidase extraída de açaí por cromatografia de exclusão molecular em coluna gel Sephadex G-100.

### 3.1.1.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO EXTRATO DE AÇAÍ E DAS CORRESPONDENTES DILUIÇÕES

Em cada fração que foi qualitativamente detectada a presença da peroxidase, foram realizados estudos cinéticos para determinação da unidade de atividade (UA mL<sup>-1</sup>) e atividade específica (UA mg<sup>-1</sup> de proteína) com leituras da absorbância em 470 nm. O perfil de eluição do extrato bruto de açaí revelou que a enzima peroxidase foi eluída em 11 frações, entre as frações 08 a 18 (Figura 13).

Como pode-se observar o perfil cromatográfico das frações enzimáticas mostra dois picos com alta atividade específica da peroxidase, destacando-se a fração 13 que apresentou maior atividade específica com 3,4 UA  $\text{mg}^{-1}$  de proteína

### **3.1.2. Aplicação da peroxidase extraída da polpa de açaí na construção de biossensores voltamétricos**

#### **3.1.2.1. BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA**

Na procura por um biossensor para detecção da hexazinona, nos estudos preliminares foi construído um sensor à base de pasta de carbono modificada com o extrato de açaí previamente caracterizado em relação ao teor de enzima POD. Este biossensor foi avaliado em relação à resposta mediada pelo doador de elétrons hidroquinona (HQ), a fim de verificar se a enzima POD extraída do açaí permitiria a obtenção de um biossensor enzimático com bom desempenho; se a enzima estava sendo devidamente imobilizada; e adicionalmente, evitar o uso não necessário de pesticida que poderia ser lançado ao ambiente durante os estudos de otimização do biossensor.

##### **a) Otimização dos parâmetros experimentais**

Como citado anteriormente, para investigar a possibilidade do uso da peroxidase extraída da polpa de açaí na construção de um biossensor com bom desempenho e que posteriormente possa ser usado na detecção da HXZ. A primeira etapa consistiu em avaliar a resposta mediada do biossensor à base de pasta de carbono modificada com extrato de açaí, frente ao composto fenólico HQ (reações 1

– 4). Para isto, a voltametria de onda quadrada (SWV) foi usada para avaliação do desempenho do biossensor.

Nesses estudos de otimização a influencia do pH foi estudada na faixa de 5,0 a 8,0; usando solução padrão de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de hidroquinona (HQ, substrato enzimático) e  $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio. A melhor resposta para o analito foi obtida no pH 6,5, usando para estes estudos solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada também foram estudados e otimizados: frequência (Figura 18, 10 – 70 Hz), amplitude de pulso (Figura 19, 10 – 120 mV) e incremento (Figura 20, 0,5 – 5,0 mV), sendo obtido o maior sinal analítico para os parâmetros ajustados em 40 Hz, 100 mV e 5 mV, respectivamente.

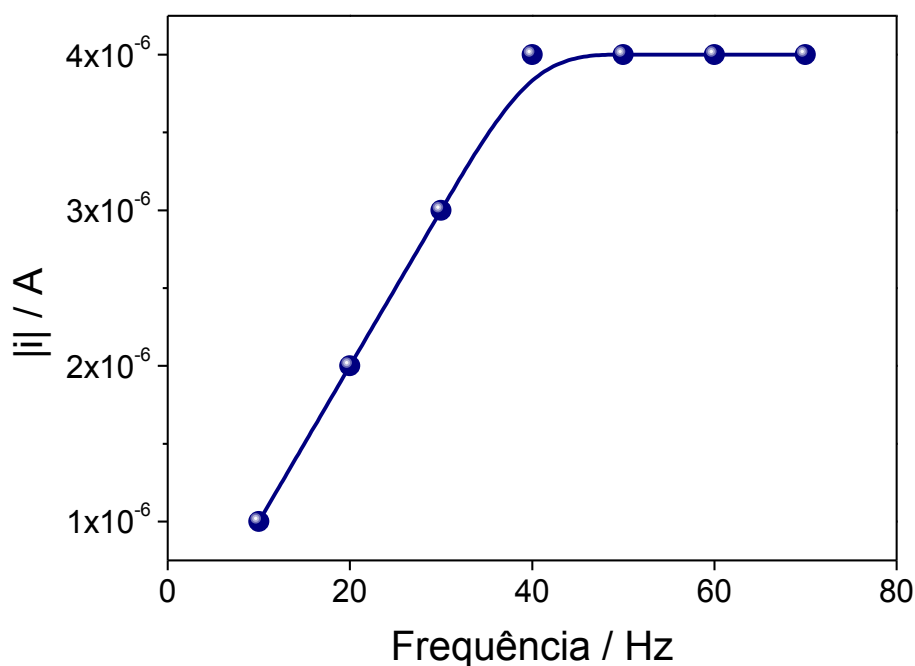


Figura 18. Otimização da frequência da SWV para o biossensor de hidroquinona.

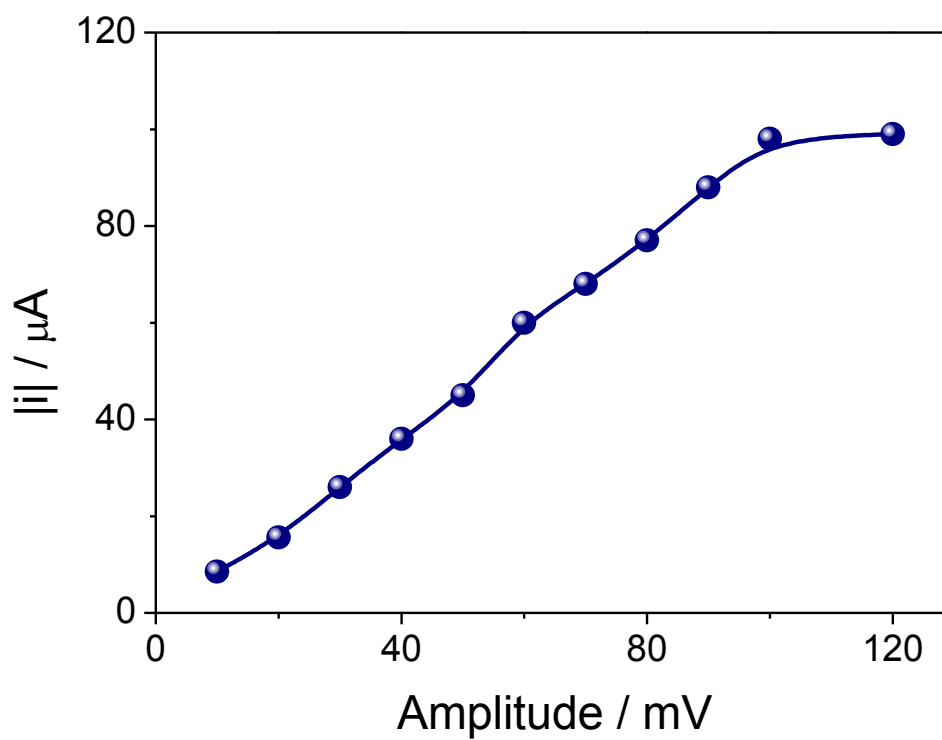


Figura 19. Otimização da amplitude de pulso na SWV para o biossensor de hidroquinona

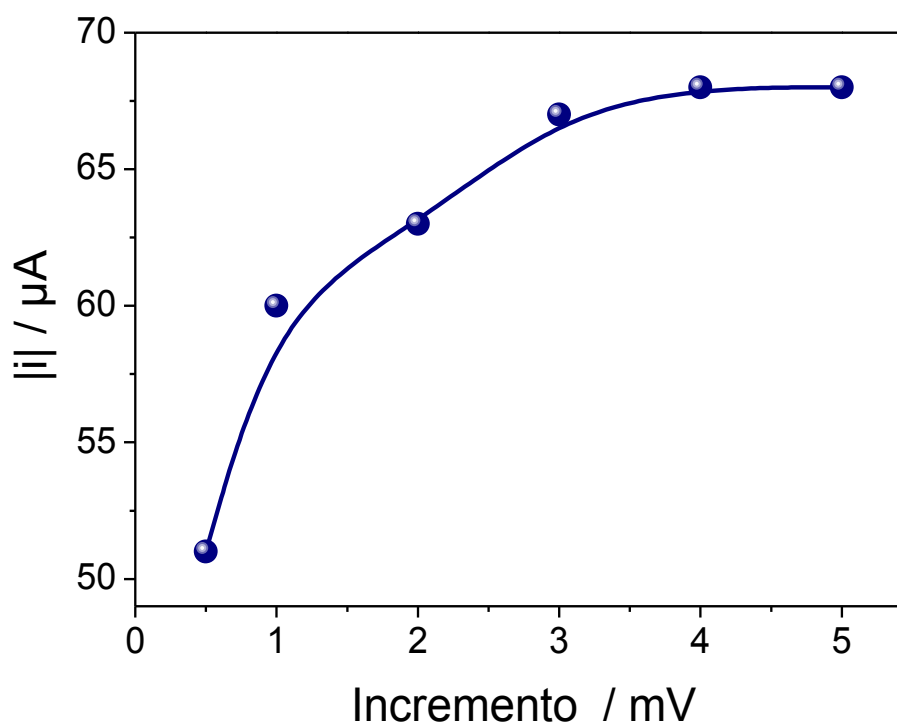


Figura 20. Otimização do incremento de pulso na SWV para o biossensor de hidroquinona.

## b) Perfil de resposta do biossensor para hidroquinona

Na Figura 21 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada nas condições otimizadas e obtidos com o biossensor à base de polpa de açaí.

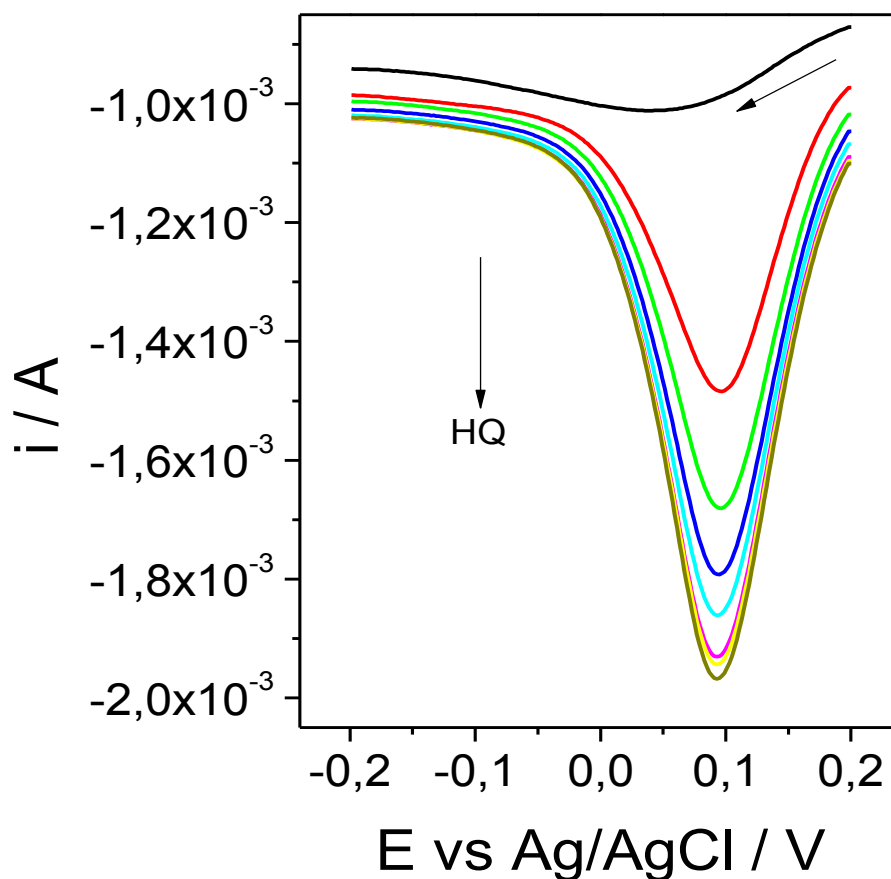


Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor à base de açaí e adições crescentes de hidroquinona, nas condições de pH e eletroquímicas otimizadas.

Na Figura 22 é mostrada a correspondente curva analítica obtida para hidroquinona, cuja quantificação foi baseada na regeneração da peroxidase pela oxidação do composto fenólico para quinona, com a subsequente redução da

quinona na superfície do biossensor a 0,1 V vs Ag|AgCl,KCl<sub>sat</sub> tal como previsto pelas reações (1 a 4) anteriormente apresentadas na parte introdutória.

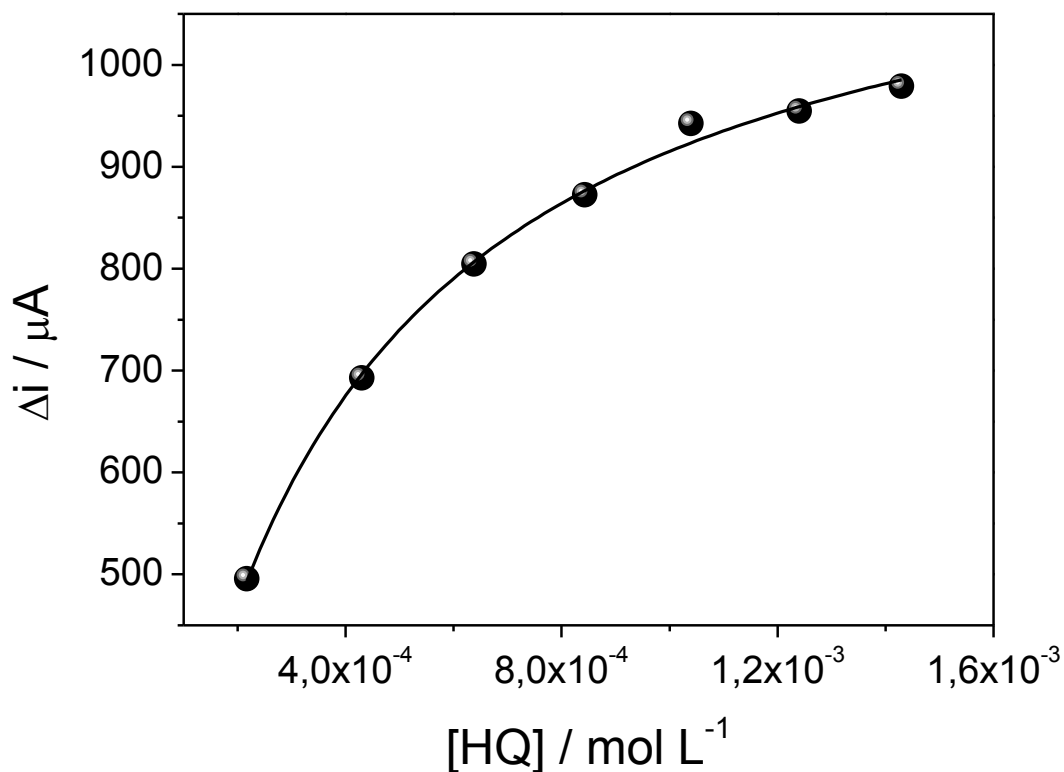


Figura 22. Curva analítica correspondente às adições de HQ até a concentração da saturação.

Observa-se da Figura 22, que o perfil de resposta do biossensor incluindo a região da saturação é hiperbólico (equação 3), tal como esperado para sistemas enzimáticos os quais são governados pela cinética de Michaelis-Menten, indicando que a enzima POD extraída do açaí mantém sua atividade mesmo após sua imobilização na pasta de carbono.

$$\Delta i = \frac{1.199 (\pm 14) [HQ]}{3,1 \times 10^{-4} + [HQ]} \quad (\text{eq. 3})$$

Nesta curva também observa-se uma região linear para HQ na faixa de  $7,5 \times 10^{-5}$  e  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , que se ajusta à equação:

$$\Delta i / \mu A = 299 (\pm 7) + 950.269 (\pm 21.548) [HQ] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{eq. 4})$$

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados sob as condições otimizadas, obtendo-se os valores de  $22 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $73 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Foi calculada também a constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_{MM}^{\text{app}}$ ) para o biossensor proposto, usando o gráfico do duplo recíproco (Figura 23), obtendo-se um valor de  $3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

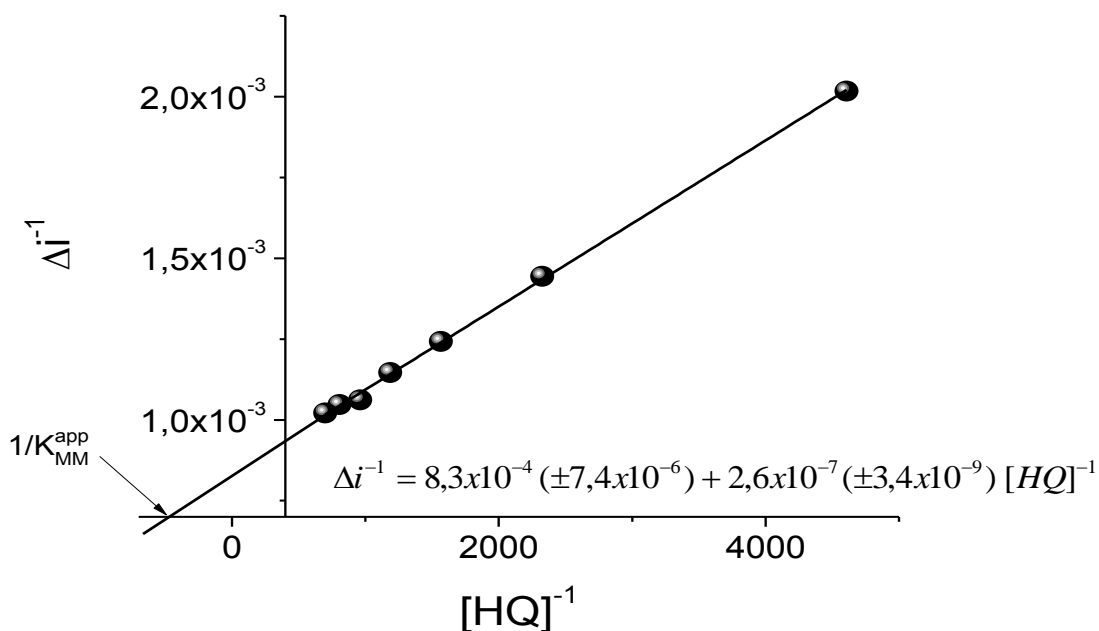


Figura 23. Gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco para o biossensor à base de licor de açaí para sua resposta mediada pela HQ.

Desta forma, o bom desempenho do biossensor desenvolvido com licor de açaí mostrou que a peroxidase proveniente deste extrato vegetal foi eficiente na



preparação do biossensor, e desta forma, este extrato vegetal poderia ser utilizado no desenvolvimento de outro biossensor para o analito alvo deste trabalho, a hexazinona.

### **3.1.2.2. BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO HEXAZINONA**

Nesta etapa do trabalho, uma vez avaliada a viabilidade de uso do extrato de açaí como fonte da enzima peroxidase, e visando obter sensores altamente sensíveis e duradouros foi construído um biossensor à base ouro modificado com monocamadas auto-arranjadas (SAM: *self-assembled monolayers*) de cistamina e extrato de açaí contendo peroxidase, o qual foi aplicado na quantificação de hexazinona, através da inibição da enzima na presença do  $H_2O_2$  e HQ.

#### **a) Otimização dos parâmetros experimentais**

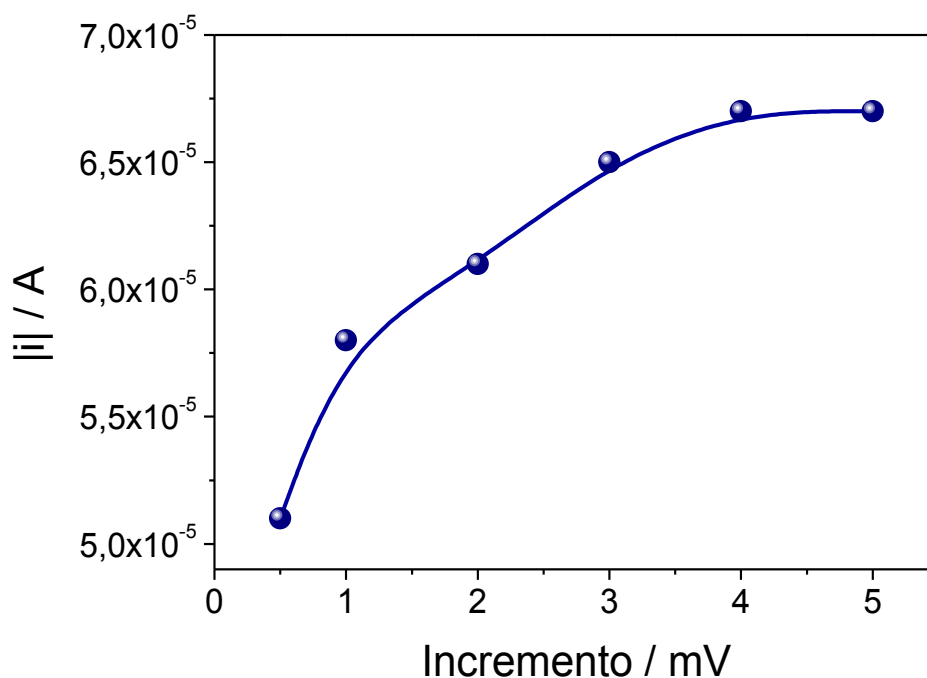
A voltametria de onda quadrada foi usada para avaliação do desempenho do biossensor. Inicialmente a influencia do pH foi estudada na faixa de 5,0 a 8,0 usando solução uma solução de estoque de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de hexazinona, a maior resposta para o analito foi obtida no pH 6,0. Assim, a solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , foi usada como eletrólito suporte.

Outro fator importante que influência na resposta do biossensor é a concentração do peróxido de hidrogênio, uma vez que é o substrato da peroxidase. Desta forma, foram estudadas concentrações de peróxido de hidrogênio na faixa de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sendo que a concentração que forneceu os melhores resultados para a detecção da HXZ foi  $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Por outro lado, a hidroquinona também cumpriu um papel importante na resposta deste biossensor, uma vez que é este composto que realiza a função da doação de elétrons para a regeneração da enzima, e por isto, sua concentração na cela de medida foi avaliada foram testadas soluções de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Já a avaliação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada também foi realizada, frequência (10 – 80 Hz), amplitude de pulso (10 – 120 mV) e incremento (0,5 – 5,0 mV). Sendo que a melhor resposta foi obtida com 30 Hz, 100 mV e 5,0 mV para os parâmetros, incremento, amplitude de pulso e frequência respectivamente.

Assim todos os experimentos seguintes foram realizados sob estas condições previamente otimizadas e mostradas nas Figuras 24 a 26.



**Figura 24. Otimização do incremento de potencial na SWV para a resposta do biossensor para hexazinona.**

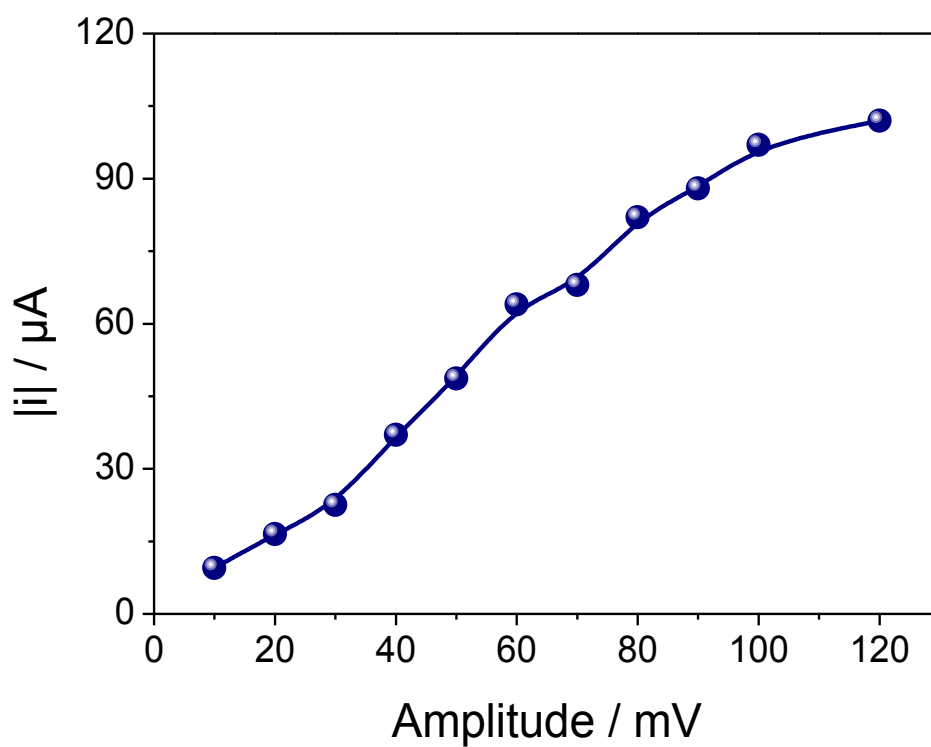


Figura 25. Otimização da amplitude de pulso na SWV para a resposta do biossensor para hexazinona.

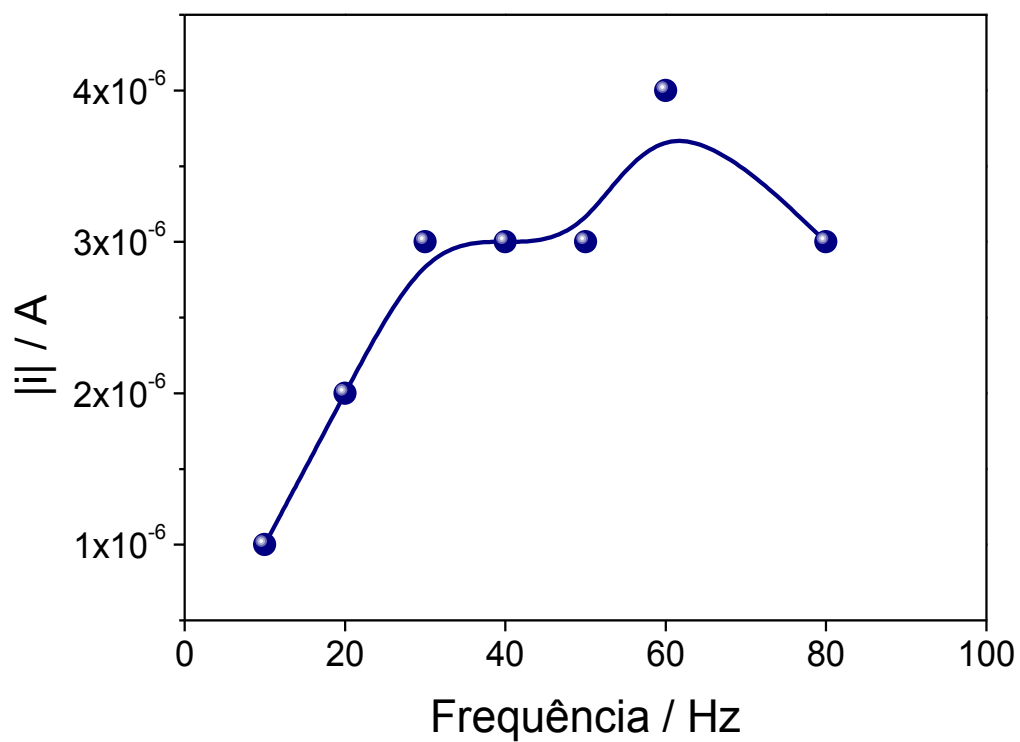


Figura 26. Otimização da frequência na SWV para a resposta do biossensor para hexazinona.

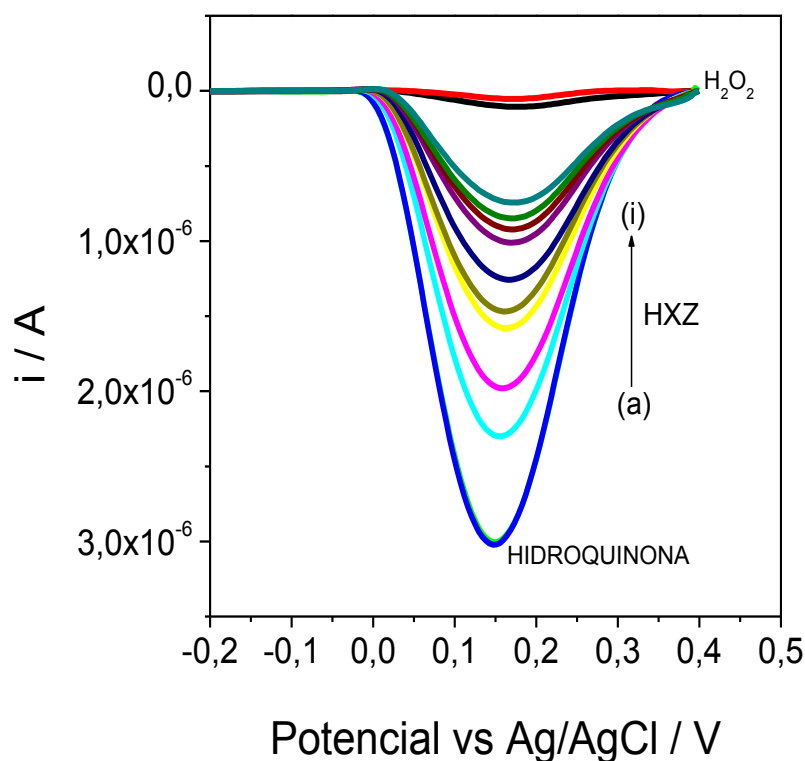
## **b) Perfil de resposta do biossensor para hexazinona**

A hexazinona, quando adicionada ao meio onde ocorre a reação enzimática, produz uma diminuição da corrente produzida pela hidroquinona, esta diminuição do sinal é proporcional ao aumento da concentração do herbicida, demonstrando seu efeito inibidor sobre a reação enzimática. A Figura 27 mostra o perfil de resposta do biossensor para hexazinona.

Na Figura 28 está apresentada a curva de calibração para quantificação do herbicida. A qual mostra a percentagem de inibição, que foi calculada pela equação 5, em função da concentração do pesticida.

$$\% I = \frac{I_o - I_i}{I_o} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Onde:  $I_o$  corresponde à corrente gerada pela HQ e  $I_i$  à corrente observada após adicção de HXZ.



**Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada para o biossensor à base de SAM e POD extraída do açaí na presença do herbicida hexazinona. Condições de medida: 10 Hz de frequência, 100 mV de amplitude e 10 mV de incremento. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0) contendo 60 µmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adições de HXZ entre 30 e 160 µmol L<sup>-1</sup>.**

Sob as condições otimizadas o biossensor mostrou uma faixa de resposta linear (equação 6, R = 0,997) para hexazinona em concentrações de 2,0 x 10<sup>-5</sup> a 1,1 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e limites de detecção de 6,1 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e de quantificação de 2,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

$$\%I = 16(\pm 1) + 455.272 (\pm 16.314) [HXZ] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{eq. 6})$$

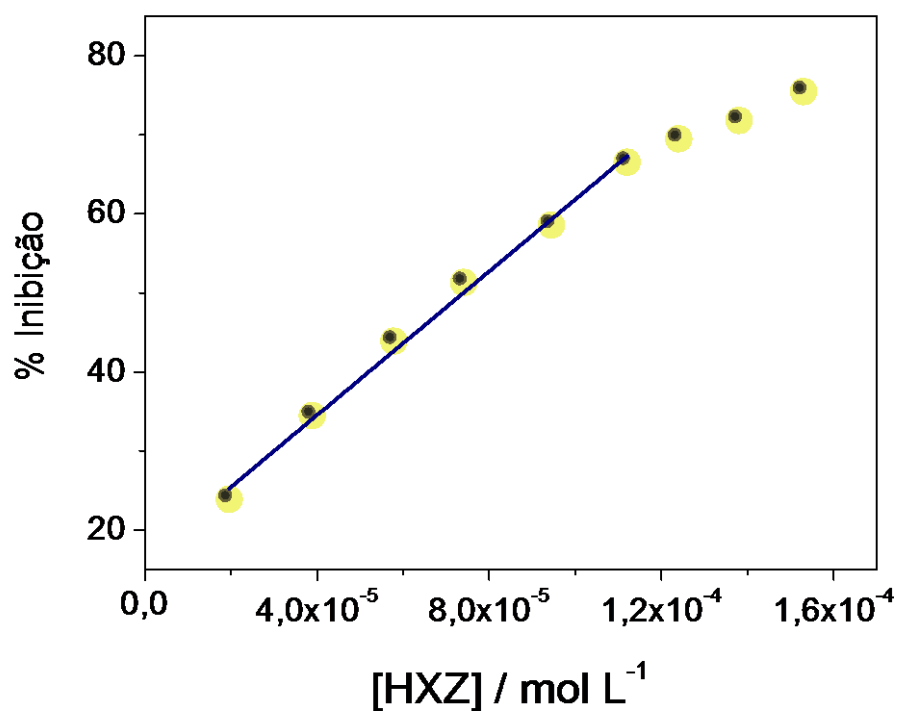


Figura 28. Curva de calibração para a quantificação da hexazinona usando o eletrodo de ouro modificado com monocamada de cistamina e extrato de açaí.

Mostrou-se a aplicação bem sucedida do extrato de açaí na obtenção de um biossensor para detecção do pesticida hexazinona baseado na inibição da enzima peroxidase do extrato vegetal.

## **3.2. SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE HEXAZINONA**

### **3.2.1. Simulações computacionais: Obtenção dos dados teóricos para escolha do monômero funcional**

A literatura comumente relata que para a escolha de um monômero adequado para algum dado analito, deve ser usado um monômero doador de próton (caráter ácido), quando o *template* é acceptor de próton (caráter básico), ou vice-versa, no intuito de estabelecer ligações de hidrogênio que permitam formar um complexo monômero funcional – *template* bastante estável para garantir a formação do polímero molecularmente impresso<sup>35,36</sup>. Assim, a acrilamida (MP5) é a mais utilizada na síntese de MIPs para moléculas com características neutras. Entretanto, outros monômeros menos usados (Tabela 3) podem também ser empregados, podendo resultar em diferentes tipos de interações, além da de hidrogênio, com o analito de interesse e cuja eficiência poderá ser prevista através de ferramentas computacionais, mesmo antes de se realizar a síntese propriamente dita, eliminando o fator “tentativa e erro”, e conseqüentemente consumo de tempo e reagentes.

Desta forma, foram realizadas simulações para avaliar a interação da hexazinona com os 20 monômeros propostos, as quais foram realizadas em duplicata com a finalidade de obter resultados confiáveis e comparáveis. Para cada monômero foram empregados três conformeros diferentes para avaliar de forma mais precisa as possibilidades de interação entre as diferentes conformações do monômero e o analito. Cada simulação durou em média 26 horas. A Figura 29 mostra a média dos resultados de energia obtidos nessas simulações.

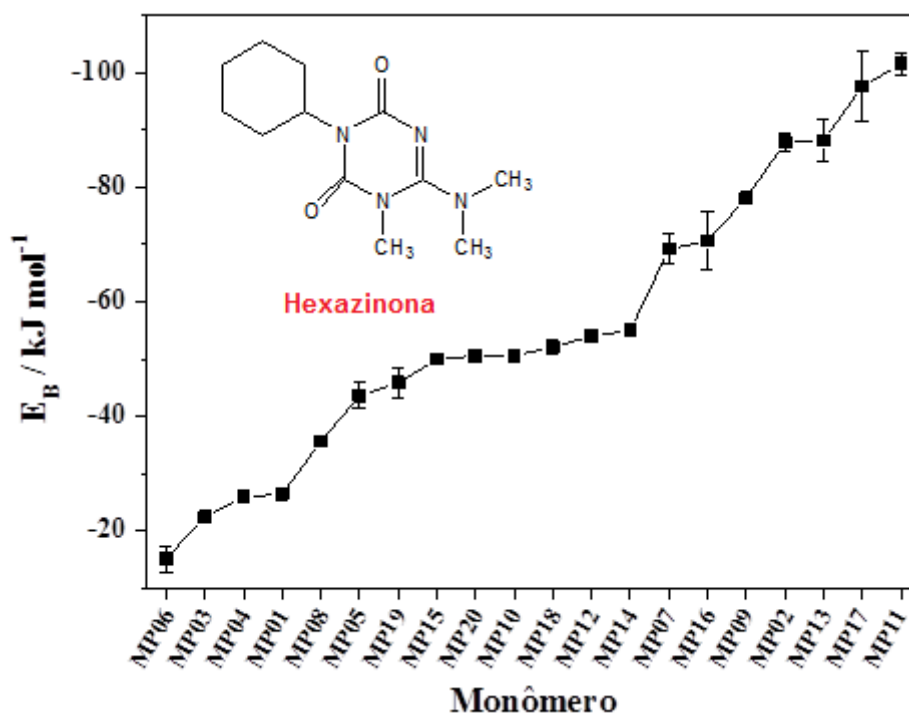


Figura 29. Média do resultado das simulações realizadas para avaliar a energia de interação da hexazinona com os 20 monômeros propostos da Tabela 3.

Os valores obtidos podem ser interpretados como a energia liberada na aproximação entre cada monômero e a hexazinona, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, ou seja, na “teoria”, mais seletivo será o polímero resultante.

Pode-se observar pelos resultados da Figura 29, que os monômeros mais adequados para a hexazinona segundo a simulação, respectivamente são o ácido metilenosuccinico (MP11), 2-vinilpiridina (MP17) e 3-divinilbenzeno (MP13); que os monômeros com energia de interação media seriam a acrilamida (MP5); ácido metacrílico (MP12) e o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico (MP19); e os



monômeros de mais baixa energia de interação seriam a acroleína (MP6), o etil éster de imidazol-4-acrílico (MP3) e o ácido acrílico (MP4).

Observando a estrutura da hexazinona inserida na Figura 21, podem-se notar regiões nitrogenadas, explicando a clara afinidade por monômeros que se liga através de ligações de hidrogênio, a hexazinona é uma molécula neutra apresentando só um tautômero podendo ter preferências por moléculas neutras e pelas moléculas ácidas uma vez que possui pares de elétrons livres.

Com estas considerações foram sintetizados MIPs com os seguintes monômeros de interação média MP5 (monômero neutro) e MP12, e com o monômero de maior energia de interação MP17, que eram aqueles de disposição imediata (Figura 30).

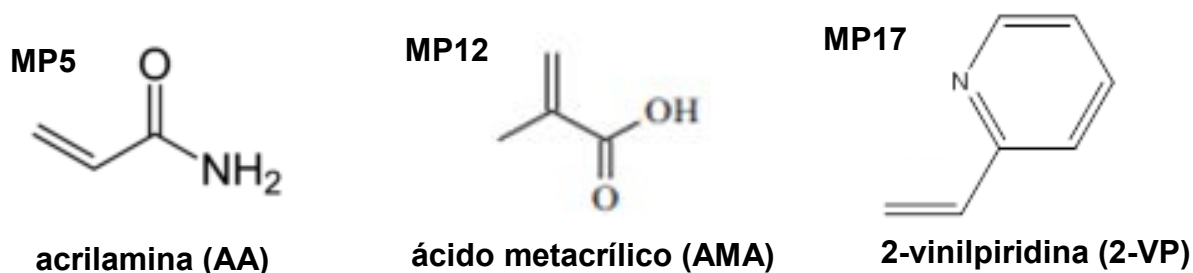


Figura 30. Estrutura química dos monômeros usados neste trabalho.

## 3.2.2. Caracterização dos MIP sintetizados

### 3.2.2.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MIP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Conforme mostrado na Tabela 4 da parte experimental foram sintetizados vários MIPs com os monômeros MP5, MP12 e MP17, segundo resultado da simulação computacional, assim como foram empregados diversos métodos de sínteses (*bulk* e precipitação) e de polimerização (temperatura ou UV). Na Figura 31, mostram-se as microscopias eletrônicas de varredura dos MIPs obtidos por todos esses diferentes métodos.

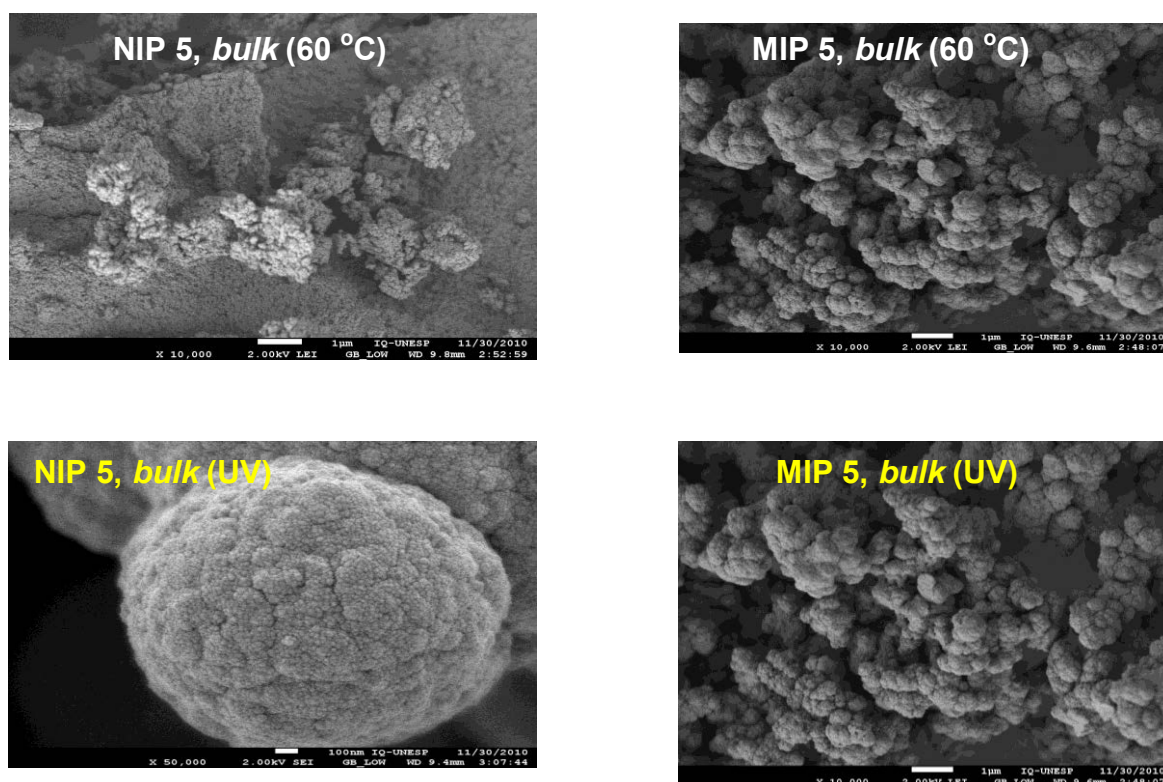


Figura 31. Microscopias eletrônicas de varredura MEV dos diversos MIPs e NIPs sintetizados neste trabalho.

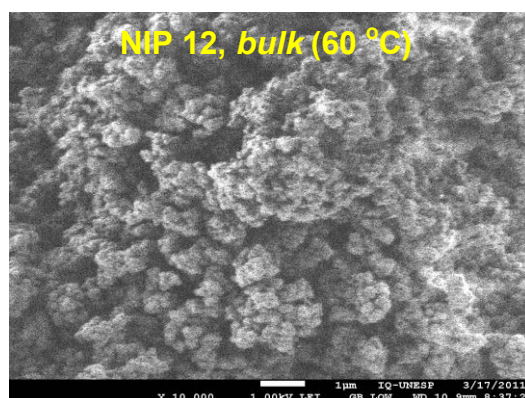
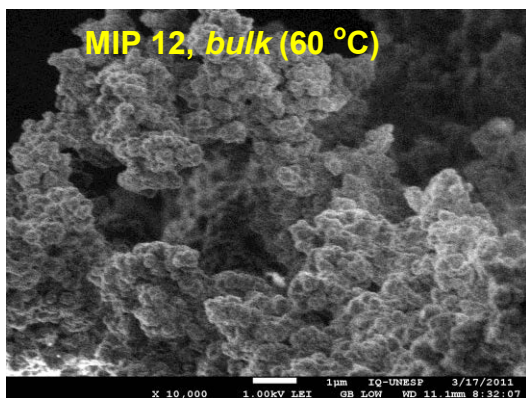
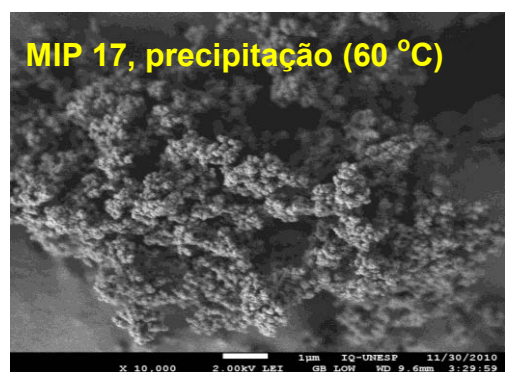
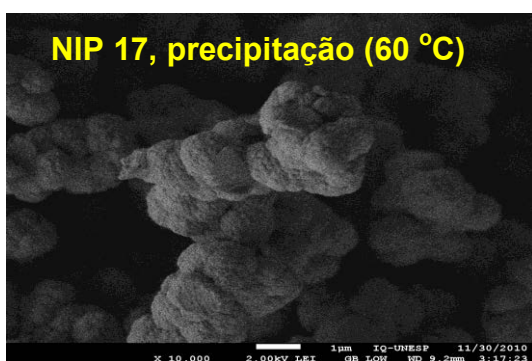
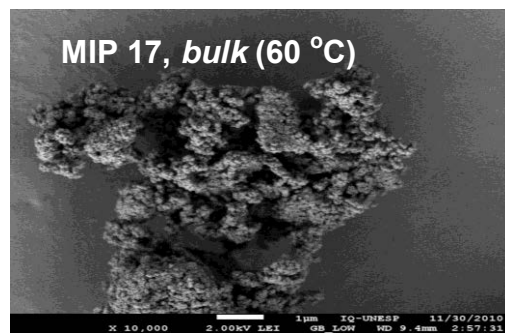
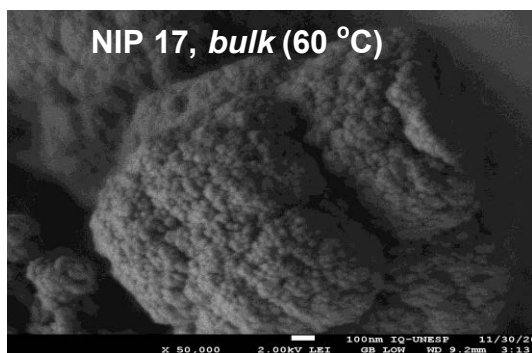


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura MEV dos diversos MIP e NIP sintetizados neste trabalho. Continuação.

Claramente nota-se a diferença na porosidade dos materiais sintetizados. Os MIPs apresentaram ser mais granulados e porosos do que o polímero de controle, NIP, mostrando diferença na área superficial e entre os polímeros. Embora uma comparação visual não seja adequada para apresentar conclusões sobre as

diferenças entre os polímeros, pode-se observar que o MIP, aparentemente, apresentou uma porosidade maior.

A confirmação dessa hipótese foi obtida através dos valores de área superficial estimada pela técnica de adsorção/desorção de N<sub>2</sub> usando o método de BET (*Brunauer Emmett and Teller*) e pelos valores de volume e tamanho dos poros obtidos. Assim, obtiveram-se os resultados mostrados na Tabela 5, na qual mostra-se que a área superficial dos MIP é maior que dos NIP e que o MIP preparado com o monômero 2-VP foi cerca de 10 vezes mais poroso daquele preparado com AA. O que inicialmente sugere que a simulação realizada foi bem sucedida.

**Tabela 5: Valores de área superficial específica dos polímeros sintetizados por *bulk* e polimerizados por aquecimento a 60 °C (MIP5) e a 70 °C (MIP17).**

Polímero	Área superficial específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume do poro (Å)
MIP 5	61,934	27,46
NIP 5	16,732	22,28
MIP17	683,53	35,12
NIP 17	632,04	37,45

Pode-se observar que o MIP que apresentou maior área superficial é o que teve maior interação com a triazina hexazinona e foi aquele que mostrou maior afinidade na simulação computacional, o MIP17 (2-VP, Figura 33). Por outro lado, a grande porosidade do NIP17, pode ser consequência do solvente usado na síntese destes MIP e NIP, ou seja, o solvente porogênico. No caso do MIP5 tendo sido o diclorometano e no caso do MIP12 o tolueno. Além disso, foi usado maior

temperatura de polimerização no MIP 17 o que aumenta a energia e favorece a interação por transferência de carga entre o analito e o monômero. (os polímero MIP 5 e MIP 17 foram classificados como mesoporos (2–50 nm)<sup>69</sup>

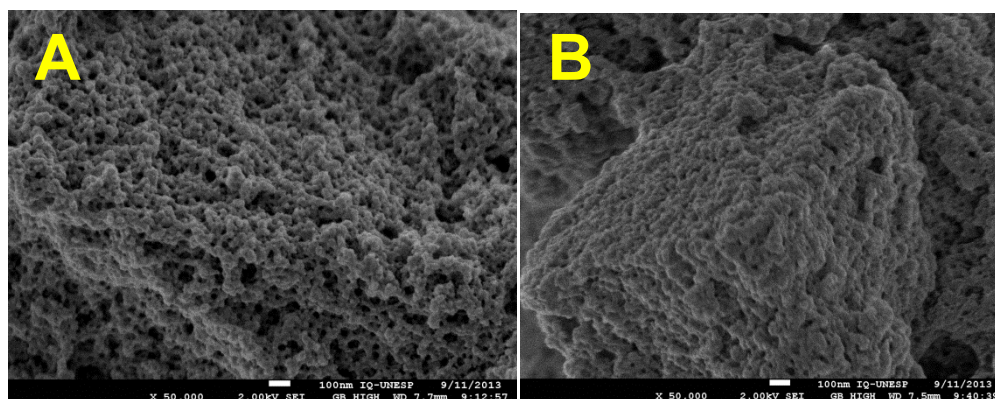


Figura 33. MEV do (A) MIP17 e (B) NIP17 obtido pelo método de *bulk* com amplificação de 50000x.

Assim o MIP17 será avaliado mais detalhadamente nos seguintes estudos.

### 3.2.2.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de infravermelho do agente de ligação cruzada EDGMA (Figura 34) apresenta banda característica na região de  $1700\text{ cm}^{-1}$  que correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster; e a  $1700\text{ cm}^{-1}$  da banda correspondente à deformação axial de C-O do éster; na região entre  $1670 - 1640\text{ cm}^{-1}$ , podem ser vistas bandas de estiramento de grupos vinil C=C presentes em EDGMA.

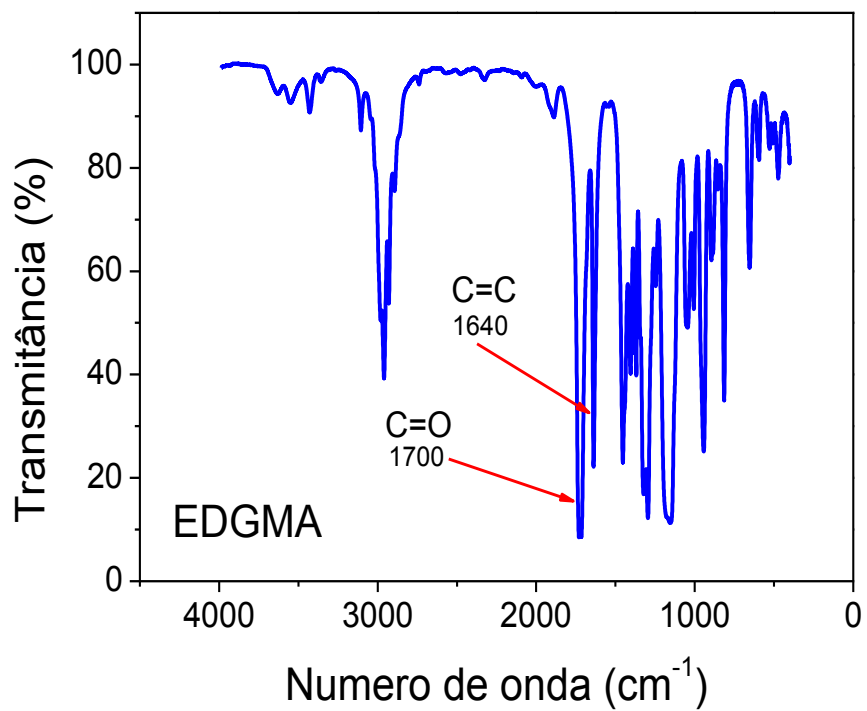


Figura 34. Espectros de FTIR do EDGMA.

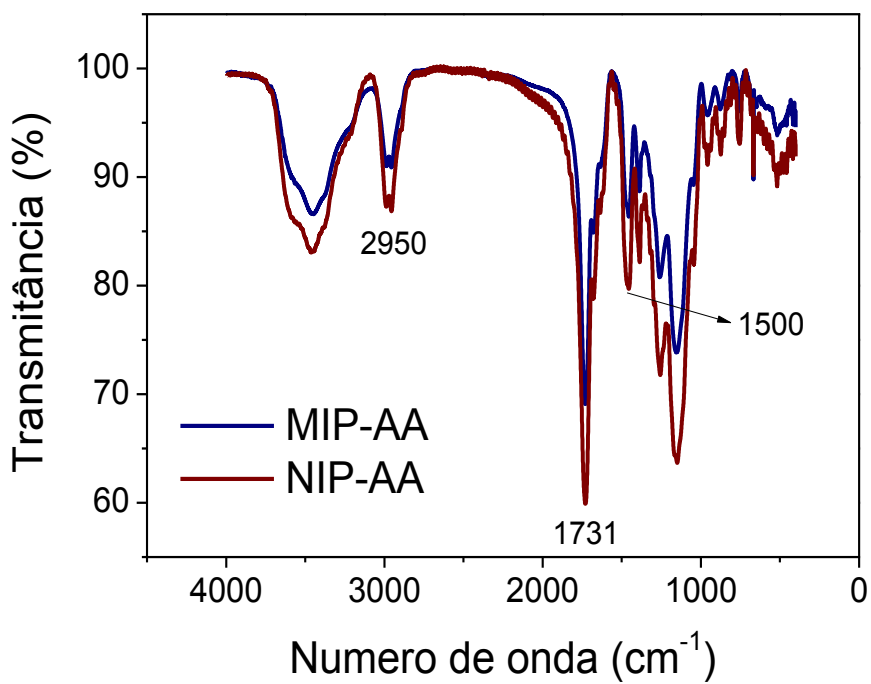


Figura 35. Espectros de FTIR do MIP e NIP sintetizados com o monômero acrilamida.

Já na Figura 35, observa-se também uma banda a 3300 correspondente ao grupo  $\text{NH}_2$ , observasse também uma banda característica do grupo (CO) de carbonila em  $1731\text{ cm}^{-1}$  e a banda em  $2960\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos grupos  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$ .

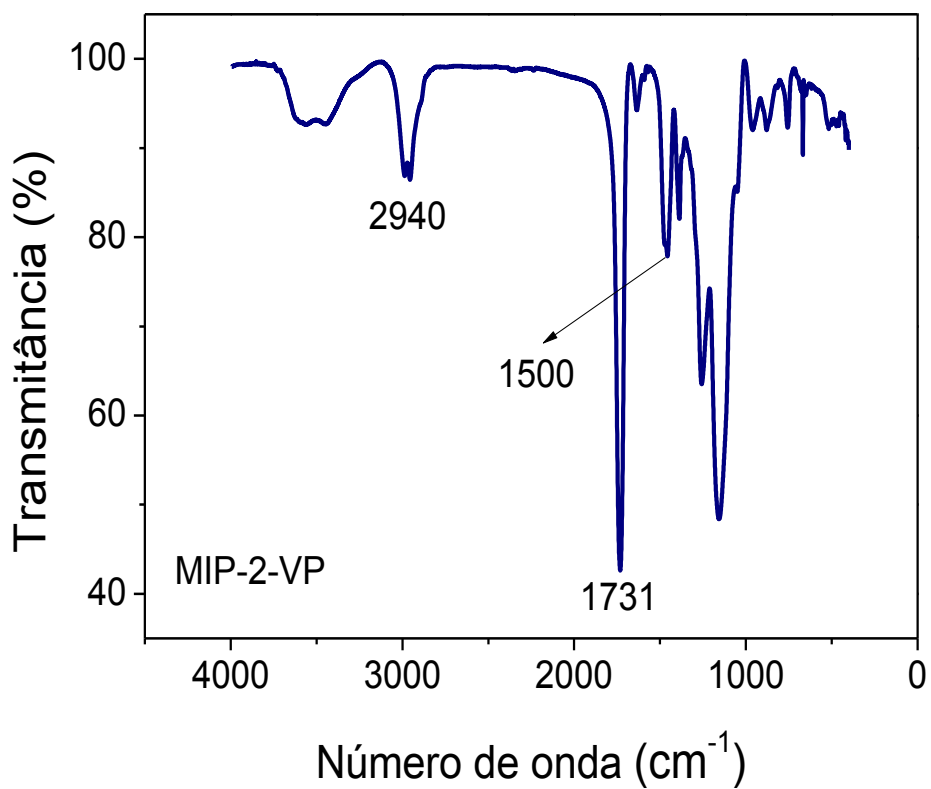
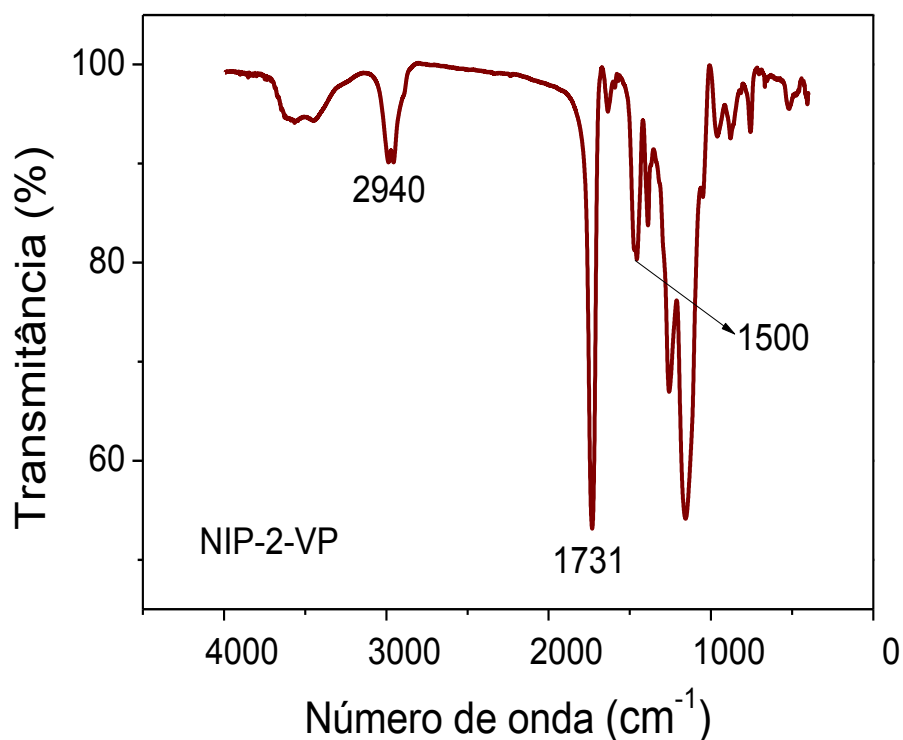


Figura 36. Espectro de FTIR do polímero MIP17 preparado com 2-vinilpiridina (2-VP).





**Figura 37. Espectro de FTIR dos polímeros NIP17 preparados com 2-vinilpiridina (2-VP).**

As bandas características dos monômeros utilizados na síntese e que podem ser visualizadas nos polímeros MIP e NIP são as de EDGMA, e dos monômeros AA ou 2-VP na região de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster e de  $1550\text{ cm}^{-1}$  da deformação axial do éster. Pode-se observar também a ausência do sinal em  $1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  proveniente do estiramento de grupos vinila dos monômeros, que desaparecem em todos os polímeros sintetizados (Figuras 35 – 37) devido à quebra das ligações C=C no processo de polimerização, dando origem a ligações simples. Isso pode ser visto na banda em  $2940\text{ cm}^{-1}$  correspondentes aos grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>.

Adicionalmente, os espectros de FTIR de MIP5 e NIP5 nas Figura 35 e dos MIP17 e NIP17 (Figuras 36 e 37) preparados usando EDGMA como copolímero são praticamente idênticos, pois cada um deles possuem os mesmos grupos



funcionais. Por outro lado, ao serem comparados os espectros do MIP e NIP das Figuras 35- 37 com o espectro da Figura 38 sugerem que, o herbicida hexazinona (FTIR, mostrado Figura 38) foi realmente eliminado na fase de lavagem dos MIP.

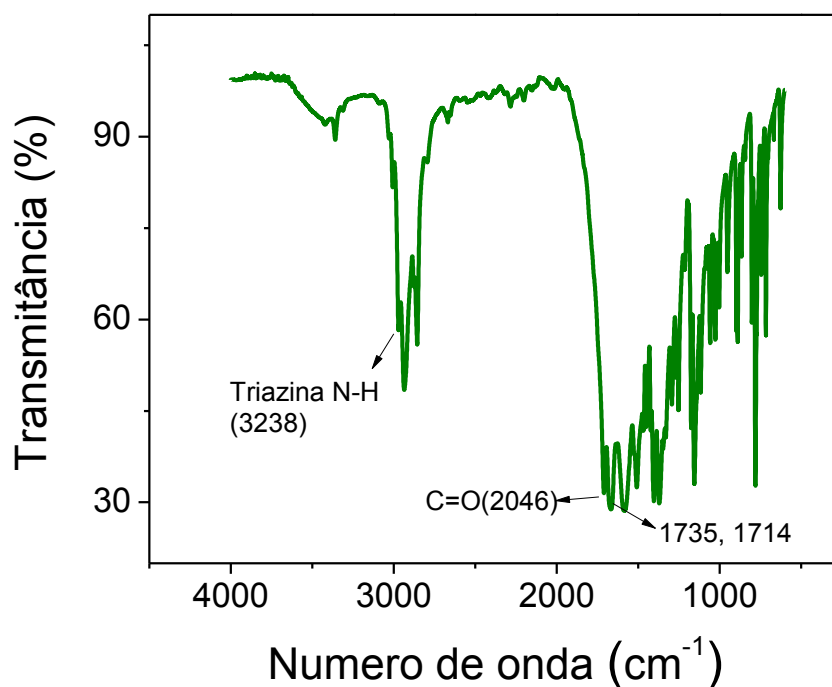


Figura 38. Espectro de FTIR da hexazinona.

### 3.2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTETIZADOS COM 2-VP ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O comportamento da adsorção termodinâmica do MIP17 para hexazinona foi explorado à temperatura ambiente durante 12 h. Como pode ser mostrado na Figura 39, a quantidade de adsorção ( $Q$ ,  $\text{mg g}^{-1}$ ) foi calculado com base na diferença de concentração hexazinona antes e após o adsorção em um volume constante de metanol e um peso constante do MIP ou NIP , de acordo com a

equação 1. Pode-se observar pelo gráfico da Figura 38, que a quantidade de adsorção de pesticida aumentou com o aumento da concentração de hexazinona, chegando a um valor de saturação em uma concentração de 4 mmol L<sup>-1</sup>, o que representa a saturação de cavidades de ligação ativos no MIP ou NIP.

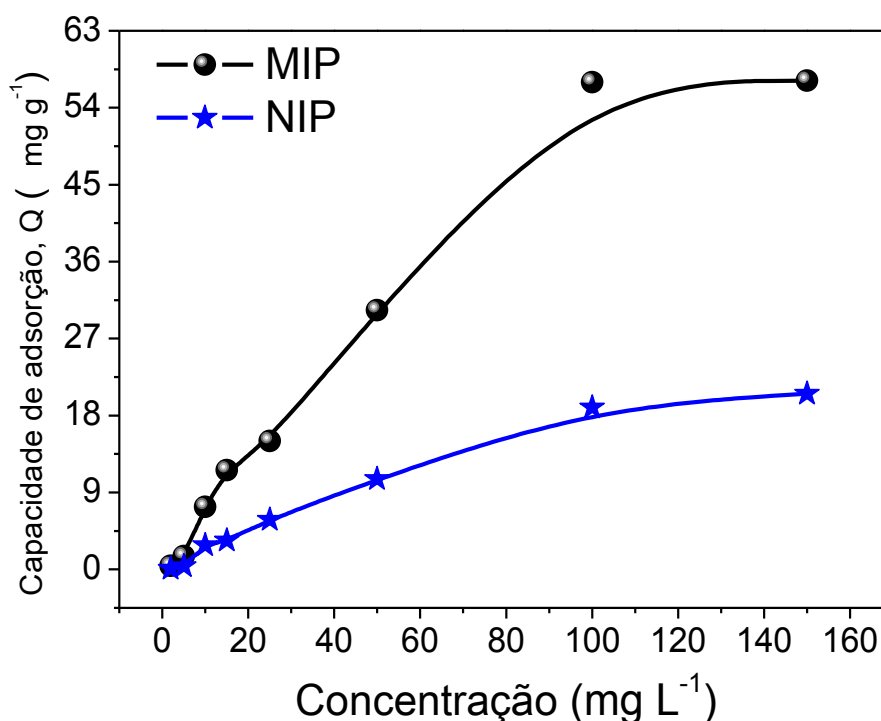


Figura 39. Perfil da adsorção de HXZ apresentado pelos MIP17 e NIP17.

Os resultados obtidos mostraram que o MIP apresenta um maior poder de retenção do analito que seu respectivo NIP, e que pode ser atribuído à capacidade de reconhecimento molecular do MIP que contém nanocavidades de estrutura química, funcional e tridimensional que o tornam seletivo ao analito, assim como aumentando o número de sítios (nanocavidades) de ligação quando comparado ao NIP.

A seguir, visando estimar/quantificar a afinidade de adsorção do polímero pela HXZ e outras moléculas análogas, no intuito de avaliar a seletividade do polímero sintetizado, foram calculadas as constantes de ligação ( $K_f$ ) usando o modelo de Freundlich, o qual se caracteriza por ser um modelo estritamente empírico, conforme segue (equação 7):

$$Q = K_F C^{1/n} \quad (\text{eq. 7})$$

Onde  $K_F$  e  $n$  são constantes.  $K_F$  é uma constante dependente da temperatura e da entalpia do sistema. Entretanto, para obter esses parâmetros os termos da equação 8, podem ser rearranjados de maneira a linearizar a equação 7 (equação 8):

$$\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C \quad (\text{eq. 8})$$

Assim, ajustando-se os dados das isotermas da Figura 39 e seguindo a equação 8 foi possível construir os gráficos apresentados nas Figuras 40 e 41, obter seu ajuste linear e, deste modo determinar as constantes de Freundlich, mostradas na Tabela 5.

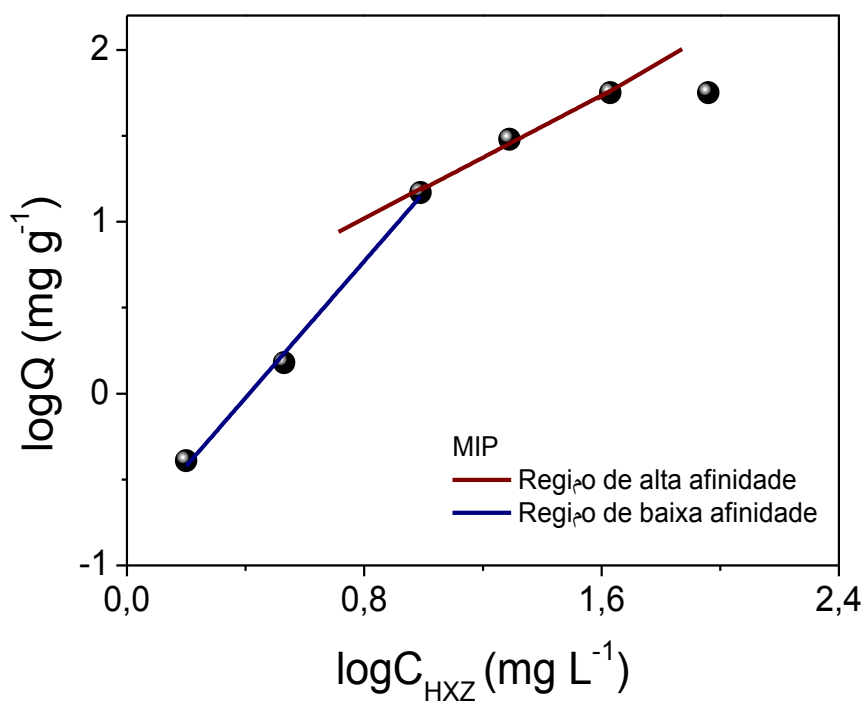


Figura 40. Isotermas de Freundlich linearizadas usadas para estimar as características de ligação da Hexazinona para o MIP17.

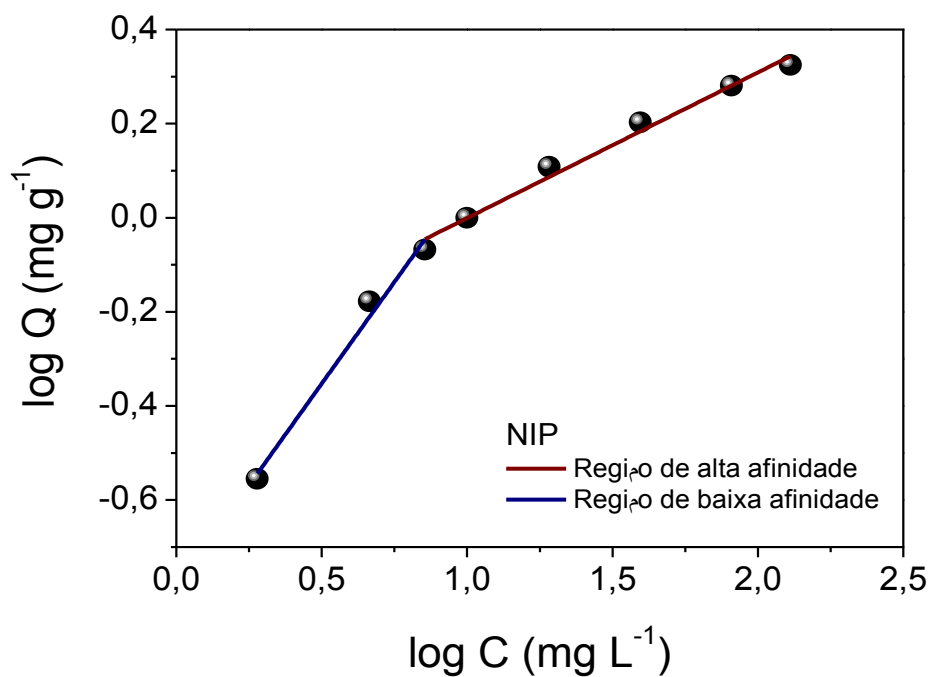


Figura 41. Isotermas de Freundlich para estimar as características de ligação da Hexazinona para o NIP17.

Pode-se observar das Figuras 40 e 41 que os ajustes de Freundlich não apresentam uma simples linha reta, o que sugere que os locais de ligação do polímero são heterogêneos com respeito à afinidade para a HXZ.

Existem duas regiões distintas que se podem ajustar para obter duas linhas retas, o que indica que os locais de ligação podem ser agrupados em dois grupos distintos com propriedades de ligação específicas: Locais de alta afinidade (AA) e locais de baixa afinidade (BA), classificados de acordo com o valor da constante  $K_F$ , descritos na Tabela 6, indicando que um valor de  $K_F$  maior é obtido para HXZ no MIP17 com um valor de  $1,94 \text{ L g}^{-1}$ .

**Tabela 6. Resultados da análise do ajuste de Freundlich para HXZ em MIP17 e NIP17.**

Polímero	Local de ligação	Ajuste Freundlich	R	$K_F (\text{L g}^{-1})$
MIP	Baixa afinidade <sup>A</sup>	$\log Q = 1,986 \log C - 0,82$	0,996	0,15
	<b>Alta afinidade<sup>B</sup></b>	<b><math>\text{Log } Q = 0,904 \log C + 0,289</math></b>	<b>0,994</b>	<b>1,94</b>
NIP	Baixa afinidade <sup>C</sup>	$\log Q = 0,864 \log C - 0,785$	0,987	0,16
	Alta afinidade <sup>D</sup>	$\log Q = 0,309 \log C - 0,31$	0,991	0,49

Faixa de concentração considerada: <sup>A</sup> < 1,58 – 9,8 mg L<sup>-1</sup>>; <sup>B</sup> <9,8– 42,7 mg L<sup>-1</sup>>; <sup>C</sup> <1,90 – 7,0 mg L<sup>-1</sup>> e <sup>D</sup> < 7,0 – 125 mg L<sup>-1</sup>>.

Para comparar o efeito de impressão de compostos diferentes (MIP e NIP), os efeitos de partição encontrados para cada composto devem ser normalizados. Isto é realizado por meio do fator de impressão I (equação 9). O valor de I na eq. 10 é obtido da razão entre o coeficiente de partição de uma molécula em um polímero impresso,  $K_p^{MIP}$  (equação 10) e o coeficiente de partição em um polímero não impresso,  $K_p^{NIP}$ , utilizando-se para isso a mesma molécula e o mesmo

monômero no polímero impresso e não impresso. Neste caso, se  $K_P^{MIP} \gg K_P^{NIP}$ , melhor será o desempenho seletivo do MIP.

$$I = \frac{K_P^{MIP}}{K_P^{NIP}} \quad (eq. 9)$$

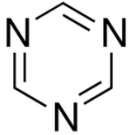
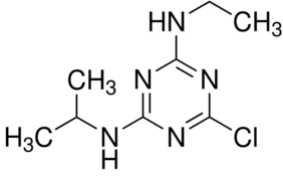
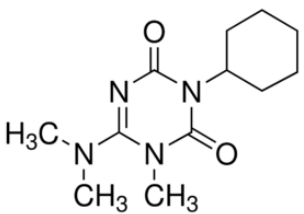
$$K_P = \frac{Q}{C_f} \quad (eq. 10)$$

Onde  $K_P$  é o coeficiente de partição da molécula adsorvida no polímero ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dividido pela molécula remanescente na solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Assim, o fator de impressão obtido para o analito sempre deve ser superior a 1 e, obviamente, maior que aqueles obtidos para os concomitantes. Neste caso o fator de impressão (I) obtido para o MIP17 para HXZ foi de 3,9. Indicando o bom desempenho do MIP em relação ao NIP.

Por outro lado, dando continuidade aos experimentos realizados para verificar a eficácia do MIP sintetizado, foi avaliada a seletividade em relação a outros pesticidas, e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7. Parâmetros de afinidade do modelo de Freundlich para a triazina, atrazina e Hexazinona.**

Analitos	Estrutura química	Ajuste	R	$K_F (L g^{-1})$
Triazina		$\log Q = 0,966 \log C_f - 0,266$	0,992	0,22
Atrazina		$\log Q = 0,261 \log C_f - 0,221$	0,995	0,60
Hexazinona		$\log Q = 0,904 \log C + 0,289$	<b>0,994</b>	<b>1,94</b>

Pode-se observar da Tabela 7 que os valores da constante de afinidade do MIP para HXZ é maior que para as outras triazinas estudadas. E isto já era esperado devido à grande diferença entre as estruturas químicas destes pesticidas.

Uma maneira de avaliar a seletividade de uma molécula versus outra é quantificada pela razão entre os dois coeficientes de partição  $K_{P1}$  e  $K_{P2}$  (para o analito 1 e 2, respectivamente), esta razão é denominada fator de separação ( $\alpha$ ) (equação 11)

$$\alpha = \frac{K_{P1}}{K_{P2}} \quad (eq. 11)$$

Assim, para as moléculas estudadas os respectivos fatores de separação obtidos foram, para 100 mg L<sup>-1</sup> de cada uma em relação à HXZ de 8,8 para triazina e 3,22 para atrazina.

Na Figura 42 mostra um perfil cromatográfico da detecção de um interferente (simazina) antes e após experimentos de afinidade. Mostrando claramente a preferência pelo analito alvo. Neste caso o fator de separação foi de:

$$\alpha_{SIMAZINA}^{HXZ} = 11,9.$$

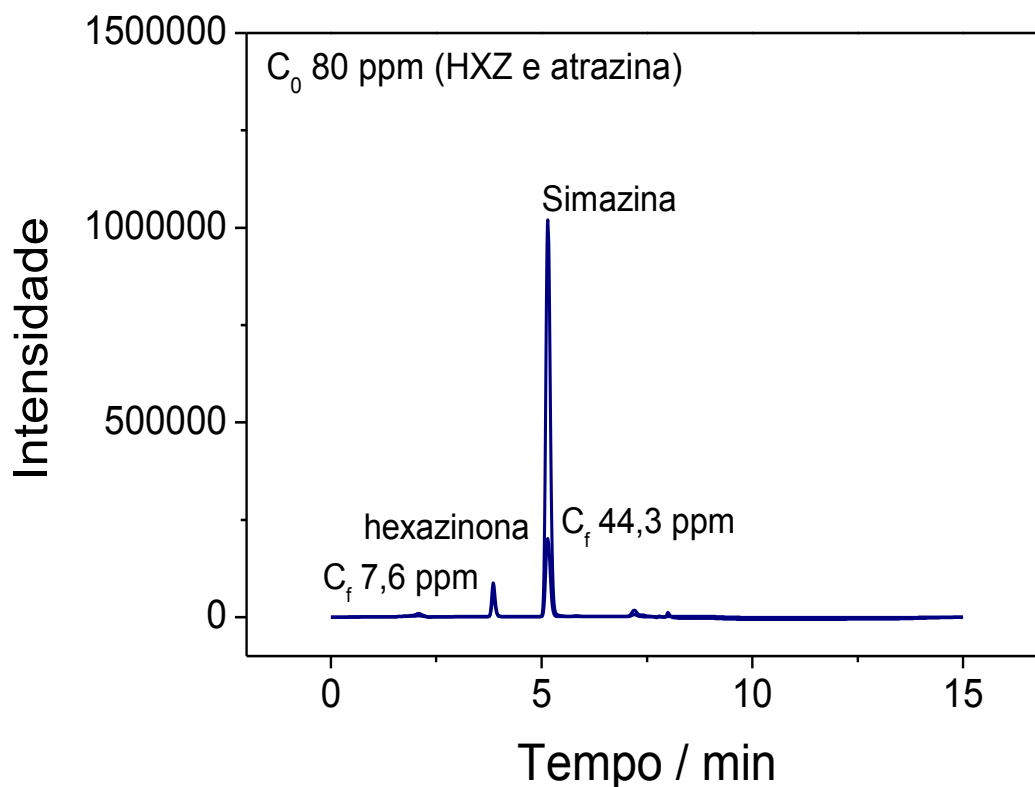


Figura 42. Perfil cromatográfico para a detecção de HXZ e um interferente (simazina) antes e após experimento de afinidade.

Finalmente, a Figura 43 mostra um perfil cromatográfico da detecção do interferente (atrazina) antes e após experimentos de afinidade. Mostrando a seletividade do MIP para o analito hexazinona. Neste caso o fator de separação foi de:  $\alpha_{ATRAZINA}^{HXZ} = 18,9$ .



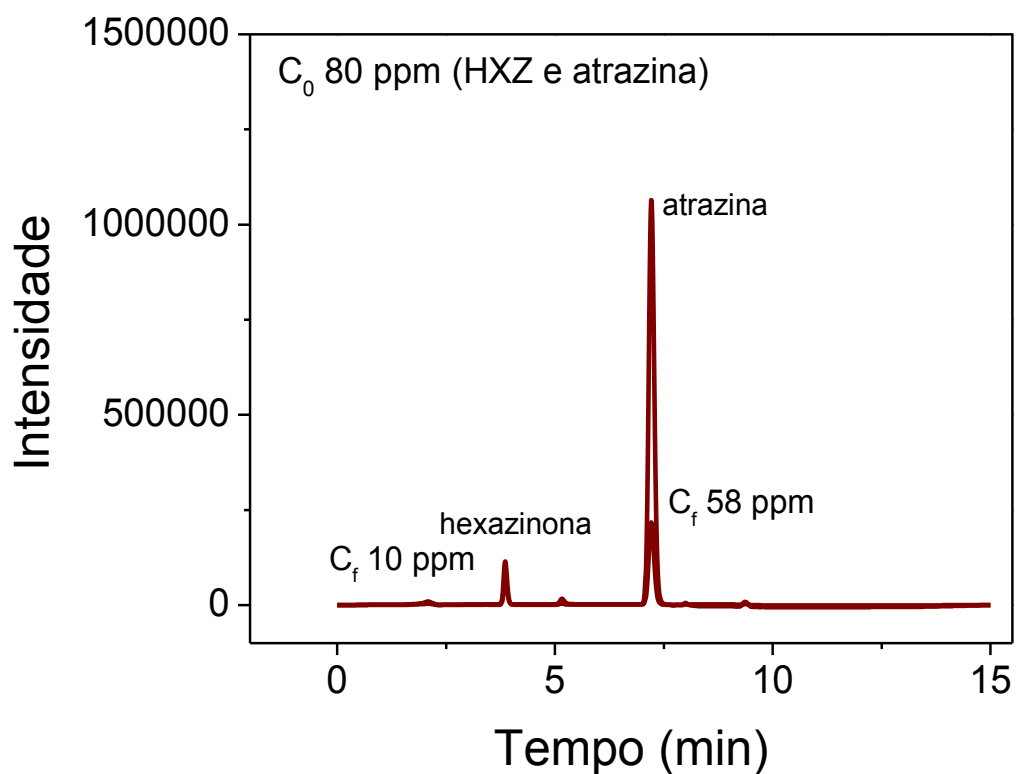


Figura 43. Perfil cromatográfico para a detecção de HXZ e um interferente (atrazina) antes e após experimento de afinidade.

### 3.2.3. Sensor biomimético à base de polímeros de impressão molecular para determinação de hexazinona

Uma vez caracterizados os MIP sintetizados para detecção de HXZ, e confirmada sua seletividade em relação a outros compostos, e em relação ao NIP, a seguir foi realizada a aplicação deste material no desenvolvimento de um novo sensor biomimético usando para HXZ.

### **3.2.3.1. OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM MIP OU NIP**

Inicialmente, os sensores à base de pasta de carbono modificada com MIP17 (MIPCPE) foram preparados com quantidades fixas de carbono e óleo de parafina e de diferentes quantidades de MIP. A melhor resposta para o sensor preparado apareceu quando usou-se 0,005 g de MIP e 30mg massa de grafite. E a pesar de que poderia-se pensar que aumentando as quantidades de MIP no sensor, a resposta aumentaria devido ao aumento de mais locais de reconhecimento na superfície do eletrodo; isto não ocorreu, uma vez que o aumento da quantidade de MIP na pasta leva a uma diminuição da resposta do sensor, provavelmente devido à diminuição da condutividade da pasta, uma vez que o MIP é um polímero orgânico.

Experiências semelhantes foram também realizadas para investigar o efeito da quantidade de óleo de parafina e de grafite na resposta do eletrodo. A partir dos resultados correspondentes, as quantidades ótimas de grafite e óleo mineral foram definidos como 0,070 g e 0,030 g, respectivamente. O aumento do teor de grafite no eletrodo de MIPCPE leva a um aumento na resposta do eletrodo devido ao aumento da condutividade da pasta. No entanto, depois de um dado ponto, o aumento no conteúdo de carbono resulta na redução do sinal do sensor, provavelmente devido à diminuição do teor de MIP na superfície do eletrodo<sup>70</sup>.

A quantidade de óleo de parafina foi também otimizada, uma vez que, a maiores quantidades de agente aglomerante (óleo de parafina) a resposta do sensor diminui, dado o caráter isolante do óleo.

Desta forma, a preparação do sensor MIPCPE, consistiu na mistura de 70 mg de pó de grafite, 30 mg de óleo de parafina e 5 mg de MIP para HXZ, correspondendo à uma percentagem de 67:28:5 (% m/m).

### 3.2.3.2. PERFIL DA RESPOSTA DO SENSOR MIPCPE PARA HXZ

Neste estudo, no intuito de verificar qual seria o perfil de resposta do sensor para a HXZ e compará-lo com os NIPCPE e CPE, foram registradas voltametrias cíclicas em solução de HCl a pH 2,5. Os voltamogramas resultantes são mostrados na Figura 44 revelando uma resposta irreversível, correspondente diretamente ao perfil eletroquímico do analito. O aumento da corrente de pico do eletrodo de MIPCPE em comparação com os outros eletrodos CPE e NIPCPE indica a importância da incorporação de MIP na pasta de carbono. Desta forma, este primeiro estudo mostrou o ganho obtido na resposta do sensor quando modificado com MIP.

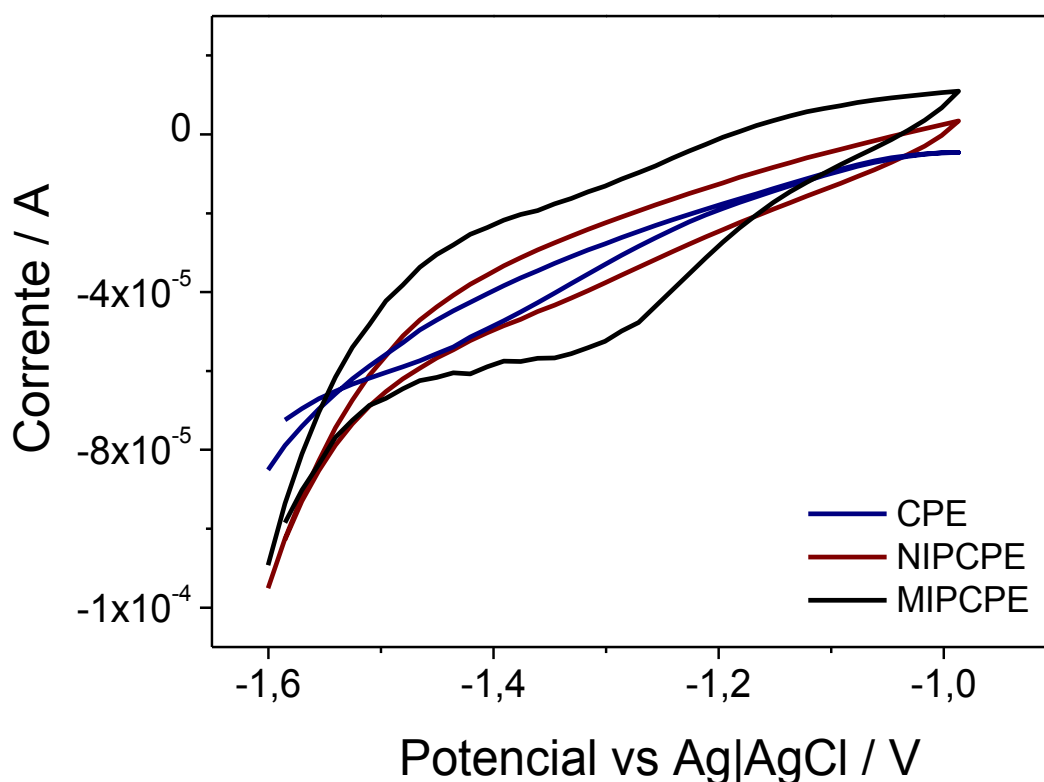


Figura 44. Voltamogramas cíclicos de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HXZ na superfície dos eletrodos MIPCPE, NIPCPE e CPE. Medidas realizadas em HCl (pH 2,5) e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para um estudo mais aprofundado da capacidade de reconhecimento da hexazinona pelos eletrodos, e visando quantificação do analito, com base na Figura 44, foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial por redissolução catódica (DPCSV)<sup>56,57</sup>. Desta forma, os eletrodos MIPCPE, NIPCPE e CPE foram imersos em solução contendo hexazinona na concentração de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos são mostrados na Figura 45.

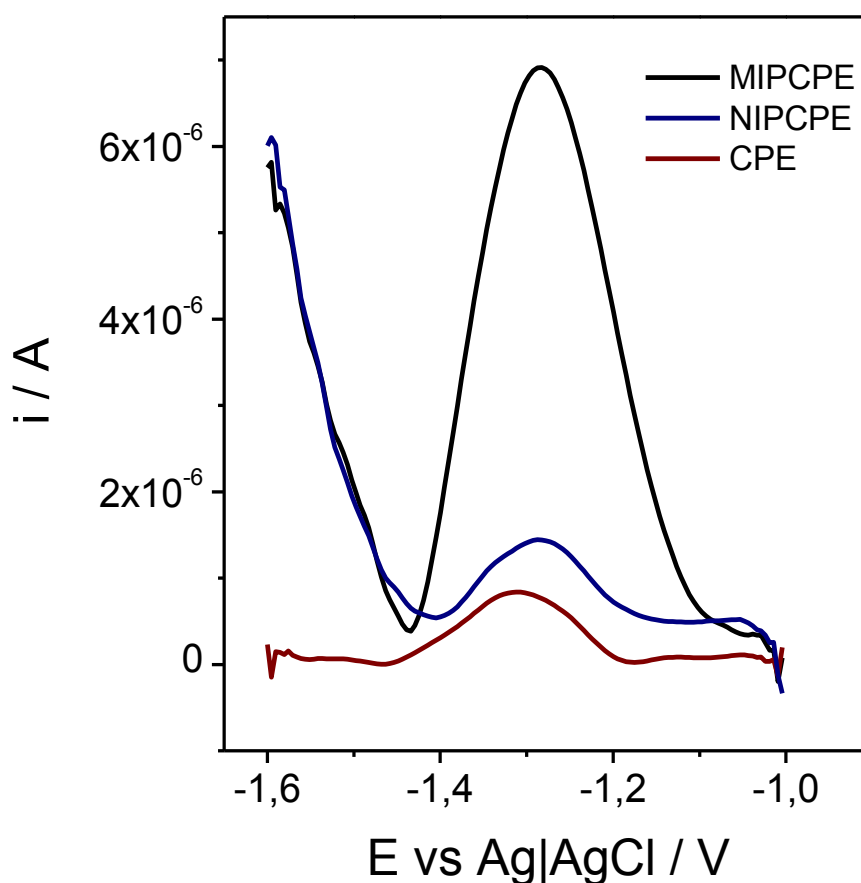
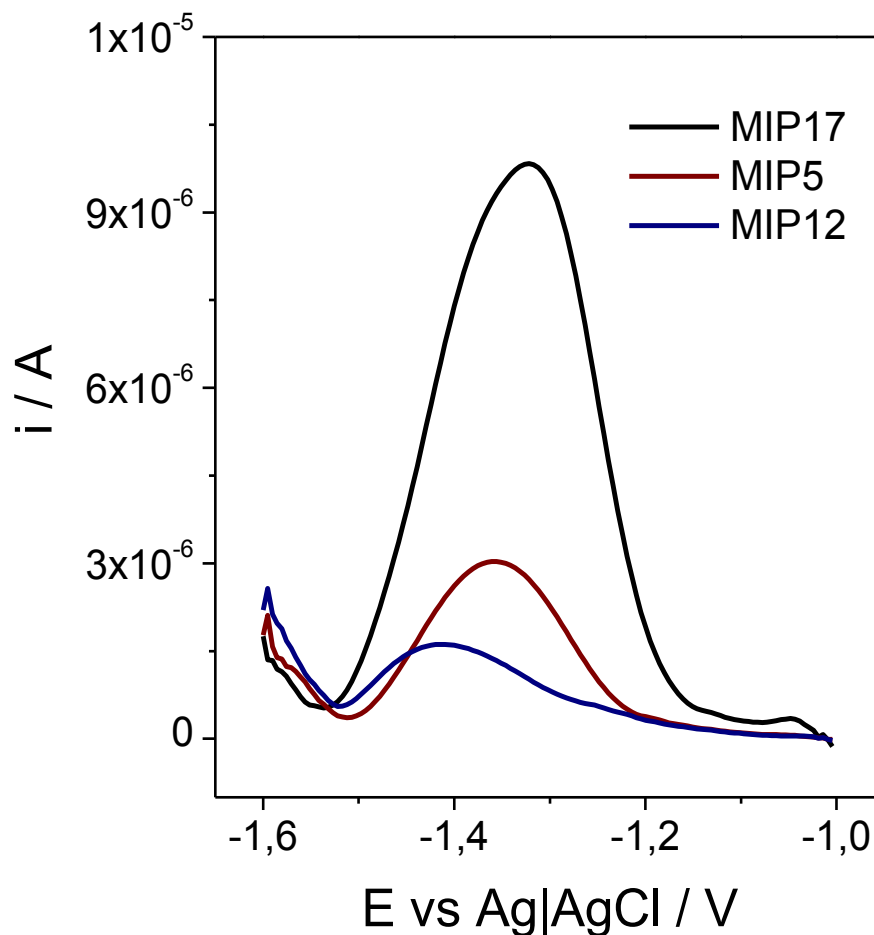


Figura 45. Voltamogramas de pulso diferencial com redissolução catódica de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de hexazinona na superfície dos eletrodos de MIPCPE, NIPCPE e CPE. Condições das medidas: HCl a pH = 2,5, potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ) = -0,5 V, tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ) = 200 s,  $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso = 50 mV, largura de pulso = 40 ms.

Como pode ser observado, em condições idênticas, o sinal do eletrodo à base de MIP é muito maior do que os do NIPCPE e CPE. Isto indica que o MIP no electrodo permite a adsorção de maior quantidade de hexazinona, e que pode ser atribuído às nanocavidades seletivas no polímero impresso, e que não existem nos NIPCPE men no CPE. Mosttrando a viabilidade de uso deste sensor biomimético sensível e seletivo à HXZ.

Adicionalmente, visando confrontar os resultados experimentais com aqueles obtidos da simulação computacional (Figura 29) em relação ao melhor monômero para a síntese, foram registradas as voltametrias de pulso diferencial com redissolução adsortiva (Figura 46) com sensores à base MIP17 (2-VP, aquele ótimo) MP5 (AA, aquele intermediário com menor afinidade) e MP12 (AMA, aquele intermediário com melhor afinidade).

Os resultados obtidos neste estudo, claramente concordaram com os resultados previstos pela simulação computacional (Figura 29) e assim os sensores foram construídos usando o MIP17. Apenas houve uma diferença nos resultados dos polímeros MIP5 e MIP12, nos quais a resposta experimental no sensor se inverte, obtendo-se maior sinal de corrente para o MIP12 e menor para o MIP5. Entretanto, como estes monômeros não serão usados na síntese do MIP para este sensor, este resultado não influenciará no bom desempenho dos sensores MIPCPE para HXZ.



Voltamogramas de pulso diferencial com redissolução catódica de  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de hexazinona na superfície dos eletrodos de pasta de carbono modificados com MIP17, MIP5 e MIP12. Condições das medidas: HCl a  $\text{pH} = 2,5$ ,  $E_{ac} = -0,5 \text{ V}$ ,  $t_{ac} = 200 \text{ s}$ , de velocidade de varredura em  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso de  $100 \text{ mV}$  e largura de pulso de  $50 \text{ ms}$ .

### 3.2.3.3. OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SENSOR

No estudo de otimização do sensor biomimético a base de polímero de impressão molecular usando 2-VP (MIP17) foi empregada à técnica voltametria de pulso diferencial com redissolução catódica (DPCSV). Nestes estudos, buscou-se encontrar os parâmetros que permitissem obter maior sensibilidade, e seletividade das medidas. Para isto, parâmetros como,  $\text{pH}$ , concentração do eletrólito, tempo de

acumulação e potencial de acumulação foram estudados para encontrar aqueles que permitissem obter as melhores respostas.

Assim, a melhor sensibilidade foi obtida em solução de HCl a pH 2,5 tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ) de 200 s e potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ) de -0,5 V. Na voltametria otimizou-se os valores de velocidade de varredura em  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso de 100 mV e largura de pulso de 50 ms. Assim, encontrados estes parâmetros passou-se a estudar o perfil da resposta do sensor para HXZ. Nas Figuras 47 e 48 se apresentam os gráficos obtidos na otimização do pH e tempo de acumulação.

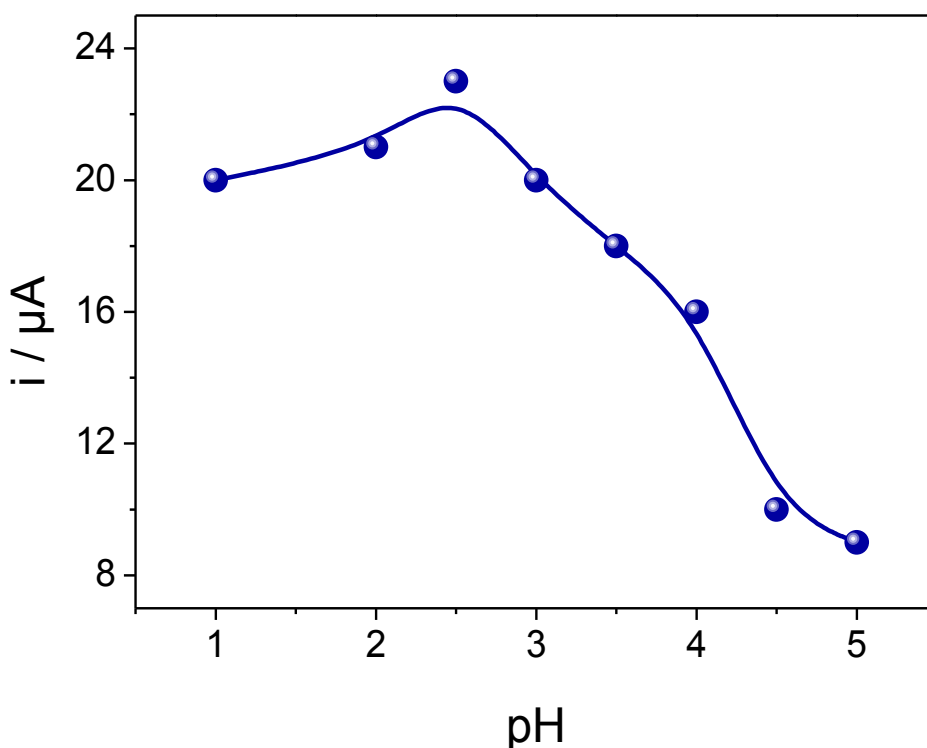


Figura 47. Otimização do pH do eletrólito para o sensor biomimético proposto, na presença de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HXZ.

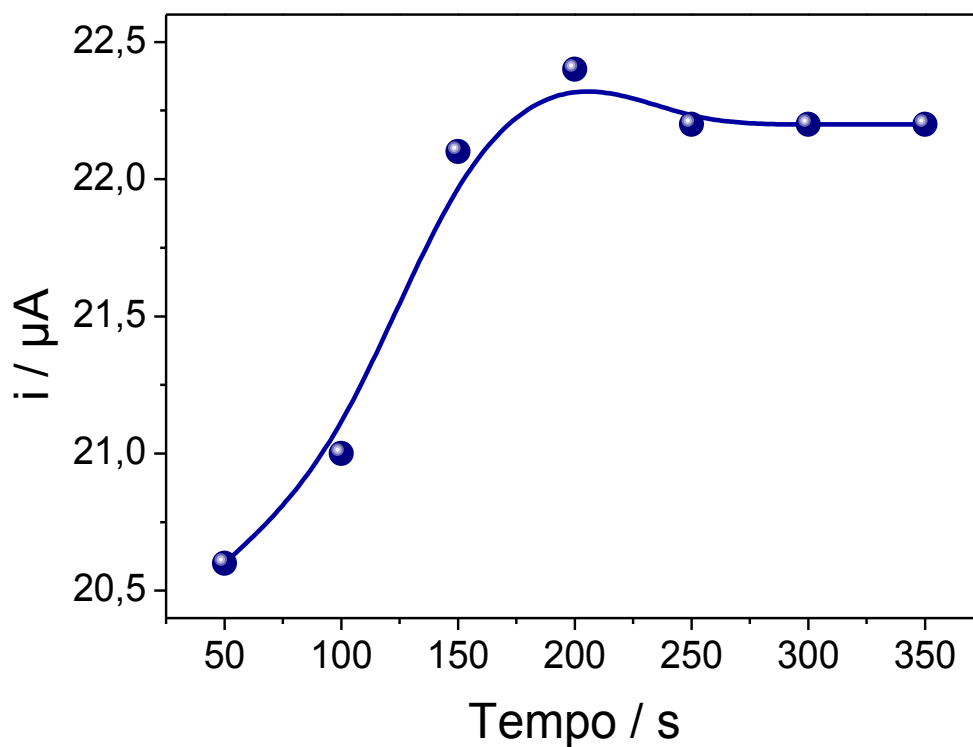


Figura 48. Otimização do tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ) na SWV para o sensor biomimético proposto. Análise realizada na presença de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HXZ, em solução de HCl com pH 2,5, agitação da solução de 200 s e potencial de acumulação ( $E_{ac}$ )  $-0,5$  V.

### 3.2.3.4. PERFIL DE RESPOSTA DO SENSOR

Uma vez otimizada a resposta do sensor, a seguir foi investigada a faixa de resposta, a sensibilidade do sensor e a seletividade frente a outros pesticidas, no intuito de avaliar futura aplicação. A Figura 49 mostra o perfil de resposta típico do sensor construído usando MIP17 seletivo a HXZ.



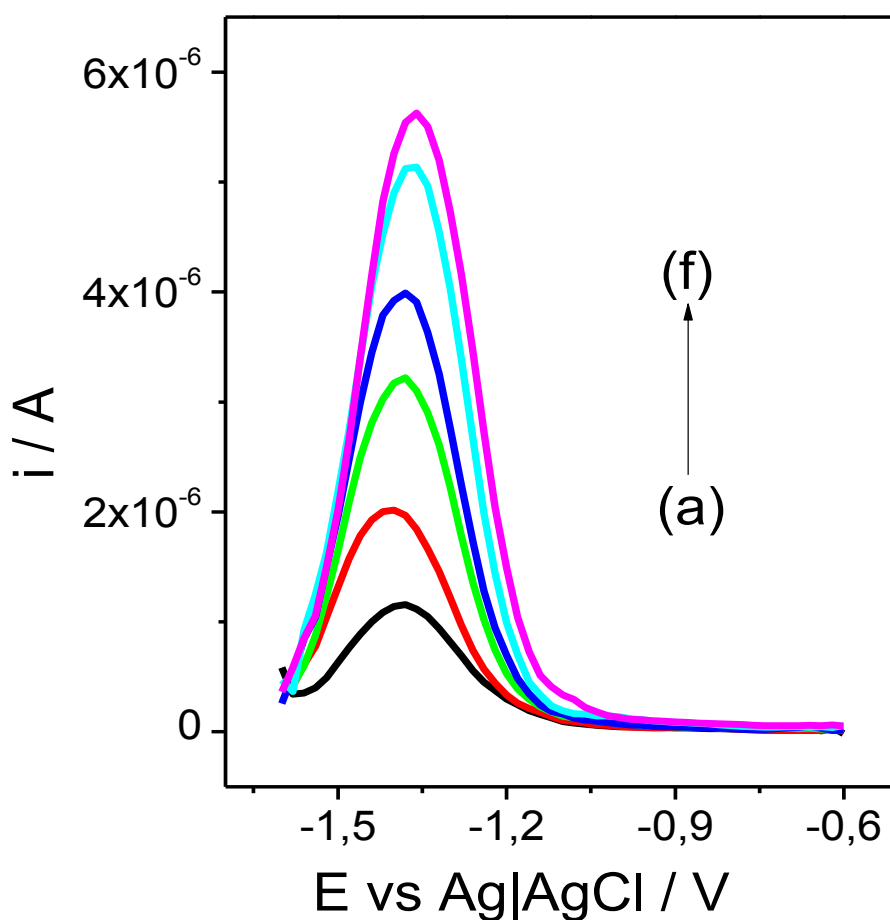


Figura 49. Típicos voltamogramas de DPCSV para HXZ obtidos com o sensor biomimético proposto, nas condições previamente otimizadas. Eletrólito: HCl a pH 2,5;  $t_{ac} = 200$  s;  $E_{ac} = -0.5$  V; velocidade de varredura =  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; amplitude de pulso =  $100 \text{ mV}$  e largura de pulso =  $50 \text{ ms}$ . (a)  $1,90 \times 10^{-11}$ ; (b)  $3,85 \times 10^{-11}$  (c)  $5,66 \times 10^{-11}$  (d)  $7,41 \times 10^{-11}$  (e)  $9,09 \times 10^{-11}$  e (f)  $1,10 \times 10^{-10}$ .

Na Figura 50, mostra-se a correspondente curva analítica obtida com os dados da Figura 49.

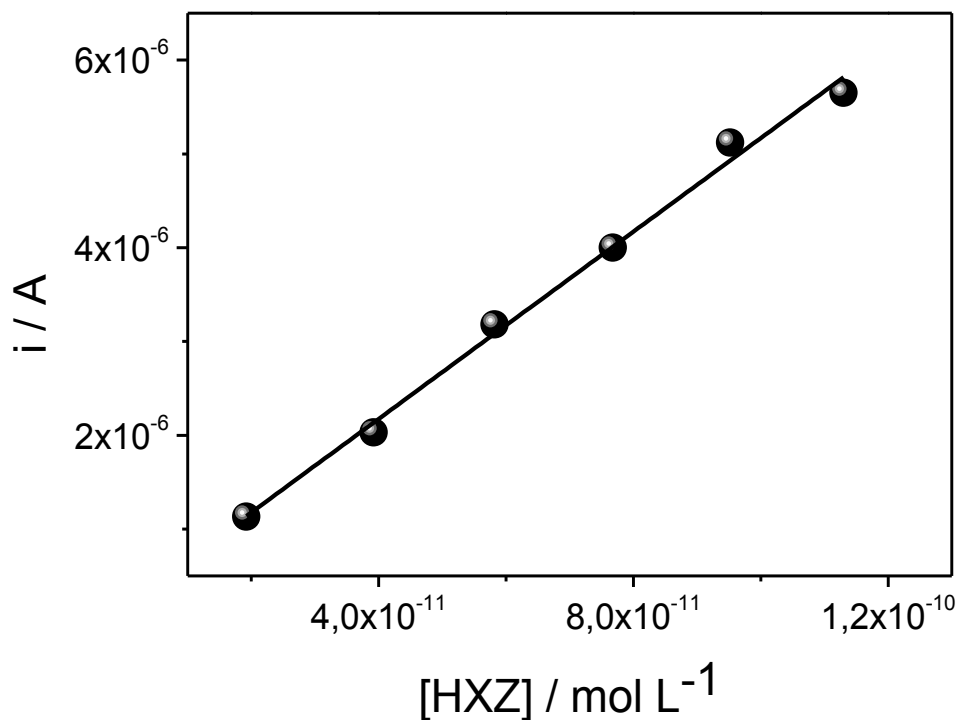


Figura 50. Curva de calibração para HXZ obtida com os dados da Figura 49.

Sob as condições otimizadas obteve-se uma resposta linear para HXZ, de  $2,0 \times 10^{-11}$  até  $1,1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, ajustados pela equação 12, a seguir:

$$I_p = 1,8 \times 10^{-7} (\pm 1,4 \times 10^{-7}) + 49.892 (\pm 1.860) [HXZ] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{eq. 12})$$

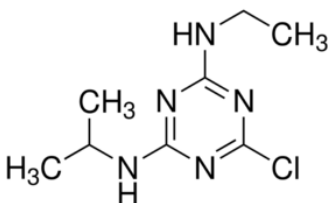
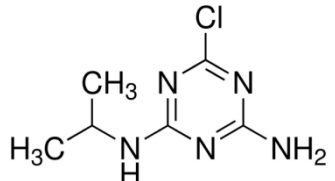
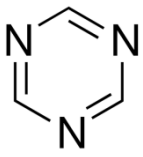
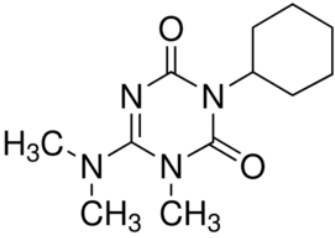
O sensor apresentou um limite de detecção de  $5,8 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> e um limite de quantificação de  $1,9 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos mostram que o sensor proposto é muito sensível para a quantificação do herbicida hexazinona.

### 3.2.3.5. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO SENSOR

Com a finalidade de avaliar a seletividade do sensor proposto foi estudada a resposta do sensor frente a outros três pesticidas da família das triazinas, e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Agrotóxicos analisados no estudo da seletividade.

Estrutura química	Agrotóxicos	Sinal Analítico	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )
	Atrazina	Não	10 <sup>-7</sup>
	Atrazina-desetil	Não	10 <sup>-7</sup>
	S-triazina	Não	10 <sup>-7</sup>
	Hexazinona	Sim	10 <sup>-7</sup>

Pode ser observado que o sensor não apresentou resposta para nenhum dos agrotóxicos testados. Mostrando seletividade em relação a estes tipos de

analitos. Este resultado mostra que mesmo para moléculas com estrutura química muito parecidas à HXZ o sensor é seletivo devido à seletividade do MIP.

Os resultados apresentados mostram que o sensor desenvolvido, além de ser extremamente sensível, é altamente seletivo, mostrando resultados melhorados em relação a biossensores enzimáticos para pesticidas, os quais são pouco seletivos.

### **3.2.4. Aplicação do MIP17 em amostras de interesse ambiental em água proveniente de uma plantação de cana-de-açúcar**

#### **3.2.4.1. APLICAÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO**

As amostras de água foram coletadas na região de uma plantação de cana-de-açúcar de um sítio localizado na região de Araraquara do estado de São Paulo no Brasil. Após a coleta das amostras, estas foram enriquecidas com HXZ na concentração de  $6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e, em seguida, analisadas pelo sensor biomimético proposto. Para tal, foi usado o método da adição de padrão e calculada o valor da recuperação do analito.

Após a obtenção da equação da reta correspondente foi obtida uma concentração na cela de  $5,75 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ , que equivale a uma concentração na amostra enriquecida de  $5,75 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  equivalendo a uma recuperação de 95,8%, mostrando o excelente desempenho do sensor, mesmo para concentrações na faixa de nanomolar na amostra.

### **3.2.4.2. APLICAÇÃO DO MIP17 COMO MATERIAL ADSORVENTE EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Finalmente, vista que a aplicação mais comum para os MIPs é na extração em fase sólida, o MIP sintetizado foi avaliado em cartuchos MISPE na mesma amostra avaliada no sensor.

Para isto, 50 mg de MIP17 limpo e seco foram empacotados cuidadosamente em cartuchos SPE de 6 mL de capacidade. A seguir, foram passados 5 mL de metanol e 5 mL de tolueno como finalidade de condicionar o material adsorvente. Seguidamente, os cartuchos foram submetidos a fluxo de ar comprimido para secagem do MIP17, e então, foram lentamente adicionados, na vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, 100 mL da amostra de água enriquecida com 10 mg L<sup>-1</sup> de HXZ. Na etapa seguinte o cartucho foi lavado 5 vezes com 5 mL de metanol para tirar os interferentes e o analito foi eluído com 10 mL de solução de MeOH : ácido acético (60/40, v/v). Os eluatos foram evaporados com fluxo de nitrogênio e reconstituídos com 10,0 mL metanol, pré-concentrando a amostra em 10 vezes. Finalmente, as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência e monitoradas a 240 nm. A Figura 51 mostra a curva analítica dos padrões de HXZ no cromatógrafo.

Os resultados mostraram uma recuperação de 84% para os 10 mg L<sup>-1</sup> extraídos (Figura 52), o qual mostra a alta eficiência deste MIP17 como material adsorvente em SPE.

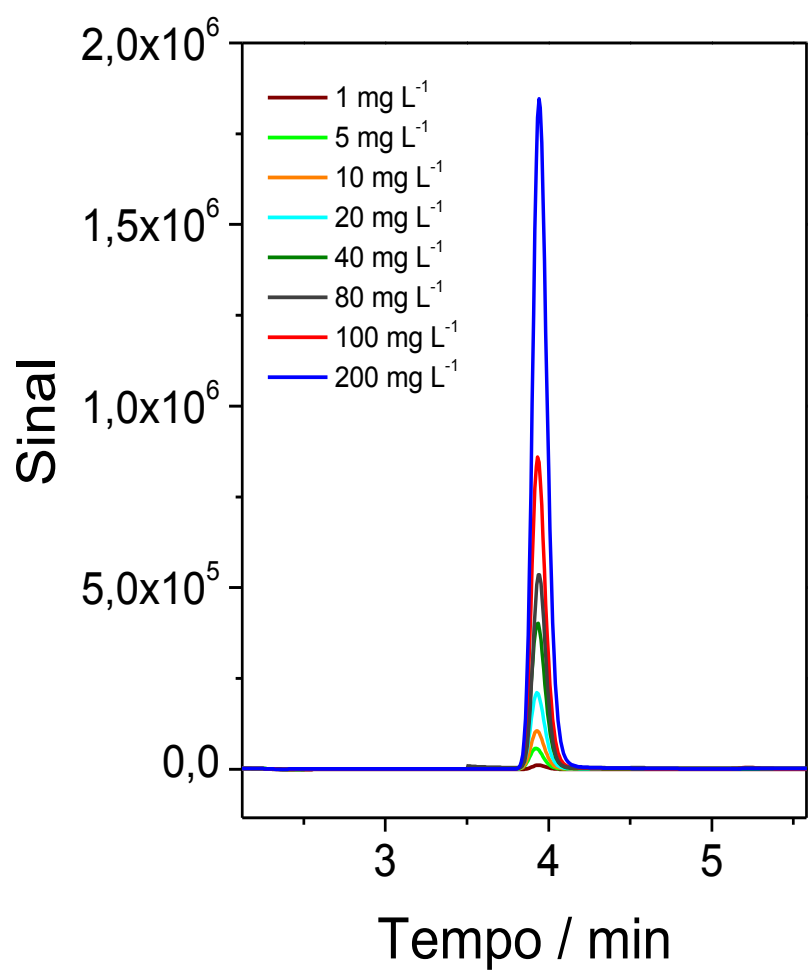


Figura 51. Cromatogramas obtidos para padrões de HXZ, tal como descrito na parte experimental.

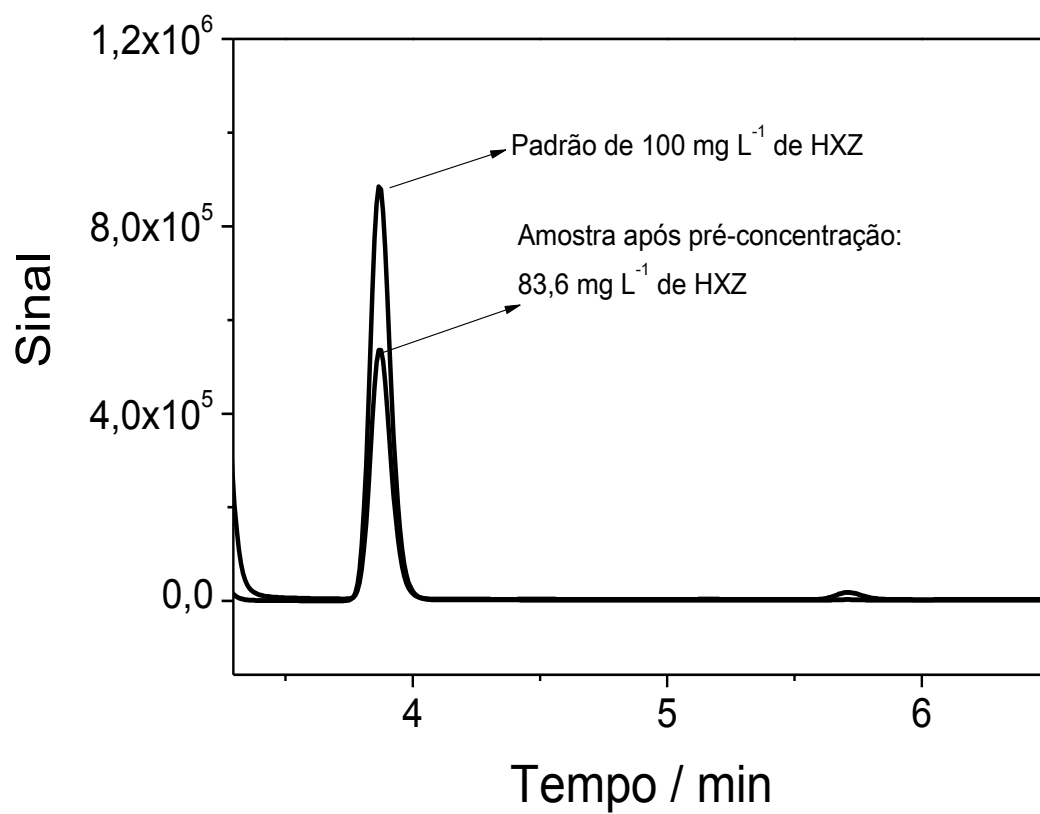


Figura 52. Cromatogramas comparativos para um padrão de 100 mg L<sup>-1</sup> de HXZ e o cromatograma resultante da aplicação do MIP17 como MISPE, após pré-concentração de 10 vezes.

# CAPÍTULO 4



## 4- CONCLUSÕES

---

1. Esta tese de doutoramento, mostrou o desenvolvimento satisfatório e aplicabilidade de sensores à base de enzima POD extraída de extrato vegetal (açai) e de polímero biomimético (MIP) para detecção sensível e seletiva de hexazinona.
2. A aplicação satisfatória da enzima peroxidase (POD) extraída da polpa de açai na construção de biossensores é inédita na literatura, e abre caminho para o estudo de outras fontes naturais da região norte do Brasil, aproveitando a grande diversidade existente no país, visando o aproveitamento de fontes enzimáticas de baixo custo.
3. Para o desenvolvimento do sensor biomimético, à base de MIP seletivo à HXZ, foi usada com sucesso a simulação computacional no auxílio da escolha do melhor monômero para obtenção do MIP com melhor desempenho no reconhecimento molecular do analito. Este procedimento, ajudou na economia de tempo e reagentes, assim como na diminuição de resíduos que seriam gerados durante a otimização do MIP. Os sensores construídos usando este MIP, mostraram um excelente desempenho no que diz respeito à detecção de HXZ em níveis de concentração nanomolar e na seletividade.

4. Dos sensores construídos para HXZ, o sensor biomimético mostrou melhor desempenho permitindo a detecção deste analito com  $10^6$  unidades menor de concentração. Isto é, um LOQ de  $6,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para o biossensor à base de licor de açaí contra  $5,8 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$  para o sensor à base de MIP. Mostrando que sistemas de análise baseados em compostos biomiméticos oferecem uma alternativa real na obtenção de sensores com alto desempenho.

## REFERÊNCIAS

---

1 GALLI, A.; SOUZA, D.; 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.

2 CANTARUTTI, T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

3 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Segundo levantamento da safra brasileira 2011/2012 de cana-de-açúcar e sua destinação (açúcar, álcool e outros). **Boletim Técnico**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/canabweb/download/safra/BoletimCanajaneiro2011-12.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

4 COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B. do.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

5 PACAKOVA, V. K.; STULIK, J.; ISKRA, J. High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. **Journal Chromatography A**, v. 754, p. 17-31, 1996.

6 POZZEBON, J. M.; QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F. C.; KAPOR, M. A.; JARDIM, I. C. S. F. J. Application of new high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction materials to the analysis of pesticides in human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1/2, p. 381-387, 2003.

7 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.

8 SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, p.790-794, 2004.

9 PRICHARD, T.; TROIANO, J.; GUO, F.; CANEVARI, M. Movement of diuron and hexazinone in clay soil and Infiltrated pond Water. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, n.12. p. 2005-2017, 2005.

10 EGGINS, B. R. **Biosensors an introduction**. Chischester: John Wiley & Sons,1997. p. 212.

11 WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 47-53, 1999

12 FATIBELLO FILHO, O. E.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova** v.15, n. 1, p. 28-39, 1992.

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

14 ORELLANA. G.; HAIGH, D. New trends in fiber-optic chemical and biological sensors. **Current Analytical Chemistry**, v. 4, p. 273-295, 2008.

15 DEISING, A. K.; THOMPSON, M. Biosensors for the detection of bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 69-67, 2004.

16 FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

17 LEHNINGER, A. **Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher,1986. 262 p.

18 CONN, E. E.; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. 4. ed . São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 525 p.

19 ROBINSON, D. S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: FOX, P. F. **Food enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. p.399-426.

20 VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

21 ULIANA, C. V.; RICARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5 - aminossalicílico. **Ecletica Química**, v. 33, n.1, p. 57-62, 2008.

22 FERAPONTOVA, E. E.; GRIGORENKO, V. G.; EGOROV, A. M. P-chip and P-chip bienzyme electrodes based on recombinant forms of horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. **Biochemistry**, v. 66, p. 832-839, 2001.

23 DAMOS, F. S.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Iron (III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: an amperometric sensor for phenolic compound determinations. **Analyst**, v. 128, p. 255-259, 2003.

24 ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

25 BUCK, S.; STEIN, K.; SCHWEDT, G. Use of a peroxidase reactor in flow injection analysis for the determination of chloramine and the inhibition kinetic. **Analytical Chimica Acta**, v. 390, p.141-146, 1999.

26 YULAEVA, M. F.; SITDIKOVA, R. A.; DMITRIEVA, N. M.; YAZYNINAB, E. V.; ZHERDEVB, A. B.; DZANTIEVB, B. B. Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v 75, p.129-135, 2001.

27 MONTEIRO, S. Açaí: da fruta exótica a vedete de consumo. **Frutas e Derivados**, v. 1, n. 2, p. 29-32, 2006.

28 ROGEZ, H. **Açaí**: preparo composição e melhoramento da conservação. Belém: Ed. UFPA, 2000. 360p.

29 FURTADO, M. **Açaí, você conhece os benefícios dessa fruta**. 2011. Disponível em: < <http://kjnutricional.wordpress.com/2011/12/13/acai-voce-conhece-os-beneficios-dessa-fruta>>. Acesso em: 7 ago. 2014.

30 BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa n. 12, de 10 de setembro de 1999. Estipula o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para o açaí. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 jan. 2000. Disponível em: <[www.ibravin.org.br/public/upload/legislation/pdf](http://www.ibravin.org.br/public/upload/legislation/pdf)>. Acesso em: 07 ago. 2014.

31 TREVAN, M. D. **Immobilized enzymes**: an introduction and applications in biotechnology. New York: John Wiley & Sons, 1980. 250 p.

32 DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

33 ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQGBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.

34 OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

35 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica, parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p.1076-1086, 2005.

36 TARLEY, L. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica, parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p.1087-1101, 2005.

37 MARTÍN-ESTEBAN, A.; FRESENIUS, J. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n.7, p. 795-802, 2001.

38 AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ RODRÍGUEZ, J. L.; DÍAS GARCÍA, M. E. Molecularly imprinted polymers and optical applications: critical reviews. **Analytical Chemistry**, v 30, p. 291-309, 2000.

39 HAYES, W.; DAVIDSON, L. Molecular imprinting of biologically active steroidal systems. **Current Organic Chemistry**, v. 6, p. 265-282, 2002.

40 CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**, v. 804, n.1, p.173-182, 2004.

41 PRASAD, B. B.; BANERJEE, S. Preparation, characterization and performance of a silica gel bonded molecularly imprinted polymer for selective recognition and enrichment of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Reactive Functional Polymers**, v. 55, p. 159-169, 2003.

42 MATSUI, J.; OKADA, M.; TSURUOKA, M.; TAKEUCHI, T. Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. **Analytical Communications**, v. 34, n.3, p. 85-87, 1997.

43 YE, L.; CORMACK, P. A. G.; MOSBACH, K. Molecular imprinting on microgel spheres. **Analytical Chimica Acta**, v. 435, n.1, p.187-196, 2001.

44 HOSOYA, K.; YOSHIKAWA, K.; TANAKA, N.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; HAGINAKA, J. Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique. **Chemistry Letters**, v. 23, n. 8, p.1437-1438, 1994.

45 YILMAZ, E.; RAMSTRÖM, P.; MÖLLER, P.; SANCHEZ, D.; MOSBACH, K. A facile method for preparing molecular imprinted polymer spheres using spherical silica templates. **Journal of Materials Chemistry**, v.12, p.1577-1581, 2002.

46 YAN, X. P.; LI, Y.; JIANG, Y. Selective measurement of ultratrace methylmercury in fish by flow injection on-line microcolumn displacement sorption pre-concentration and separation coupled with electro thermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2251-2255, 2003.

47 PLUNKETT, S. D.; ARNOLD, F. H. Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports high-performance ligand-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 708, p.19-29, 1995.

48 QUAGLIA, M.; DE LORENZI, E.; SULITZKY, C.; MASSOLINI, G.; SELLERGRÉN, B. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrophoresis. **Analyst**, v.126, p. 1495-1494, 2001.

49 BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 35-44, 2001.

50 TAMAYO, F.G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid phase micro extraction: recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.

51 TUIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. **Analytical Chimica Acta**, v. 668, p.87-99, 2010.

52 CACHO, C.; TUIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 4, p. 376-491, 2003.

53 FRÍAS, S.; RODRÍGUEZ, M.; ACONDE, J. E.; PÉREZ TRUJILLO, J. P. Optimisation of solid-phase microextraction procedure for the determination of triazines in water gas chromatography-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1007, p. 127-135, 2003.

54 GARCIA, R.; CABRITA, M. J.; FREITAS, A. M. C. Application of molecularly imprinted polymers for the analysis of pesticide residues in food a highly selective and innovative approach. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 16-25, 2011.

55 PRIVMAN, M.; ZUMAN, P. The role of protonation, hydration, elimination, and ring opening in the electroreduction of hexazinone, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 455, p. 235-246, 1998.

56 FOGG, A. G.; WANG, J. Terminology and convention for electrochemical stripping analysis. **Pure and applied chemistry**, v. 71, n. 5, p. 891-897, 1999.

57 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. Ed. New York: Wiley, 2001. 833p.

58 GHOLIVAND, M. B.; TORKASHVAND, M.; MALEKZADEH, G. Fabrication of an electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymers for determination of cyanazine in food samples. **Analytica Chimica Acta**, v.713, p.36-44, 2012.

59 MOCCELINI, S. K. **Sensores modificados com monocamadas auto-organizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbe e catequina**. 2011. 138f. Tese (doutorado em Química)- Centro de ciências físicas e matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.



60 ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

61 BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

62 KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, p. 407-410, 1994.

63 CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

64 PILETSKY, S. A.; TURNER, A. P. F. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. **Electroanalysis**, v.14, p. 317-323, 2002.

65 MILANELO, C. H. M. Desenvolvimento de polímeros moleculares impressos para determinação de agrotóxicos aplicando simulações computacionais. 2011. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

66 SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1779-1794, 2005.

67 CARVALHAL, R. F.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L.T. Polycrystalline gold electrodes: a comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v.17, p. 1251-1259, 2005.

68 OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I .C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

69 ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; ZARE, M.; NOROUZI, P. Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1108-1114, 2012.

70 FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p.60-68, 2006.