Universidade Estadual Paulista / UNESP

Campus de Araraquara

Departamento de Química Analítica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ALIMENTOS

GLAUCO PILON DOS SANTOS

Araraquara

2012

GLAUCO PILON DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profª. Drª. Hideko Yamanaka

Coorientador: Dr. Gustavo Stoppa Garbellini

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Glauco Pilon dos
S231d Desenvolvimento de sensor biomimético para detecção de resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos em alimentos / Glauco Pilon dos Santos. – Araraquara : [s.n], 2012
103 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Hideko Yamanaka
Coorientador: Gustavo Stoppa Garbellini

1. Química analítica. 2. Pesticidas. 3. Alimentos. 4. Modelagem molecular. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

GLAUCO PILON DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 29 de junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Wendel Andrade Alves
Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC, Santo André

"Um sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas um sonho que se sonha junto é realidade"

Raul Seixas

Aos meus pais Luis e Rosmary,
minha irmã Glauce
e a toda minha família,
que sonharam junto comigo
e hoje compartilham desta realidade,
dedico este trabalho.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante”

Charles Chaplin

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

À Deus, por conduzir meus passos e me dar força, saúde, além de estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Luis e Rosmary, pelo amor, dedicação, incentivo e apoio em todas as etapas de minha formação pessoal e profissional, contribuindo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha irmã Glauce, aos meus avós e a toda minha família por sempre acreditarem em meu potencial e por me incentivarem durante toda minha caminhada.

À Profª. Drª. Hideko Yamanaka, pela amizade, atenção, apoio, incentivo, confiança, ensinamentos e orientação, me proporcionado as melhores oportunidades que um aluno poderia ter.

Ao Dr. Gustavo Stoppa Garbellini e Dr. Antonio Ap. Pupim Ferreira pela coorientação, paciência, conhecimentos transmitidos e dedicação em todas as etapas de minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, por toda disponibilidade e compromisso nesta etapa de minha formação acadêmica.

À Profª. Drª. Maria Valnice Boldrin Zanoni, Profª. Drª. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto e Profª. Drª. Maysa Furlan por todo auxílio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli e Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti, pelas valiosas contribuições no exame geral de qualificação.

À Profª. Drª. Giovanna Marrazza e Prof. Dr. Dario Compagnone pela oportunidade, atenção e profissionalismo com que conduziram meu estágio na Università Degli Studi di Firenze e Università Degli Studi di Teramo, Itália. Aos integrantes dos grupos pela recepção, amizade e

intensa colaboração durante a realização da pesquisa: Andrea, Simona, Maria Laura, Ambra, Diego, Ilaria, Serena, Sara, Giuseppe, Irene, Georgia, Umberto, Alessia, Valentina, Fabrizio, Carlo, Loris, Flavio, Nicola, Marco, Roberto, Elisabetta, Marta. A tutti, grazie mille!!

Aos amigos do Laboratório de Eletroanalítica: Thaís, Ricardo, Fabiana, Daniela, Juliano, Carol Uliana, Carol Rocha, Josiel, Luciana, Tuane, Thiago, Michelle Castilho, Michelle Brugnera e a todo o grupo, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da Rep. Descolados, Miguel, Jefferson e Marcelo, que contribuíram para que estes dois anos de pós-graduação fossem muito gratificantes em questão de amizade, companheirismo, convivência e aprendizado.

Aos amigos Harry, Luciano, Naira e Juliana, que torceram pelas minhas vitórias, me incentivaram em todos os momentos e que estarão sempre ao meu lado.

Aos amigos de Danúbio Azul por fazer das viagens para Araraquara um momento de muitas conversas e diversão: Tháila, Jaqueline, André, João Pedro e Gabi.

Aos amigos Mari Bizari, Fabi, Andressa (Blossom), Mari Fonseca e Leonardo por todos os momentos de alegria, descontração e companheirismo durante o mestrado.

Às funcionárias da Seção Técnica de Pós-Graduação e da Biblioteca pela eficiência e por estarem sempre dispostas a ajudar e informar.

A todos os funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela infra-estrutura e excelência na formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e FP7 pelo apoio financeiro em meus projetos científicos.

Curriculum Vitae

DADOS PESSOAIS

Nome: Glauco Pilon dos Santos

Data de Nascimento: 03 de janeiro de 1986

Naturalidade: Limeira/SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Pai – Luis Antonio dos Santos

Mãe – Rosmary Aparecida Pilon dos Santos

Endereço para correspondência:

Rua Bahia, 503 – Jd. S. Manoel – CEP: 13480-520 – Limeira/SP

E-mail: glauco_pilon@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA / TITULAÇÃO

ENSINO SUPERIOR

- Graduação

Bacharelado em Química Tecnológica – Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus de Araraquara/SP.

Conclusão: Dezembro/2009

Iniciação Científica: Departamento de Química Analítica – Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus de Araraquara/SP, sob orientação da Profª. Drª. Hideko Yamanaka.

Projetos:

1) "Investigação espectrofotométrica de interação entre complexos metálicos com DNA"

Período: Janeiro/2007 a Setembro/2007

2) “Imobilização da proteína estreptavidina em matrizes híbridas orgânicas-inorgânicas por processo sol-gel”
Período: Outubro/2007 a Julho/2009
Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

3) “Resistive pulse sensors”
Programa Piloto de Intercâmbio de Iniciação Científica para Bolsistas da Área de Química, realizado na *University of Florida – Center for Research at the Bio/Nano Interface, Gainesville, FL/USA*, sob orientação do Prof. Dr. Charles R. Martin.
Período: Janeiro/2009 a Março/2009
Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), *National Science Foundation* (NSF)

- Pós-graduação
Mestrado em Química – Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus de Araraquara/SP, sob orientação da Profª. Drª. Hideko Yamanaka e coorientação do Dr. Gustavo Stoppa Garbellini.
Conclusão: Junho/2012

Projetos:
1) “Desenvolvimento de sensor biomimético para detecção *screening* de resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos em alimentos”
Período: Março/2010 a Junho/2012
Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. nº. 2010/04663-6)

2) “Gold nanoparticles layer on gold CDtrode: A promising platform for amplified electrochemical detection of pesticides”, sob orientação do Prof. Dr. Dario Compagnone e da Profª. Drª. Hideko Yamanaka, e coorientação do Dr. Giuseppe Christian Fusella, na *Università Degli Studi di Teramo*, Teramo, Itália.
Período: Março/2011 a Abril/2011
Financiamento: 7th framework programme, Marie Curie Actions, International research staff exchange scheme (PIRSES-GA-2008-230849)

3) "Label-free impedimetric electrochemical immunosensor for tumor marker (CA125) based on nanostructured screen-printed graphite electrode", sob orientação da Profª. Drª. Giovanna Marrazza e da Profª. Drª. Hideko Yamanaka, e coorientação do Dr. Andrea Ravalli, na *Università Degli Studi di Firenze*, Firenze, Itália.
Período: Maio/2011 a Julho/2011
Financiamento: 7th framework programme, Marie Curie Actions, International research staff exchange scheme (PIRSES-GA-2008-230849).

DISCIPLINAS CURSADAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

DISCIPLINA	CRÉDITOS	CONCEITO
Quimiometria	**12**	**A**
Enzimas na indústria de alimentos, cinética e imobilização	**3**	**A**
TE: Novas técnicas de imobilização multipontual de enzimas	**2**	**A**
Enzima como ferramenta analítica	**8**	**A**
Métodos cromatográficos em análise de alimentos	**4**	**A**
Espectroanalítica molecular	**12**	**A**
TE: Introdução à eletroquímica ambiental	**6**	**A**

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1) RAVALLI, A.; SANTOS, G. P.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. *Gold nanostructures for affinity biosensing applications.* **14th International Conference on Electroanalysis**, 2012, Portorož, Eslovênia.

2) SANTOS, G. P.; FUSELLA, G. C.; SKLADAL, P.; MASCINI, M.; YAMANAKA, H.; COMPAGNONE, D. *Gold nanoparticles layer on gold Cdtrode: A promising platform for amplified electrochemical detection of pesticides*. **IV Workshop del Gruppo Sensori della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana (GS2011)**, 2011, Teramo, Italia.

3) SANTOS, G. P.; FOGUEL, M. V.; GARBELLINI, G. S.; FERREIRA, A. A. P.; SKLADAL, P.; MASCINI, M.; YAMANAKA, H. *Immobilization of oligopeptides on gold gold CDtrode for the development of biomimetic sensor for pesticides.* **9th Spring Meeting off the International Society of Electrochemistry (ISE)**, 2011, Turku, Finlândia.

4) RAVALLI, A.; SANTOS, G. P.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. *Gold nanostructures for affinity biosensing applications.* **XXIV Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana**, 2011, Lecce, Itália.

5) SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; JIN, P.; HORNE, L. P.; ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, Y.; MARTIN, C. R. *Conically Shaped Nanopores: An important analytical tool on the development of nanosensors.* **7th Ibero-American Congress on Sensors (IBERSENSOR)**, 2010, Lisboa, Portugal.

6) SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. *Métodos de Imobilização da enzima peroxidase e estudo sobre a transferência direta de elétrons com eletrodo de grafite.* **XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE)**, 2009, Fortaleza (CE). Anais XVII SIBEE 2009, CD-ROM.

7) SANTOS, G. P.; JIN, P.; HORNE, L. P.; FERREIRA, A. A. P; ZANONI, M. V. B; YAMANAKA, H.; MARTIN, C. R. *Resistive Pulse Sensors.* **International Workshop on Nanomaterials and Functional Materials (WINMF)**, 2009, Campinas (SP).

8) SANTOS, G. P.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B.; FERREIRA, A. A. P.; MARTIN, C. R.; JIN, P.; HORNE, L. P. *Nanocones em membrana de polietileno tereftalato para aplicação em sensores de pulso resistivo.* **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC)**, 2009, São José do Rio Preto (SP). Resumos XXI CIC Unesp, 2009, CD-ROM ISBN 978-85-88792-08-1.

9) SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. *Estudo de diferentes métodos de imobilização da enzima peroxidase em superfície de grafite empregando voltametria de pulso diferencial.* **XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC)**, 2008, São José dos Campos (SP). Resumos XX CIC Unesp, 2008, CD-ROM ISBN 978-85-88792-07-4.

10) SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. *Otimização das condições experimentais na imobilização da enzima HRP sobre transdutor de grafite.* **17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, 2009, Araraquara (SP). Livro de Resumos 17º SBQ-IPWS, 2009, EQ-10.

11) SANTOS, G. P.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. *Potencialidades de complexos de cobre e compostos corantes em estudos de interação com DNA.* **XXXVIII Semana da Química**, 2008, Araraquara (SP).

12) SANTOS, G. P.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. *Estudo espectrofotométrico de interação entre novos complexos de cobre e DNA.* **16º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, 2007, Franca (SP). Livro de Resumos 16º SBQ-IPWS, 2007, QB-06.

PUBLICAÇÕES

1) FOGUEL, M. V.; SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. *Amperometric immunosensor for Chagas disease using CD-R gold transducer.* **Electroanalysis**, v.23, p. 2555-2561, 2011.

ATIVIDADES DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

1) Participação na Química Júnior Projetos & Consultorias (Empresa Júnior - Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus de Araraquara/SP) nos seguintes cargos: Gerente de Projetos (Gestão 2006-2007), Membro do Conselho Fiscal (Gestão 2007/2008) e Vice Presidente (Gestão 2008-2009).

2) Participação no Programa de Ensino de Ciências (PROENC) – Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus de Araraquara/SP, como bolsista do Programa Ciência na UNESP – Projeto de Extensão Universitária voltado para a divulgação científica e cultural da área de Ciências Exatas e da Terra, utilizando recursos computacionais. Julho/2006 a Setembro/2007.

3) Membro da Comissão Organizadora do II, III e IV Dia do Químico – Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus de Araraquara/SP (2007, 2008 e 2009).

PREMIAÇÕES ACADÊMICAS

1) Certificado de Honra ao Mérito à contribuições na empresa de projetos e desenvolvimento em química (2007).

2) Certificado de Honra ao Mérito à contribuições na empresa de projetos e desenvolvimento em química (2008).

3) Destaque dos Destaques do ano de 2008 na Química Júnior Projetos e Consultorias em Química (2008).

4) Classificado em 1º lugar no Programa de Pós-Graduação em Química – Processo Seletivo Mestrado / 2º Semestre (2010).

RESUMO

Enzimas têm sido empregadas na construção de dispositivos para quantificação de substratos por meio de reação catalítica. Tratando-se de moléculas de alto peso molecular e estrutura complexa, tais compostos biológicos podem apresentar instabilidade, além do alto custo de produção. Neste contexto, a utilização de um peptídeo artificial, proposto por estudos de modelagem molecular para mimetizar o sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE), foi uma alternativa investigada para o desenvolvimento de metodologia analítica para detectar pesticidas organofosforados e carbamatos, que em sua maioria apresentam mutagenicidade, elevada toxicidade e são inibidores da AChE, essencial na transmissão de impulsos nervosos.

O trabalho envolveu a síntese, purificação e caracterização de duas sequências peptídicas, SEQPEP1: NH_3^+-EHGGPS-COO^- e SEQPEP2: NH_3^+-CEHGGPS-COO^-, obtidas por meio de metodologia em fase sólida, que apresentaram índice de pureza acima de 95 %, possibilitando aplicação analítica. À sequência peptídica SEQPEP2, foi inserido o aminoácido cisteína com a finalidade de imobilizá-lo de forma ordenada na superfície de ouro. Os estudos espectrofotométricos demonstraram uma forte interação ($K = 4{,}10 \times 10^5\ M^{-1}$) do peptídeo com o pesticida diclorvós e a formação de um complexo com absorção máxima em $\lambda = 250$ nm. Como suporte para a imobilização do peptídeo, foram utilizados eletrodos de ouro à base de discos compactos graváveis (CD-R) (Au-CDtrodos).

As condições experimentais de imobilização do peptídeo foram otimizadas sendo os melhores resultados obtidos com uma concentração de peptídeo de 1×10^{-3} mol L^{-1} e um tempo de incubação de 1 h à 25 ºC. A estratégia de inserir cisteína para imobilizar o peptídeo indicou recobrimento de 68 % da superfície. Demonstrou-se pelos experimentos a viabilidade do monitoramento da interação do peptídeo com o pesticida diclorvós pela inibição do pico de redução da histidina ao redor de -1,2 V. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada foram otimizados para uma maior sensibilidade de detecção e fixados em uma frequência de 250 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de varredura de 10 mV. Para a interação adequada do peptídeo com o pesticida, a pré-concentração deve ser realizada em meio de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0 com um tempo de pré-concentração de 15 minutos.

Com todas as variáveis do sistema otimizadas, construiu-se a curva analítica para o pesticida diclorvós, sendo obtidos limites de detecção e quantificação de $1{,}40 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} e $4{,}66 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}, respectivamente. Demonstrou-se a viabilidade do emprego da metodologia em amostras de cenoura e tomate sem qualquer pré-tratamento das mesmas.

ABSTRACT

Enzymes have been used in the construction of devices to quantify substrate by catalytic reaction. The disadvantages of biological materials as instability and high production cost are well known. Therefore, the design and development of artificial oligopeptides as a mimic of the acethylcholinesterase (AChE) binding site, preserving the highly selective biological properties, was the approach used in this study on the development of an analytical methodology for the detection of organophosphate and carbamate pesticides, because of their mutagenicity, high toxicity and the inhibition of acetylcholinesterase enzyme, which is essential for the transmission of nerve impulses.

This work have involved the synthesis, purification and characterization of two peptide sequences, SEQPEP1: NH_3^+-EHGGPS-COO^- and SEQPEP2: NH_3^+-CEHGGPS-COO^-, obtained by solid phase methodology, which have presented a purity degree above 95 %, enabling the analytical application. A cysteine amino acid was added to the peptide sequence SEQPEP2 in order to self assembly it on the gold electrode surface. The spectrophotometric studies have demonstrated a strong interaction ($K = 4.10 \times 10^5\ M^{-1}$) between the peptide and pesticide dichlorvos, and the formation of a complex with absorption maximum at $\lambda = 250$ nm. As a support for the immobilization of peptide, were used gold electrodes based on recordable compact discs (CD-R) (Au-CDtrodes).

The experimental conditions for the immobilization of the peptide sequence were optimized, being the best results achieved by using a peptide concentration of 1×10^{-3} mol L^{-1} and an incubation time of 1 h at 25 ºC. The strategy to add a cysteine amino acid for the immobilization of the peptide has indicated a surface recovery of 68 %. The experiments have shown the viability of monitoring the interaction between the peptide and pesticide dichlorvos by the inhibition of histidine reduction peak around -1.2 V. The square wave voltammetry parameters were optimized in order to achieve high sensitivity and were fixed in a frequency of 250 Hz, amplitude of 50 mV and scan increment of 10 mV. For an appropriate interaction between the peptide and pesticide, the preconcentration must be done in phosphate buffer solution 0.01 mol L^{-1} at pH 7.0 and a preconcentration incubation time of 15 minutes.

After optimizing all system parameters, the calibration curve was constructed for the pesticide dichlorvos, being obtained limit of detection and quantification of 1.40×10^{-8} mol L^{-1} and 4.66×10^{-8} mol L^{-1}, respectively. The viability to employ this methodology was demonstrated by the application in carrot and tomato samples without any pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula do pesticida diclorvós..... 28

Figura 2. Esquema geral de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas da classe dos organofosforados[23]..... 29

Figura 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina[23]..... 33

Figura 4. Composição dos discos compactos graváveis (CD-Rs)..... 36

Figura 5. Formação da ligação peptídica por condensação. (**Fonte:** Nelson et al. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2011)[71]..... 43

Figura 6. Representação do acoplamento do aminoácido à Resina Wang..... 43

Figura 7. Fórmula estrutural da SEQPEP1..... 44

Figura 8. Fórmula estrutural da SEQPEP2..... 44

Figura 9. Mecanismo de remoção dos grupos Fmoc α-amínicos[73]..... 45

Figura 10. Esquema das etapas de acoplamento e desproteção realizadas durante a SPFS.... 45

Figura 11. Mecanismos de formação da ligação peptídica empregando carbodiimidas e hidroxilaminas, adaptado de Garrido et al.[74]..... 46

Figura 12. Sistema utilizado para a síntese em fase sólida das sequências peptídicas[75]. 47

Figura 13. Reações correspondentes ao teste qualitativo da ninidrina[76]..... 47

Figura 14. Esquema da síntese de peptídeos por meio da metodologia em fase sólida..... 48

Figura 15. Etapas de construção dos Au-CDtrodos..... 50

Figura 16. Cromatogramas obtidos em escala analítica para a sequência peptídica SEQPEP1: (A) peptídeo bruto e (B) peptídeo purificado..... 55

Figura 17. Espectro de massas obtido para a sequência peptídica SEQPEP1..... 55

Figura 18. Cromatogramas obtidos em escala analítica para a sequência peptídica SEQPEP2: (A) peptídeo bruto e (B) peptídeo purificado. 56

Figura 19. Espectro de massas obtido para a fração 1 da sequência peptídica SEQPEP2..... 57

Figura 20. Espectros de UV-Vis das soluções contendo: (▬) pesticida diclorvós 2 x 10^{-3} mol L^{-1}, (▬) peptídeo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} e (▬) peptídeo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} + pesticida diclorvós 8 x 10^{-4} mol L^{-1}. 58

Figura 21. Espectros de UV-Vis das soluções contendo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} do peptídeo e concentrações de pesticida variando de 1 x 10^{-8} mol L^{-1} a 1 x 10^{-3} mol L^{-1}. Inset: Gráfico da absorbância (λ_{250}) em função da concentração de pesticida diclorvós. 59

Figura 22. Curva analítica obtida para o peptídeo. 60

Figura 23. Gráfico da [diclorvós]/ε_{ap} em função da concentração de diclorvós utilizada para o cálculo da constante de interação peptídeo-pesticida. 61

Figura 24. Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo, sem qualquer pré-tratamento da superfície, em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}..... 62

Figura 25. Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 100 mV s^{-1}. 63

Figura 26. Difratogramas de raios X do Au-CDtrodo após a retirada da camada polimérica com a ação do ácido nítrico (▬) e após a limpeza através de ciclagens em ácido sulfúrico 0,5 M (▬)..... 64

Figura 27. Ficha cristalográfica do Au (00-001-1172) segundo a base de dados da PDF..... 64

Figura 28. Ficha cristalográfica do Au_2O_3 (00-043-1039) segundo a base de dados da PDF. 65

Figura 29. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, antes (▬) e após o pré-tratamento da superfície com H_2SO_4 (▬), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}. 65

Figura 30. Imagem de FE-SEM da superfície do Au-CDtrodo..... 66

Figura 31. Espectro de EDX para o Au-CDtrodo..... 66

Figura 32. Imagem de AFM da superfície do Au-CDtrodo: (A) 10x10, (B) imagem em 3D 10x10, (C) 3x3, (D) imagem em 3D 3x3 μm e (E) imagem em 3D 500x500 nm..... 67

Figura 33. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, após o pré-tratamento da superfície com H_2SO_4, em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}. 68

Figura 34. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, sem modificação (▬) e modificado (▬), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}..... 69

Figura 35. Espectros de infravermelho do Au-CDtrodo, no intervalo de 500 a 4000 cm^{-1}, para o eletrodo limpo (▬) e para o eletrodo modificado com o peptídeo (▬). 70

Figura 36. Imagens de FE-SEM da superfície do Au-CDtrodo sem modificação (A) e modificada com a seqüência peptídica (B)..... 71

Figura 37. Espectro de EDX correspondente ao Au-CDtrodo modificado com a sequência peptídica SEQPEP2. 71

Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos para Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} (▬) e em $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo diclorvós 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 500 mV s^{-1}. 72

Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} (▬) e em $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo diclorvós 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; f = 250 s^{-1}, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV..... 72

Figura 40. Mecanismo de redução do pesticida diclorvós[88]..... 73

Figura 41. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} para a superfície eletródica modificada com o peptídeo 1 x 10^{-3} mol L^{-1} (▬), modificada e após a pré-concentração de 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) e 1,0 x 10^{-7} mol L^{-1} (▬) do pesticida diclorvós; f = 250 s^{-1}, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV, pH do eletrólito = 6,0..... 74

Figura 42. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em eletrólito de suporte ($NaClO_4$) (▬) e após a imobilização de 1x10^{-3} mol L^{-1} do peptídeo (▬); f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV e pH do eletrólito = 6,0. Inset: Ajuste da linha de base do voltamograma pelo software GPES 3.0. 75

Figura 43. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o peptídeo imobilizado na superfície do Au-CDtrodo. Curvas correspondentes à corrente: direta (▬), reversa (▬) e resultante (▬)..... 76

Figura 44. Estrutura dos aminoácidos que formam a tríade catalítica da acetilcolinesterase. 76

Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ contendo 1 x 10^{-2} mol L^{-1} de histidina; *f* = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV e pH do eletrólito = 6,0. Inset: Ajuste da linha de base do voltamograma pelo software GPES 3.0..... 77

Figura 46. Gráfico de Pareto: influência das variáveis na imobilização do peptídeo no Au-CDtrodo. 79

Figura 47. Gráfico de tendência: intensidade de corrente para os níveis alto e baixo de cada variável. 79

Figura 48. Efeito do pH do eletrólito ($NaClO_4$) no sinal de corrente do peptídeo imobilizado na superfície do Au-CDtrodo. 80

Figura 49. Influência das frequências (*f*) = 20, 50, 100, 200 e 250 Hz na corrente de pico, mantendo a amplitude e o incremento de potencial constantes em 50 e 2 mV, respectivamente. 81

Figura 50. Influência da amplitude (a) = 10, 30, 50, 70 e 90 mV na corrente de pico, mantendo a amplitude e o incremento de potencial constantes em 250 Hz e 2 mV, respectivamente. 82

Figura 51. Influência do incremento de potencial (ΔE_s) = 2, 4, 6, 8 e 10 mV na corrente de pico, mantendo a frequência e a amplitude constantes em 250 Hz e 50 mV, respectivamente. 82

Figura 52. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo em solução tampão fosfato pH 7,0 (A), em água (B) e em solução de TFE (C)..... 84

Figura 53. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} na ausência (▬) e na presença (▬) de pesticida diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1}; *f* = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 10 mV e pH do eletrólito = 6,0..... 85

Figura 54. Gráfico da intensidade de corrente em função do pH na pré-concentração do pesticida diclorvós. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do pH de pré-concentração. 86

Figura 55. Gráfico da intensidade de corrente em função do tempo na pré-concentração do pesticida diclorvós. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do tempo de pré-concentração. 87

Figura 56. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, sem modificação (▬), modificado com o peptídeo (▬) e após a interação do peptídeo com o pesticida (▬), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}. 88

Figura 57. Curva analítica da porcentagem de inibição em função da concentração do pesticida diclorvós. 89

Figura 58. Fórmula estrutural dos pesticidas utilizados no teste de seletividade. 90

Figura 59. Histograma da intensidade de corrente para o Au-CDtrodo utilizado logo após a imobilização (A) e estocado durante 7 dias: (B) na geladeira, (C) na geladeira em câmara úmida, (D) à temperatura ambiente e (E) à temperatura ambiente em câmara úmida. 91

Figura 60. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} para as amostras de cenoura (A) e tomate (B) na ausência (▬) e na presença (▬) de pesticida diclorvós 5 x 10^{-7} mol L^{-1}; f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 10 mV e pH do eletrólito = 6,0. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis e dois níveis. 51

Tabela 2. Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para a borda externa do CD-R ... 68

Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial completo 2^2 e respectivas intensidades de corrente obtidas 78

Tabela 4. Avaliação da seletividade do sensor biomimético para diferentes classes de pesticidas. 90

Tabela 5. Porcentagens de recuperação do diclorvós em amostras de cenoura e tomate. 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE: acetilcolinesterase

Au-CDtrodos: eletrodos de ouro à base de CD-R

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

OMS: Organização Mundial de Saúde

FAO: *Food and Agriculture Organization*

BPA: Boas Práticas Agrícolas

LMR: Limite Máximo de Resíduos

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

ABRASCO: Associação Brasileira de Saúde Coletiva

SAM (*self assembled monolayer*): monocamada auto-organizada

VC: voltametria cíclica

IR: espectroscopia na região do infravermelho

FE-SEM: microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo

EDS: espectroscopia por energia dispersiva de raios X

DRX: difratometria de raios X

AFM: microscopia de força atômica

SWV (*square wave voltammetry*): voltametria de onda quadrada

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonil

Ser (S): serina

Pro (P): prolina

Gly (G): glicina

His (H): histidina

Glu (E): ácido glutâmico

Cys (C): cisteína

AA: aminoácido

HOBt: N-Hidroxibenzotriazol

DIC: N,N' Diisopropilcarbodiimida

DMF: dimetilformamida

DCM: diclorometano

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: triisopropilsilano

EDT: 1,2-etanoditiol

TFE: trifluoretanol

ACN: acetonitrila

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

SPFS: síntese de peptídeos em fase sólida

SEQPEP1: sequência peptídica 1

SEQPEP2: sequência peptídica 2

ΔE_s: incremento de varredura de potenciais

f: frequência de aplicação de pulsos de potenciais

a: amplitude de pulsos de potenciais

$\Delta E_{p/2}$: largura do pico à meia altura

ICDD: *International Center for Diffraction Data*

PDF: *Powder Diffraction File*

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 Pesticidas 25
1.1.1 Pesticidas organofosforados e carbamatos 27
1.1.1.1 Diclorvós 28
1.1.2 Métodos de determinação de resíduos de pesticida 29
1.2 Modelagem molecular 32
1.3 Eletrodos de ouro 35
1.3.1 Técnicas de caracterização da superfície eletródica 36
2 OBJETIVOS 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1 Reagentes e soluções 40
3.2 Instrumentação 41
3.3 Síntese e caracterização de peptídeos por meio da metodologia em fase sólida 42
3.4 Avaliação espectrofotométrica de interação peptídeo-pesticida 49
3.5 Dicroísmo Circular 49
3.6 Construção de eletrodos de ouro (Au-CDtrodos) 50
3.7 Parâmetros empregados nos estudos por voltametria cíclica 50
3.8 Parâmetros empregados nos estudos por voltametria de onda quadrada 51
3.9 Imobilização do peptídeo sobre a superfície do Au-CDtrodo 51
3.10 Pré-concentração do pesticida diclorvós 52
3.11 Construção da curva analítica para o pesticida diclorvós 52
3.12 Seletividade do sensor biomimético 52
3.13 Estabilidade do sensor biomimético 53
3.14 Aplicação do sensor biomimético em amostras de alimentos 53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
4.1 Síntese e caracterização do peptídeo que mimetiza o sítio ativo da AChE por meio de metodologia em fase sólida 54
4.2 Avaliação espectrofotométrica da interação peptídeo-pesticida 57
4.3 Tratamento da superfície dos Au-CDtrodos 61
4.4 Caracterização da superfície do Au-CDtrodo 66
4.5 Estudo da repetibilidade da área geométrica do eletrodo 68

4.6 Imobilização e caracterização da superfície do Au-CDtrodo modificada com o peptídeo 69
4.7 Resposta eletroquímica do pesticida diclorvós 71
4.8 Estudos preliminares de determinação do pesticida diclorvós através de pré-concentração com o peptídeo imobilizado na superfície do eletrodo 73
4.9 Resposta eletroquímica do peptídeo 74
4.10 Otimização das condições experimentais para a construção do sensor 77
4.10.1 Influência da concentração do peptídeo e tempo de incubação 78
4.10.2 Influência do pH do eletrólito 80
4.10.3 Influência dos parâmetros da voltametria de onda quadrada 80
4.10.3.1 Influência da freqüência (*f*) 81
4.10.3.2 Influência da amplitude de pulso (a) 81
4.10.3.3 Influência do incremento de varredura (ΔE_s) 82
4.11 Dicroísmo Circular 83
4.12 Estudos de pré-concentração do pesticida na superfície do Au-CDtrodo modificado com o peptídeo 84
4.12.1 Influência do meio de pré-concentração 84
4.12.2 Influência do pH na pré-concentração 85
4.12.3 Influência do tempo de pré-concentração 86
4.13 Curva analítica para o pesticida diclorvós 88
4.14 Estudo preliminares de seletividade 89
4.15 Estudo da estabilidade do peptídeo imobilizado na superfície do eletrodo 91
4.16 Aplicação em amostras de alimentos 92
5 CONCLUSÕES 93
6 PERSPECTIVAS FUTURAS 95
REFERÊNCIAS 96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

A agricultura brasileira tem se destacado com números cada vez mais expressivos, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo. A demanda por alimentos faz com que tal crescimento leve também à utilização de maiores quantidades de pesticidas para garantir o aumento na produção agrícola[1], colocando o Brasil como maior consumidor mundial. Mesmo com o melhoramento genético[2-4], outra ferramenta responsável pelos grandes progressos agrícolas, cuja utilização de uma variedade melhorada contribui para o aumento da produção, os pesticidas continuam sendo muito empregados.

No mundo, as perdas anuais devido à ação de pragas na agricultura chegam a 1 bilhão de toneladas, correspondendo a uma redução de 20 a 30% na produção agrícola[5]. Os pesticidas, desde seu desenvolvimento, desempenham um papel importante no crescimento da agricultura moderna. A utilização destes compostos químicos que por um lado gera benefícios, por outro é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos[6].

Pesticidas são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, utilizadas com a finalidade de prevenir a ação, controlar ou eliminar pragas indesejáveis ou prejudiciais à agricultura e à pecuária[7]. De acordo com o organismo alvo, os pesticidas são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, agrotóxicos dentre outros. Com a aplicação exagerada destes produtos químicos nas lavouras no país, o uso de pesticidas está deixando de ser uma questão relacionada especificamente à produção agrícola e se transforma em um problema de saúde pública e de preservação da natureza[8].

Os pesticidas podem ser divididos quanto ao modo de ação entre sistêmicos e de contato[9]. Os sistêmicos são aqueles que, quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais, de forma a se distribuir uniformemente e ampliar o seu tempo de ação. Os de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico. E mesmo estes são também, em boa parte, absorvidos pela planta, penetrando em seu interior através de suas porosidades. Uma lavagem dos alimentos em água corrente só poderia remover parte dos resíduos de pesticidas presentes na superfície dos mesmos.

Neste caso, uma vez contaminados, estes alimentos levarão o consumidor a ingerir resíduos de pesticidas. Assim, sua determinação em alimentos e em amostras ambientais é relevante devido à sua permanência no meio ambiente e ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, podendo apresentar propriedades mutagênicas e carcinogênicas, dependendo da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição durante sua aplicação[10].

Pesquisadores constantemente tem enfrentado o desafio de encontrar formas mais eficientes e sustentáveis de combate às pragas. Tanto em pequenas quanto em grandes áreas, o uso desse tipo de insumo químico requer critérios rígidos, que por sua vez são estabelecidos a partir da interação dos diversos campos do conhecimento, como engenharia, agronomia, física, biologia, química e segurança do trabalho[11].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelo processo de registro de aditivos, pesticidas e drogas veterinárias e pela condução de avaliação do risco da exposição humana a estas substâncias e aos contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - FAO) para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius*[12].

A determinação de resíduos de pesticidas é fundamental para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção com as Boas Práticas Agrícolas (BPA), possibilitando decisões que visam garantir a segurança alimentar[13]. O limite máximo de resíduos (LMR) corresponde à quantidade máxima de pesticida legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg^{-1}).

Atualmente, ações governamentais e também do setor privado estabelecem uma maior importância para a determinação de tais resíduos, sendo que há uma pressão crescente para o aperfeiçoamento do desempenho analítico, exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo das análises, através do desenvolvimento de métodos de ampla aplicação, rápidos, sensíveis e com resultados confiáveis.

Iniciado pela ANVISA em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)[14], tem o objetivo de monitorar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos que chegam ao consumidor e adotar medidas de controle, promovendo a segurança alimentar e evitando possíveis danos à saúde humana. O lado

positivo do PARA é que o diagnóstico sobre os níveis de agrotóxicos presentes em alimentos tem chamado a atenção dos produtores e de autoridades da área agrícola em relação à aplicação desses produtos. Mesmo assim, ainda é grande a quantidade de irregularidades encontradas no uso de agrotóxicos.

Há três anos o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking de consumo de agrotóxicos no mundo. Um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos, segundo alerta feito pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), em dossiê lançado durante o primeiro congresso mundial de nutrição, o World Nutrition Rio 2012[15]. O documento destaca que, enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o brasileiro aumentou 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de liderança, representando uma fatia de quase 20% do consumo mundial de agrotóxicos e movimentando, só em 2010, cerca de US$ 7,3 bilhões, mais que os EUA e a Europa. A grande mensagem do dossiê é que o Brasil conquistou o patamar de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, o que motiva o vínculo da ciência à tomada de decisão política relacionada a seu controle.

Os organofosforados e carbamatos são atualmente os produtos mais usados na agricultura para uma diversidade de culturas, em residências e em animais e no controle de vetores, como pesticidas e praguicidas. Seu uso indiscriminado e a possibilidade de suas fórmulas apresentarem problemas à saúde humana, tais como neurotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alta toxicidade aguda e toxicidade reprodutiva torna extremamente necessário o desenvolvimento de metodologias para a quantificação de resíduos destes compostos[16,17].

1.1.1 Pesticidas organofosforados e carbamatos

Os pesticidas organofosforados[18] possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, por uma dupla ligação. Embora menos persistentes no ambiente que os organoclorados, possuem efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, pois são inibidores irreversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChE), essencial para a transmissão de impulsos nervosos.

Já os carbamatos[19] fazem parte de um grande grupo de praguicidas sintéticos, derivados de ésteres do ácido carbâmico, com substituintes aromáticos ou alifáticos nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. Também são inibidores da AChE, porém, de forma

reversível, devido a formação de um complexo menos estável, permitindo a recuperação da AChE mais rapidamente.

1.1.1.1 Diclorvós

O diclorvós[20], fosfato de dimetil-2,2-diclorovinila, cuja fórmula estrutural está apresentada na **Figura 1**, é um pesticida organofosforado, líquido, de coloração âmbar, apresenta odor característico e é parcialmente solúvel em água (8 mg L^{-1} a 25 ºC). A molécula do diclorvós é estável ao aquecimento e é hidrolisada rapidamente em meio alcalino. Possui efeito muito tóxico, segundo atribuição na classe II em nível de toxicologia de pesticidas.

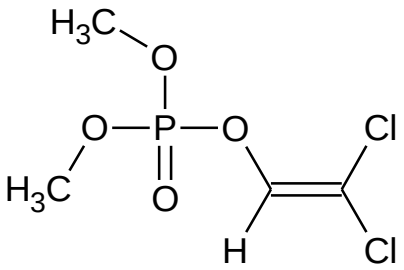


Figura 1. Fórmula estrutural da molécula do pesticida diclorvós.

O principal problema relacionado à utilização deste pesticida é que o emprego exagerado, tanto doméstico em aerossóis, no combate a moscas, baratas e pernilongos, como na agricultura e em formulações de uso veterinário para o controle de vermes, sarnas, carrapatos e piolhos em ovinos, bovinos, equinos, suínos e aves faz com que a contaminação se torne muito frequente. Segundo relatório de atividades da ANVISA divulgado em dezembro de 2011, o pesticida diclorvós, embora seja proibido para qualquer tipo de cultura, foi detectado em amostras de cenoura, maçã, pepino e tomate[21].

Sendo o diclorvós um pesticida muito eficiente, ocasiona intoxicações tanto em animais quanto em seres humanos. Os pesticidas pertencentes as classes dos organofosforados e carbamatos reagem no sítio ativo do aminoácido serina da AChE[22], que decompõe a acetilcolina após a transmissão dos impulsos nervosos de um neurônio a outro. Após a reação com o pesticida, a AChE não pode mais decompor a acetilcolina (**Figura 2**), que se acumula nos receptores sinápticos, impedindo as transmissões nervosas.

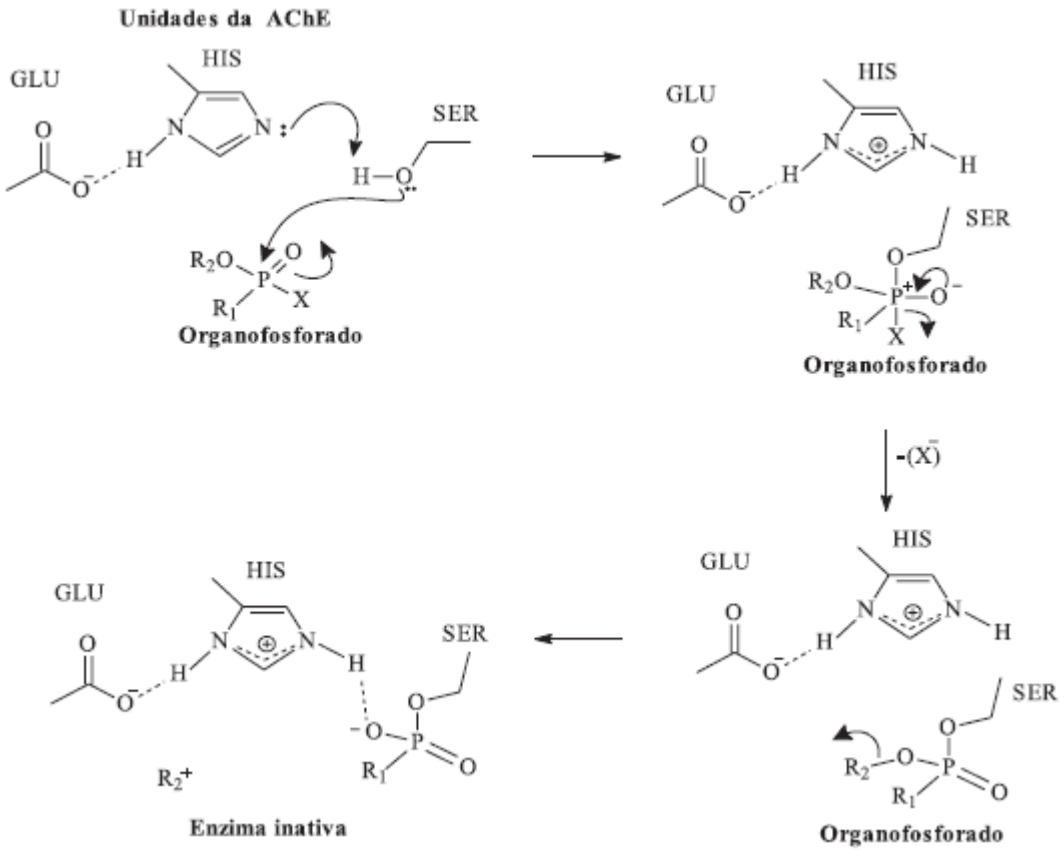


Figura 2. Esquema geral de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas da classe dos organofosforados[23].

Em mamíferos, estes efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores, distúrbios cardiorrespiratórios e morte[24]. O monitoramento destes pesticidas em níveis de traços é de grande importância devido aos efeitos que podem causar.

1.1.2 Métodos de determinação de resíduos de pesticida

A maioria das metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de resíduos de pesticida é baseada em técnicas cromatográficas[25-27], cuja sensibilidade é bastante elevada. Dependendo do tipo de substância a ser utilizada e o detector empregado, podemos obter concentrações que variam de μg a ng L^{-1}. No entanto, na maioria das vezes é necessária a realização de algumas etapas de preparação e pré-tratamento para remoção de interferentes da amostra. Esta etapa geralmente é longa e complexa, o que faz aumentar o tempo e o custo das análises, além do impacto ambiental.

Pérez-Ruiz et al.[28] desenvolveram um sistema automatizado de extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência que levou à determinação de traços de N-metilcarbamatos (bendiocarbe, carbaril, promecarbe e propoxur) em água e alimentos, com um limite de detecção de 3,9 ng L^{-1}. Ma et al.[29] desenvolveram um método rápido e efetivo de determinação de pesticidas organofosforados (diclorvós, metil paration, malation e paration) em águas subterrâneas por extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas, possibilitando atingir limites de detecção na faixa de 4-10 ng L^{-1}.

Wu et al.[30] otimizaram um método de determinação de multiresíduos de pesticidas da classe dos carbamatos em amostras de chá através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Os limites de detecção e quantificação atingiram a faixa de 0,0005-0,023 mg L^{-1} e 0,0008-0,077 mg L^{-1}, respectivamente. Raju et al.[31] desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas para a determinação dos pesticidas organofosforados monocrotofós, clorpirifós e quinalfós em amostra de quiabo. A metodologia se mostrou eficiente e robusta para a determinação do LMR dos pesticidas.

Sinha et al.[32] desenvolveram um sistema de análise empregando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas na determinação de inseticidas e herbicidas organofosforados (quinalfós, triazofós e acefato) em amostras de uva e maçã. O método desenvolvido apresentou limite de detecção na faixa de 0,002-0,087 ng g^{-1}. Liu et al.[33] investigaram um método para determinação de 5 pesticidas da classe dos carbamatos (metolcarbe, carbofurano, carbaril, isoprocarbe e dietofencarbe) em amostras de melancia e tomate por microextração dispersiva líquido-líquido e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, apresentando um limite de detecção na faixa de 0,5 a 1,5 ng L^{-1}.

Outra forma de análise baseia-se na reação catalisada pela AChE. A enzima catalisa a reação de hidrólise da acetilcolina formando colina e ácido acético, sendo que os pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos inibem esta reação. Para que a metodologia seja mais sensível, imobiliza-se a enzima na superfície do transdutor e monitora-se o decréscimo da grandeza física na ausência e na presença do pesticida. O dispositivo no qual a enzima é imobilizada na superfície do transdutor e o sinal biológico da reação com o substrato é monitorado denomina-se biossensor.

Além da acetilcolinesterase, a literatura apresenta alguns artigos a respeito da construção de biossensores baseados em processo de inibição enzimática com outras enzimas, como a colina oxidase, fosfatase, glicose oxidase, lactato desidrogenase, peroxidase,

tirosinase e urease, sendo que a aceticolinesterase tem sido muito explorada principalmente pela sua seletividade e facilidade de obtenção na forma comercial. Os biossensores baseados em enzimas colinesterases mais estudados são os amperométricos, visto que a metodologia possui possibilidades reais de automação e miniaturização. Como suportes, estes sensores têm utilizado grafite, carbono, carbono vítreo, pasta de carbono, nanotubos de carbono, além de metais nobres, como o ouro, sendo tanto na forma de eletrodos convencionais, como de sistemas alternativos, como os do tipo impressos[34].

A aplicação de técnicas eletroanalíticas na análise de amostras complexas tais como amostras biológicas e ambientais algumas vezes requerem etapas de separações químicas. Contudo, são mais simplificadas, de menor custo e menor tempo de análise quando comparadas às metodologias de detecção cromatográfica. Em geral, as respostas obtidas com a utilização de técnicas eletroanalíticas são menos influenciadas pelos interferentes presentes nas amostras, o que tem possibilitado o uso destas técnicas na análise de pesticidas[18].

Raghu et al.[35] desenvolveram um biossensor baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase para determinação dos pesticidas metil paration e monocrotofós em amostras de água e frutas. O sistema apresentou um limite de detecção e quantificação de 0,04 e 47 $\mu g\ L^{-1}$ e 0,14 e 158 $\mu g\ L^{-1}$ para o metil paration e monocrotofós, respectivamente. Sun et al.[36] desenvolveram um biossensor amperométrico para pesticidas organofosforados, por meio da modificação do eletrodo de carbono vítreo com um sistema de duas camadas de membranas (quitosana e azul da Prússia), possibilitando a determinação do pesticida diclorvós com um limite de detecção de 2,5 $ng\ L^{-1}$.

Di Tuoro et al.[37] discutiram a caracterização de um biossensor à base de eletrodo de pasta de carbono contendo a enzima acetilcolinesterase na determinação das concentrações dos pesticidas paraoxon e diclorvós. O sistema desenvolvido apresentou limites de detecção de 0,86 $\mu g\ L^{-1}$ e 4,2 $\mu g\ L^{-1}$ para o paraoxon e diclorvós, respectivamente. Su et al.[38] utilizaram nanopartículas de ouro revestidas com nanocomplexo de silício na melhoria da sensibilidade do sensor eletroquímico baseado na AChE para a determinação do pesticida diclorvós, cujo limite de detecção encontrado foi de 8 $ng\ L^{-1}$.

Chauhan et al.[39] desenvolveram um biossensor amperométrico baseado na enzima acetilcolinesterase imobilizada sob a superfície de eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de óxido de ferro e nanotubos de carbono na determinação dos pesticidas organofosforados malation, clorpirifós, monocrotofós e ensosulfan, cujos limites de detecção foram de 0,1 $nmol\ L^{-1}$ para o malation e clorpirifós, 1 $nmol\ L^{-1}$ para o monocrotofós e 10 $nmol\ L^{-1}$ para o endosulfan.

Song et al.[40] investigaram o desenvolvimento de um biossensor baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com acetilcolinesterase e um híbrido de azul da prússia com quitosana na detecção do pesticida carbaril. A inibição da atividade da acetilcolinesterase pelo carbaril apresentou-se linear na faixa de 0,01 a 0,4 μmol L^{-1} e de 1 a 5 μmol L^{-1}. O limite de detecção encontrado foi de 3 nmol L^{-1}.

Skladal et al.[41] desenvolveram biossensores para determinação de pesticidas carbamatos (aldicarbe, carbaril, carbofurano, metomil e propoxur) em batata e cenoura, baseado em cinco diferentes colinesterases como elemento de reconhecimento e eletrodo impresso como transdutores amperométricos. O biossensor foi utilizado de forma direta sem qualquer pré-tratamento da amostra.

1.2 Modelagem molecular

Uma das dificuldades na comercialização dos biossensores que utilizam a enzima acetilcolinesterase imobilizada em superfícies de eletrodos consiste na estabilidade de estocagem, uma vez que se trata de molécula biológica de alto peso molecular e estrutura complexa. Neste contexto, a utilização de um peptídeo artificial, proposto por estudos de modelagem molecular, e que mimetize o sítio ativo da AChE, é uma alternativa a ser investigada no desenvolvimento de sensores para a determinação de resíduos de pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos em alimentos.

A enzima acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) é um alvo bastante conhecido de muitas substâncias bioativas apresentando diferentes funções, como por exemplo, no tratamento terapêutico do Mal de Alzheimer pelo aumento da concentração da acetilcolina através da inibição reversível da hidrólise pela acetilcolinesterase, e no caso da inibição com pesticidas ocorre a diminuição da atividade enzimática causando falhas na transmissão dos impulsos nervosos[42].

Estudos de modelagem molecular realizados pelo Prof. Dr. Marcello Mascini, da Universidade de Teramo, Itália (UniTE), que atua na área de biomiméticos, levaram à sequência peptídica que mimetiza o sítio ativo da AChE[43] e que apresenta a tríade catalítica (Ser-220; His-440; Glu-327)[44,45], responsável pela interação com o substrato:

SEQPEP1: $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$

O mecanismo de hidrólise da acetilcolina (**Figura 3**) envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina, gerando o intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Em seguida, a serina sofre uma hidrólise, recuperando o sítio catalítico da enzima.

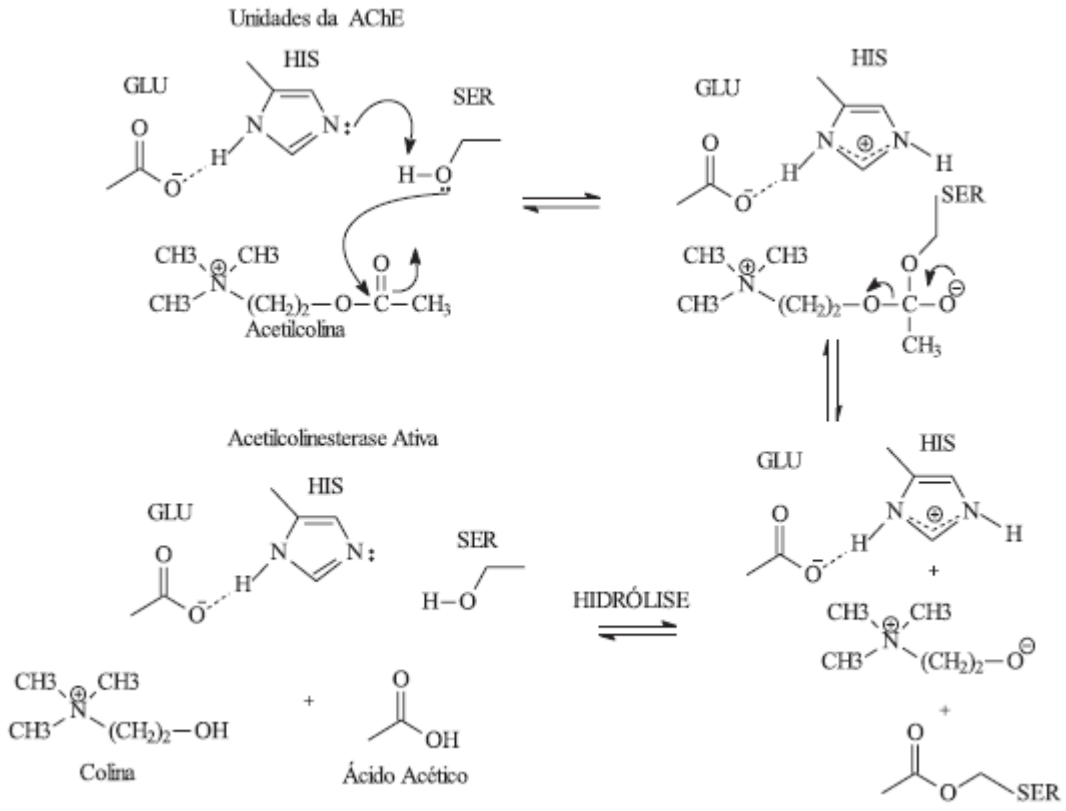


Figura 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina[23].

De uma forma geral, todo tipo de estudo que envolve a aplicação de modelos teóricos utilizando os conceitos de átomo e molécula na descrição de estrutura e propriedades de interesse em química pode ser classificado como modelagem molecular[46].

A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. O processo de desenvolvimento dessas moléculas, devido à sua complexidade, envolve necessariamente o trabalho de uma equipe multidisciplinar, que emprega um grande conjunto de métodos computacionais de modo sistemático de forma a facilitar e otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, em uma constante troca de informações com grupos de síntese química e avaliação da atividade destes compostos[47].

A comparação estrutural entre diferentes moléculas permite a geração de um índice de similaridade que pode ser correlacionado com a atividade biológica. A modelagem molecular também permite a visualização tridimensional do complexo ligante-receptor e fornece informações sobre os requisitos estruturais essenciais que permitem uma interação adequada do ligante. Esta ferramenta também tem o potencial de planejar teoricamente novas moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais para um perfeito encaixe no sítio receptor. Além disso, o conhecimento das conformações mais estáveis permite a sobreposição das mesmas com a conformação do ligante complexado no sítio, antecipando possíveis modificações estruturais que atendam aos requisitos conformacionais essenciais para interação com o receptor[48].

É comum em estudos de compostos bioativos que grandes coleções de estruturas precisem ser avaliadas e uma precisão excessiva pode comprometer um projeto de planejamento de novos bioligantes por causa do tempo envolvido nos cálculos. Muitas vezes, o maior desafio em um estudo de modelagem molecular aplicado no planejamento de compostos bioativos não é o uso dos seus métodos variados, mas sim desenvolver um modelo de trabalho simples, capaz de levar a resultados com rapidez e qualidade suficiente, fornecendo informações sobre o modo de interação e das características físico-químicas que influenciam na afinidade do ligante pelo receptor[47,49].

O presente trabalho propõe a síntese e imobilização do peptídeo que mimetiza o sítio ativo da AChE em eletrodo de ouro (Au-CDtrodo), com fins de construção de dispositivo eletroanalítico para detecção de resíduos de pesticida em alimentos. Como o peptídeo simula o sítio ativo da acetilcolinesterase, sua afinidade por pesticidas deverá proporcionar a pré-concentração do analito de interesse, obtendo-se um eletrodo capaz de operar com baixos limites de detecção e com bom desempenho.

Este conceito apresenta-se como alternativa mais simples e economicamente viável para a construção de sensores mais estáveis e com uma seletividade compatível com a oferecida pelos biossensores enzimáticos convencionais.

O desenvolvimento de sensores a base de compostos biomiméticos vem demonstrando ser uma área bastante promissora no desempenho destes dispositivos, principalmente quanto à estabilidade de estocagem. Dessa forma, este trabalho contribuirá para o *screening* de amostras de alimentos para exportação e também para a melhoria dos produtos fornecidos no mercado interno, atuando na melhoria da qualidade de vida da população.

1.3 Eletrodos de ouro

Superfícies de ouro têm sido amplamente utilizadas como transdutor para a construção de biossensores, devido à excelente capacidade de imobilizar moléculas na presença ou ausência de monocamadas auto-organizadas (*self assembled monolayers* - SAM), sendo que a SAM tem se tornado bastante utilizada, devido à simplicidade, versatilidade e da possibilidade de produzir, em escala molecular, estruturas altamente ordenadas, aproximando o sistema das condições conformacionais ótimas observadas nos ambientes biológicos originais[50].

Monocamadas auto-organizadas à base de enxofre sobre a superfície de ouro são de grande interesse, pois a alta afinidade do grupamento tiol pelo ouro leva à formação de uma ligação S-Au extremamente forte[51]. Os mecanismos para a formação de SAM empregando moléculas com grupamento tiol (**Equação 1**) e dissulfeto (**Equação 2**)[52] sobre uma superfície de ouro estão representados nas equações abaixo:

$$R - S - H + Au_n^0 \rightarrow RS^- - Au^+ \cdot Au_n^0 + \frac{1}{2} H_2 \qquad (1)$$

$$RS - SR + Au_n^0 \rightarrow RS^- - Au^+ \cdot Au_n^0 \qquad (2)$$

Wu et al.[53] utilizaram um peptídeo modificado com um aminoácido cisteína para imobilização em superfície de ouro e formação da SAM de peptídeo no desenvolvimento de um biossensor para reconhecimento de proteínas. Levy[54] demonstrou o design de um pentapeptídeo contendo cisteína em sua composição para a formação da SAM em nanopartículas de ouro, que possibilitou a estabilização das nanopartículas e solubilidade em água, conferindo propriedades análogas de uma proteína.

No presente estudo, a sequência peptídica proposta por estudos de modelagem molecular foi sintetizada adicionando-se o aminoácido cisteína em sua estrutura, como estratégia para a imobilização direta na superfície do eletrodo de ouro, levando à formação de uma SAM de peptídeo:

SEQPEP2: $NH_3^+ - Cys - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$

Eletrodos descartáveis em estudos envolvendo pesticidas são de grande interesse, pois se trata de um dispositivo de baixo custo, de construção simples e rápida, e que pode ser descartado sempre que apresentar algum problema como em casos de formação de óxidos sobre sua superfície ou ainda contaminação. Assim, eletrodos construídos a partir de discos compactos graváveis (CD-Rs)[55-57] de ouro apresenta-se como uma alternativa promissora no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Discos compactos graváveis geralmente possuem de 4 a 5 camadas de material[57] (**Figura 4**). Cada disco contém uma base de policarbonato (a), como suporte mecânico para a unidade, uma camada muito fina de corante (ftalocianina) (b), que é sensibilizada durante o processo de gravação, seguido de uma camada nanométrica de ouro (c) coberta por um ou dois filmes poliméricos (d).

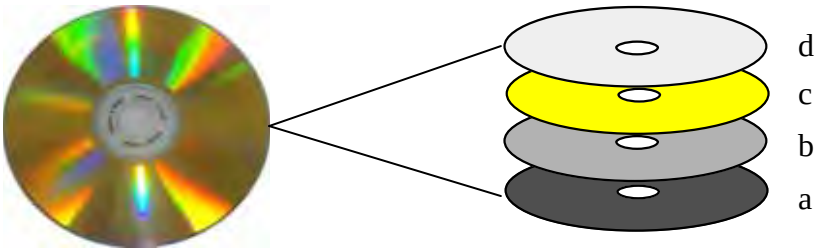


Figura 4. Composição dos discos compactos graváveis (CD-Rs).

Foguel et al.[58] desenvolveram um imunossensor amperométrico para doença de Chagas utilizando como transdutor discos compactos graváveis de ouro modificados com 4-(metilmercapto)benzaldeído para a imobilização da proteína Tc85 de *Trypanosoma cruzi*. Cristea et al.[59] utilizaram eletrodos de ouro à base de CD-Rs para a determinação de mercúrio em amostras de peixe através de injeção em fluxo e detecção por cronopotenciometria.

Paixão et al.[60] demonstraram a fabricação de uma língua eletrônica descartável utilizando um filme de azul da Prússia eletrodepositado em superfície de ouro de CD-R para o reconhecimento de adulteração em leite. Kirkpatrick et al.[61] utilizaram discos compactos graváveis de ouro na fabricação de eletrodos para sistemas de análise através de microchip com detecção amperométrica.

1.3.1 Técnicas de caracterização da superfície eletródica

A superfície do eletrodo, assim como suas modificações, pode ser avaliada empregando-se técnicas eletroquímicas e de análise de superfície. Dentre as técnicas

empregadas na caracterização de monocamadas e da superfície do Au-CDtrodo, pode-se destacar a voltametria cíclica (VC), a espectroscopia na região do infravermelho (IR), a microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FE-SEM), a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS), a difratometria de raios X (DRX) e a microscopia de força atômica (AFM).

A metodologia empregando a técnica de voltametria cíclica é baseada na comparação dos resultados obtidos entre a superfície do eletrodo não modificada e modificada com a monocamada. A extensão da transferência de elétrons entre espécies em solução e a superfície do eletrodo fornece uma idéia da integridade da SAM quanto ao grau de recobrimento da monocamada bem como os defeitos em sua formação (pinholes), que é muito importante para o desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos[62].

A técnica de espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa transformada de Fourier – *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy* (DRIFTS) fornece um espectro vibracional quando a luz incide em uma matriz, penetra na amostra e reflete contendo informações espectrais[63,64]. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, algumas das quais após percorrer o interior de algumas partículas que constituem a amostra.

Na microscopia eletrônica de varredura (SEM)[65] os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição. Quando essa técnica se baseia em fontes de emissão de campo de feixe de elétrons, é chamada de FE-SEM.

Ao FE-SEM pode ser acoplado o sistema de EDS[66], o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semi quantitativa das amostras, à partir da emissão de raios X característicos. Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios X. Um detector instalado na câmara de vácuo do SEM mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais elementos químicos estão presentes naquela amostra.

A DRX[67] é uma das técnicas de análise estrutural mais empregada na determinação das fases cristalinas presentes em materiais. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração. A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina). Dentre as vantagens da técnica de difração de raios X para a caracterização de fases, destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases.

Para a obtenção de imagens topográficas, a partir da microscopia de força atômica[68], é empregada uma sonda constituída de uma fina ponteira (*tip*) acoplada a um “cantilever”, para realizar o rastreamento da superfície da amostra. A deflexão do “cantilever” é a resposta das forças de interações atômicas entre a ponteira e o substrato. À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de "acidentes geográficos" encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto de pesquisa consiste no desenvolvimento de sensor biomimético para detecção de resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos em amostra de alimentos por meio de pré-concentração utilizando peptídeo que mimetiza o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase.

Assim, o desenvolvimento do trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Síntese e caracterização do peptídeo que mimetiza o sítio ativo da AChE por meio de metodologia em fase sólida;
- Estudos espectrofotométricos e cálculo da constante de interação do peptídeo com o pesticida organofosforado diclorvós;
- Construção de eletrodos à partir de CDs graváveis de ouro (Au-CDtrodo) e caracterização da superfície eletródica;
- Avaliação da imobilização do peptídeo na superfície do Au-CDtrodo;
- Otimização das condições experimentais para a imobilização do peptídeo por meio de planejamento fatorial;
- Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (SWV) para a adequação de uma melhor sensibilidade de detecção;
- Avaliação das melhores condições de pré-concentração do pesticida variando o meio, pH e tempo de pré-concentração.
- Construção da curva analítica para o pesticida diclorvós;
- Avaliação da seletividade do sensor para diferentes classes de pesticidas;
- Estudo de estabilidade de estocagem do dispositivo na geladeira e à temperatura ambiente;
- Aplicação do sensor biomimético em amostra de alimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Para a síntese das sequências peptídicas foram utilizados os seguintes reagentes:

Resina (suporte polimérico): Fmoc-Ser(tBu)-WangResina, com grau de substituição inicial de 0,64 mmol/g, obtida da Novabiochem.

Aminoácidos protegidos: todos os aminoácidos utilizados neste trabalho (Pro, Gly, Ser, Cys, Glu, His) apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Esses aminoácidos foram adquiridos da Novabiochem e da Advanced Chem Tech.

A cadeia lateral reativa dos aminoácidos estavam protegidas pelos grupamentos terc-butila (tBu), no caso da serina e do glutamato, e tritila (trt), para cisteína e histidina.

Agentes de condensação: N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) e N,N' Diisopropilcarbodiimida (DIC), adquiridos da Novabiochem e Fluka, respectivamente.

Como reagente para a desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de piperidina da marca Hexis, em dimetilformamida (DMF), previamente tratada com peneira molecular 100-200 mesh para a remoção de qualquer grupo amino livre.

Na clivagem ácida final, utilizou-se ácido trifluoroacético (TFA), adquirido da Fluka, triisopropilsilano (TIS) e 1,2 etanoditiol (EDT), adquirido da Acros.

Os eluentes cromatográficos utilizados foram: acetonitrila (ACN) da marca Mallinchrodt e água ultrapura, obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.

Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF), foram adquiridos da Hexis.

As soluções tampão fosfato de sódio[69] 0,1 mol L^{-1} para os diferentes valores de pH utilizados neste trabalho foram preparadas à partir dos sais Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, fornecidos pela Sigma. A solução de ferrocianeto de potássio (Sigma) 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} foi preparada por diluição em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. As soluções estoque de peptídeo e de perclorato de sódio (Sigma) 0,1 mol L^{-1}, assim como a solução tampão fosfato de sódio e a solução de cloridrato de histidina (Vetec), foram preparadas empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q (ρ = 18,2 MΩ cm).

Na construção dos Au-CDtrodos foram utilizados discos compactos graváveis da marca Mitsui Archive Gold CD-R 100 contendo filme de ouro de espessura de aproximadamente 140 nm. A eliminação das camadas protetoras do filme de ouro do CD-R foi realizada empregando ácido nítrico 69-70% (Acros) e o pré-tratamento eletroquímico dos eletrodos de ouro foi realizado empregando ácido sulfúrico 95-98% (Mallinckrodt).

As soluções estoque dos pesticidas carbaril, diclorvós, acefato, metribuzin e clomazone, obtidos da Sigma, foram preparadas empregando acetonitrila (Sigma). A solução estoque do pesticida metamidofós (Sigma) foi preparada empregando uma solução 70/30 acetonitrila/água. As diluições realizadas em solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0.

As amostras de cenoura e tomate foram adquiridas no comércio local e os extratos foram obtidos em uma centrífuga de alimentos Mondial (CF-02).

3.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram efetuadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 302 com software GPES 3.0 (*General Purpouse Electrochemical System*) para a obtenção dos dados.

Uma célula eletroquímica de compartimento único com volume de 5 mL foi utilizada juntamente com um sistema de três eletrodos: Au-CDtrodo (A_{geom} = 0,071 cm^2), $Ag|AgCl|KCl_{(sat)}$ e fio de platina (A_{geom} = 4 cm^2) como eletrodo de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.

Empregou-se um pHmetro digital da marca Gehaka modelo PG 2000, para a obtenção das medidas de pH. Empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore para a obtenção de água ultrapura (ρ = 18,2 MΩ cm).

As medidas de absorbância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro da Hewlett Packard (HP) modelo 8453 e uma cubeta de quartzo, da marca Hellma, com capacidade de 500 μL e caminho óptico de 1 cm.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por DRIFTS empregando um espectrofotômetro da marca Shimadzu FTIR – 8300 acoplado a um programa HYPER IR 1.51, número de varreduras = 40 na região de 500 a 4000 cm^{-1}.

Análises da superfície do Au-CDtrodo foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura FE-SEM de alta resolução, equipado com fonte de elétrons de emissão de campo, JEOL JSM 7500F, acoplado a medidas de EDS (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*).

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa, utilizando um cromatógrafo System Gold BECKMAN, e coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 2,5 cm; 15 μm; 300 Å). A caracterização foi realizada por CLAE em escala analítica, utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, e coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0,46 cm; 5 μm; 300 Å).

As análises de DRX foram efetuadas em equipamento da marca Siemens modelo D5000 de 4º a 70º, com passo de 0,05º por 1 segundo.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ FLEET (UHPLC-PDA-ESI-IT-MS^n, Thermo Scientific), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção de fluxo contínuo.

As análises de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815, localizado no Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas".

3.3 Síntese e caracterização de peptídeos por meio da metodologia em fase sólida

O método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)[70] baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia polipeptídica presa covalentemente através de seu aminoácido carboxiterminal a sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina polimérica, geralmente de poliestireno), que inertes às condições de reação empregadas, fornecem um sustento físico às moléculas nele ancoradas.

Duas moléculas de aminoácidos podem ser ligadas covalentemente através da formação de uma ligação amídica, denominada ligação peptídica. Essa ligação é formada pela remoção dos elementos da água (desidratação) de um grupo α-carboxil de um aminoácido e o grupo α-amino do outro (**Figura 5**).

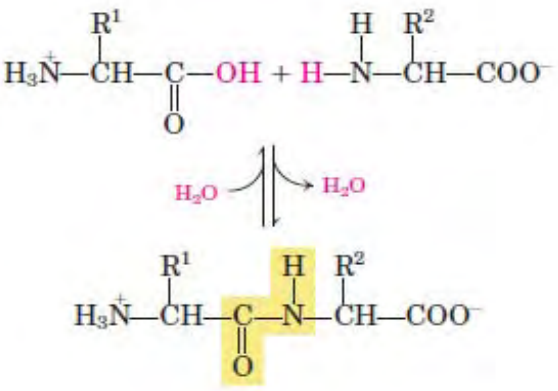


Figura 5. Formação da ligação peptídica por condensação. (**Fonte:** Nelson et al. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2011)[71].

Pode-se descrever uma resina utilizada em suporte sólido como uma estrutura complexa, a qual é formada por polímeros retilíneos compostos por unidades monoméricas constantes, formando uma espécie de rede. Em intervalos aproximadamente regulares surgem funções químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), que podem constituir-se por apenas um átomo ou mesmo serem formadas por moléculas de dimensão considerável com diversos grupos funcionais[72].

Estas estruturas complexas (rede polimérica) são convenientemente representadas por esferas ligadas a funções químicas específicas, as quais por sua vez representam o ligante. A resina utilizada neste projeto de pesquisa (Resina Wang) apresenta uma hidroxila como parte fundamental do ligante (**Figura 6**). A ligação de substratos a este polímero pode ser obtida com o auxílio de um grupo carboxilato ao ligante.

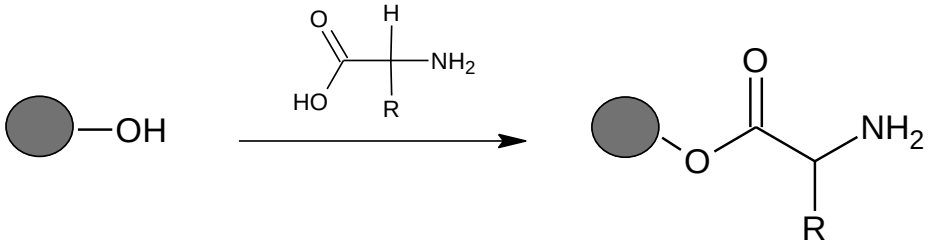


Figura 6. Representação do acoplamento do aminoácido à Resina Wang.

A estratégia de síntese deste trabalho consistiu na utilização do grupamento Fmoc, o qual é base lábil, como protetor temporário do grupo α-amino. No caso específico desta síntese, o primeiro resíduo de aminoácido já estava acoplado à resina através de uma ligação éster ao grupo α-carboxila (Fmoc-Ser(tBu)-WangResina). Após a clivagem final,

realizada por um tratamento ácido, os peptídeos são obtidos com os grupos carboxilatos livres.

Através da metodologia de SPFS, foram sintetizadas duas sequências peptídicas (SEQPEP1 e SEQPEP2), que se diferenciam somente por um resíduo de cisteína, utilizado como estratégia para a imobilização na superfície do Au-CDtrodo. As sequências peptídicas, assim como as respectivas fórmulas estruturais estão ilustradas nas **Figuras 7 e 8**.

SEQPEP 1: $NH_3^+ - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$

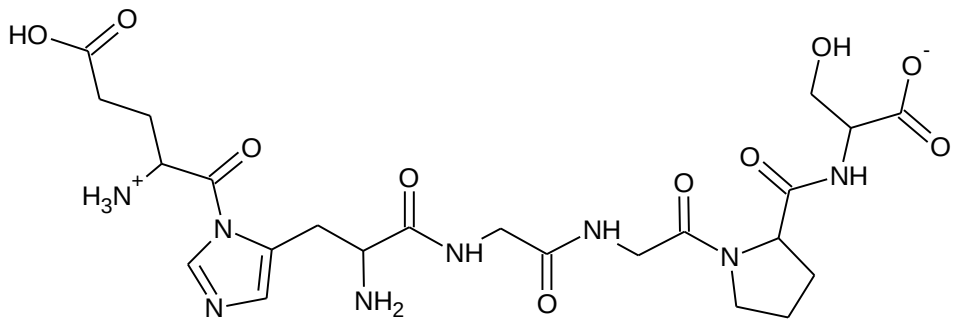


Figura 7. Fórmula estrutural da SEQPEP1.

SEQPEP 2: $NH_3^+ - Cys - Glu - His - Gly - Gly - Pro - Ser - COO^-$

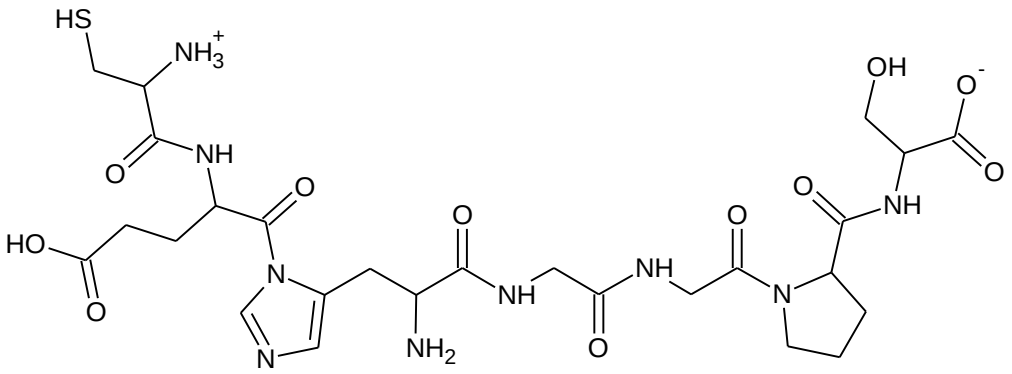


Figura 8. Fórmula estrutural da SEQPEP2.

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, empregou-se o excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os agentes de condensação (DIC/HOBt), em uma mistura de solventes DCM/DMF (1:1), por 2 horas. A remoção dos

grupos Fmoc α-amínicos (**Figura 9**), após acoplamento de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF.

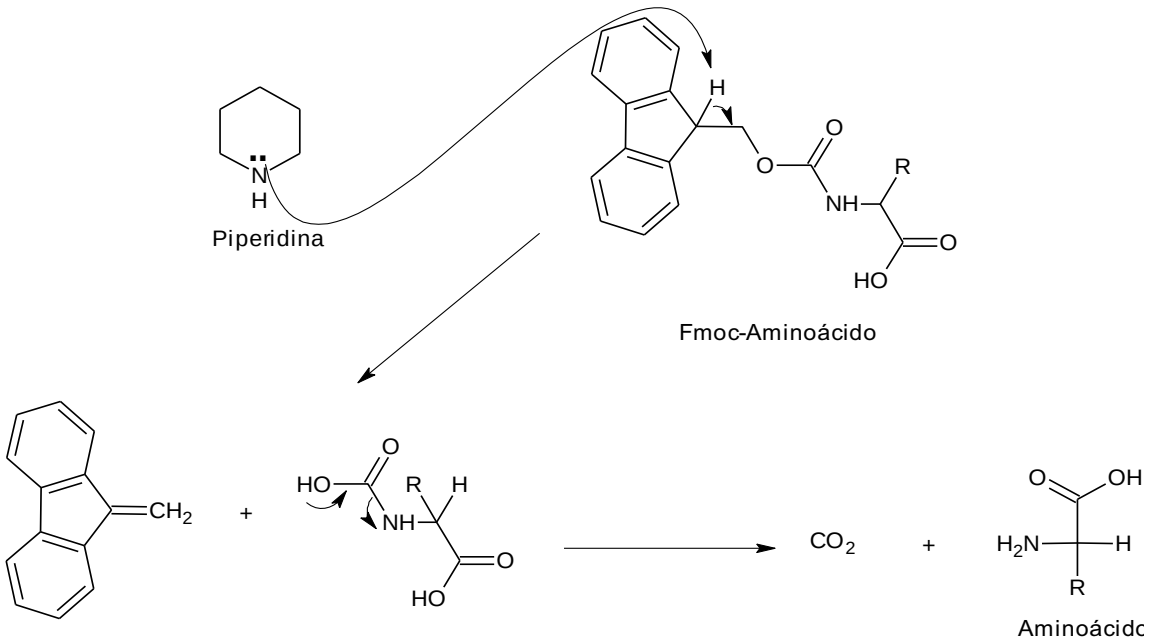


Figura 9. Mecanismo de remoção dos grupos Fmoc α-amínicos[73].

Após a desproteção dos grupos α-amínicos, a remoção da piperidina, assim como dos outros produtos formados, foi realizada por meio de filtração com ciclos de lavagens alternadas entre DMF e DCM. O esquema das etapas de acoplamento e desproteção está representado na **Figura 10**.

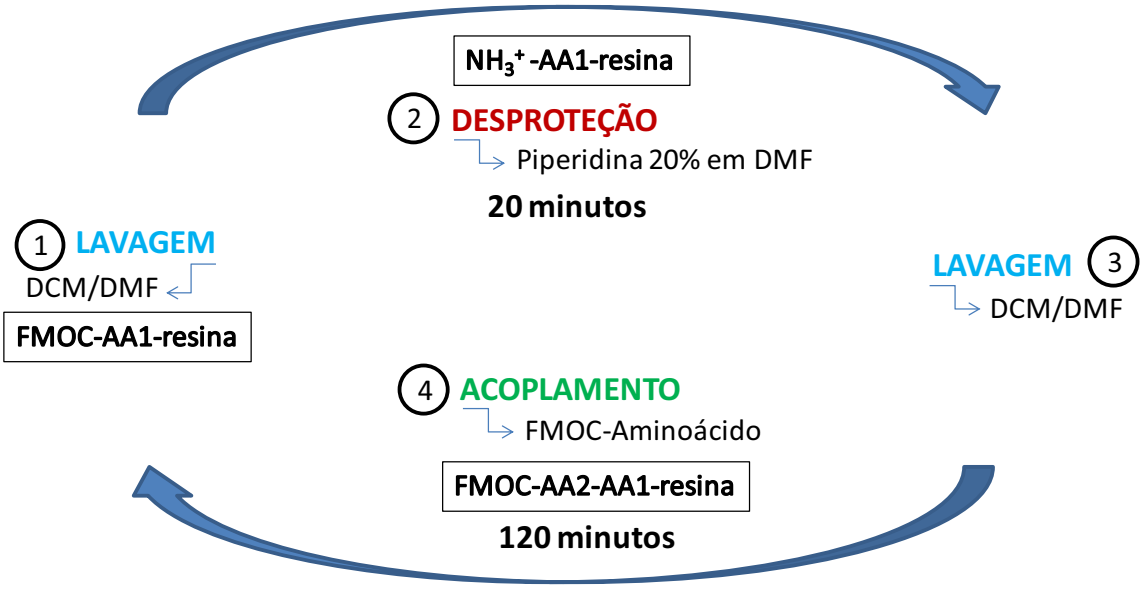


Figura 10. Esquema das etapas de acoplamento e desproteção realizadas durante a SPFS.

O agente de condensação DIC tem a função de reagir com o grupo carboxílico de um aminoácido e gerar espécies reativas (orto-acilisouréia), conforme mostrado na **Figura 11**. Três são as rotas para produzir a ligação amida com outro aminoácido (R^2-NH_2) e formar o peptídeo a partir da o-acilisouréia: 1) por meio de aminólise, 2) empregando um segundo equivalente de ácido carboxílico, onde será formado o anidrido simétrico ou 3) na presença de hidroxilaminas, por exemplo, hidroxibenzotriazol (HOBt), onde será obtido um éster ativo. Qualquer uma das três espécies reativas (orto-acilisouréia, anidrido simétrico ou éster ativo) são bons agentes acilantes.

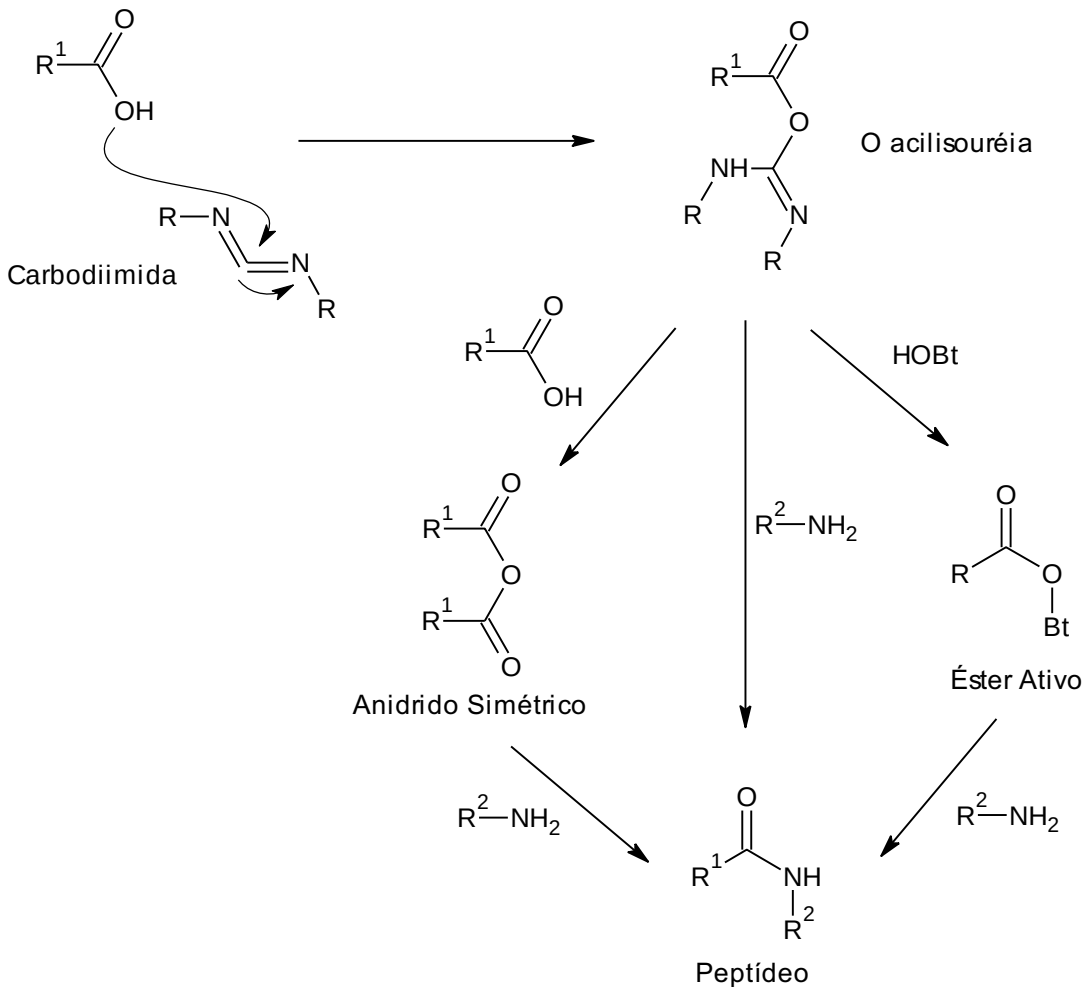


Figura 11. Mecanismos de formação da ligação peptídica empregando carbodiimidas e hidroxilaminas, adaptado de Garrido et al.[74].

Todas as etapas de acoplamento de aminoácidos e desproteção dos grupos α-amínicos foram realizadas num sistema conforme ilustrado na **Figura 12**.

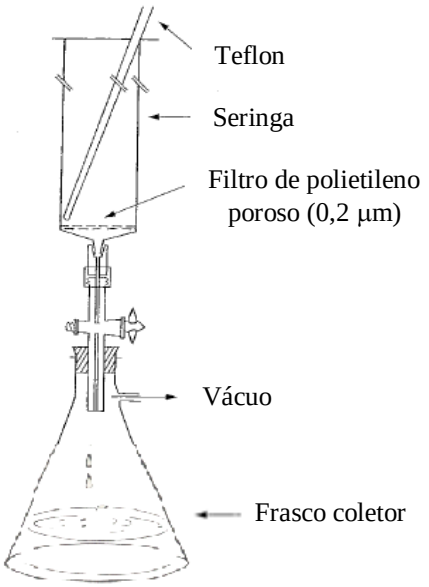


Figura 12. Sistema utilizado para a síntese em fase sólida das sequências peptídicas[75].

A eficiência das etapas de acoplamento foi monitorada pelo teste de ninidrina (**Figura 13**). A ninidrina, em altas temperaturas (120 °C), reage com grupos amino livres, liberando um composto de coloração púrpura (**Equação 3**), com exceção da prolina, que possui uma amina secundária, cujo produto apresenta coloração amarela característica (**Equação 4**). Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, por sua vez, indica a eficácia das etapas de desproteção e acoplamento.

Ao testar a presença de grupos amino livres após a etapa de acoplamento em uma pequena fração da resina, se positivo, o reacoplamento foi realizado com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

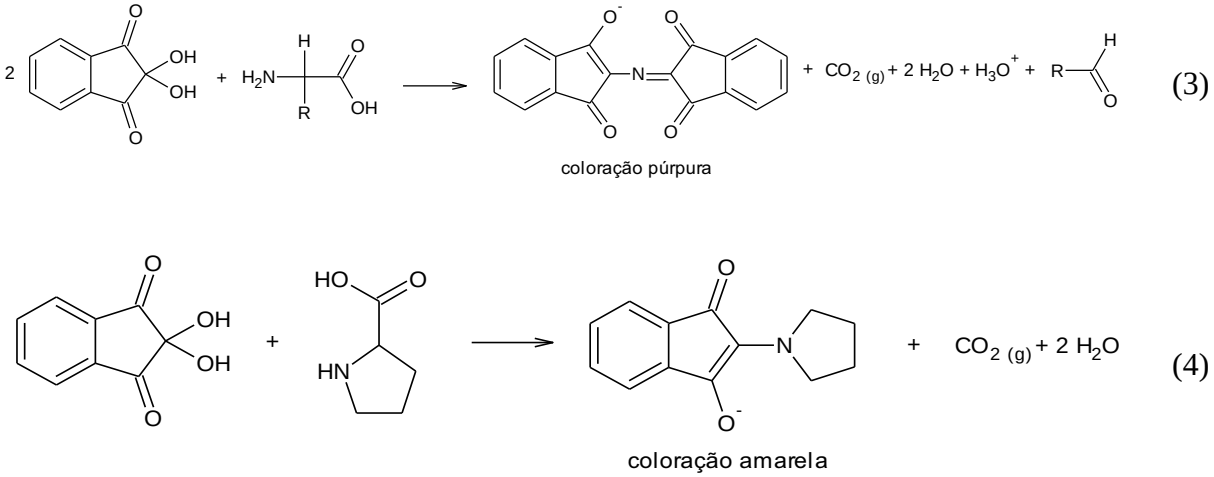


Figura 13. Reações correspondentes ao teste qualitativo da ninidrina[76].

A clivagem dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento das peptidil-resinas com uma mistura[77,78] contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%) e TIS (2,5%) para a SEQPEP1 e TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1%) para a SEQPEP2, a 25 ^{o}C por 2 h. Peptídeos brutos foram precipitados e lavados com éter etílico gelado. Posteriormente, o éter etílico foi removido por meio de secagem à vácuo por 1h. Após, os peptídeos foram dissolvidos em solução aquosa, separados da resina por meio de filtração em funil de placa porosa, concentrados e liofilizados.

O esquema para a obtenção das sequências peptídicas de interesse através da SPFS está ilustrado na **Figura 14**.

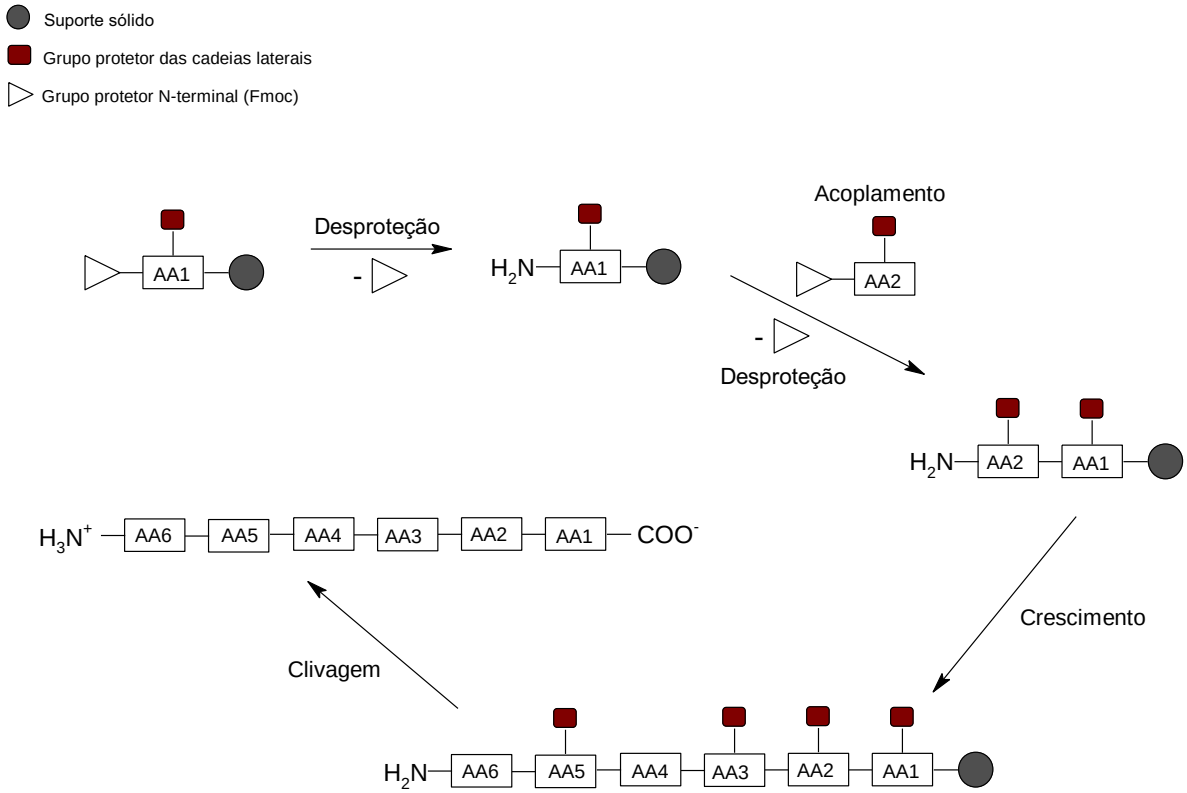


Figura 14. Esquema da síntese de peptídeos por meio da metodologia em fase sólida.

A purificação dos peptídeos foi realizada por CLAE em escala semipreparativa, empregando uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 2,5 cm; 15 μm; 300 Å) com um gradiente linear de componente orgânico (solvente A: água, 0,045% TFA; solvente B: ACN, 0,036% TFA) que variou de acordo com a sequência peptídica, em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL min^{-1} e detecção a 220 nm.

A caracterização dos produtos após a purificação foi efetuada através de CLAE em escala analítica, em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, empregando coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0,46 cm; 5 μm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (solvente A: água, 0,045% TFA; solvente B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 mL min^{-1} e detecção a 220 nm.

Análises por espectrometria de massas por meio de injeção direta e ionização por *electrospray* no modo positivo foram realizadas nas amostras das sequências peptídicas SEQPEP1 e SEQPEP2, para confirmação e identificação dos picos com massa molecular correspondente aos valores teóricos.

3.4 Avaliação espectrofotométrica de interação peptídeo-pesticida

A obtenção do coeficiente de absortividade molar do peptídeo foi obtida à partir da curva analítica nas concentrações de 5×10^{-5}, 4×10^{-4}, 6×10^{-4}, 8×10^{-4} e 1×10^{-3} mol L^{-1}.

As medidas de absorbância para a avaliação de interação entre o peptídeo e o pesticida diclorvós foram realizadas fixando-se a concentração do peptídeo em 8×10^{-4} mol L^{-1} e variando as concentrações de diclorvós em 1×10^{-8}, 1×10^{-7}, 1×10^{-6}, 4×10^{-4}, 6×10^{-4}, 8×10^{-4} e 1×10^{-3} mol L^{-1}. A solução estoque de peptídeo foi preparada em água Milli-Q e a solução estoque do pesticida foi preparada em acetonitrila. As diluições foram realizadas em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

À partir dos valores de absorbância obtidos, foi possível efetuar o cálculo da constante de interação do peptídeo com o pesticida segundo modelo matemático desenvolvido por Zhao et al.[79]. Nos estudos espectrofotométricos, utilizou-se a sequência peptídica SEQPEP1.

3.5 Dicroísmo Circular

As análises de dicroísmo circular foram realizadas com um tempo de integração de 3 s por ponto, em celas de 1,0 mm de caminho óptico, com 8 varreduras por espectro e largura de banda de 0,5 nm. A concentração de peptídeo utilizada foi de 1×10^{-4} mol L^{-1}.

3.6 Construção de eletrodos de ouro (Au-CDtrodos)

Para se ter acesso à camada metálica, os CDs foram submetidos à ação de ácido nítrico concentrado, cuja função é remover as camadas poliméricas que recobrem o ouro. Em seguida, a superfície foi lavada em abundância com água destilada e seca à temperatura ambiente.

A área geométrica do eletrodo de trabalho (A_{geom} = 0,071 cm^2) foi definida com a fita adesiva de galvanoplastia (470 3M®) perfurada e fixada sobre o filme de ouro. Para o contato elétrico foi utilizada uma lâmina de cobre (fio de cobre laminado e polido com lixa 3M 800) fixado com uma fita de PTFE (politetrafluoretileno). O esquema da construção do Au-CDtrodo[56,57] é mostrado na **Figura 15**.

Figura 15. Etapas de construção dos Au-CDtrodos.

Nos estudos envolvendo a imobilização do peptídeo na superfície do Au-CDtrodo, utilizou-se a sequência peptídica SEQPEP2.

3.7 Parâmetros empregados nos estudos de voltametria cíclica

O pré-tratamento eletroquímico da superfície dos Au-CDtrodos foi realizado por ciclagens em ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1}, no intervalo de potencial entre +0,2 e +1,5 V e velocidade de varredura (ν) = 100 mV s^{-1}.

Para a obtenção da resposta eletroquímica do pesticida diclorvós, voltamogramas foram obtidos na presença do eletrólito $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1}, no intervalo de potencial de -0,3 a -1,4 V com ν = 500 mV s^{-1}.

Os demais estudos voltamétricos foram realizados em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 na ausência e presença de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, no intervalo de potencial de -0,4 a +0,7 V com ν = 50 mV s^{-1}.

3.8 Parâmetros empregados nos estudos de voltametria de onda quadrada

A resposta eletroquímica do peptídeo foi obtida para o Au-CDtrodo modificado com $1x10^{-3}$ mol L^{-1} do peptídeo, em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1}. O estudo envolvendo a histidina livre em solução foi realizada para o Au-CDtrodo sem modificação, em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo $1x10^{-2}$ mol L^{-1} do aminoácido. Os parâmetros experimentais utilizados nestas determinações foram: frequência (*f*) = 250 Hz, amplitude de pulso (a) = 50 mV, incremento de varredura (ΔEs) = 2 mV, pH do eletrólito = 6,0, no intervalo de potencial de -0,3 a -1,4 V e de -0,9 a -1,5 V.

Na otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, variou-se a frequência (*f*) em 20, 50, 100, 200 e 250 Hz, a amplitude (*a*) em 10, 30, 50, 70 e 90 mV e o incremento de varredura (ΔEs) em 2, 4, 6, 8 e 10 mV. Todas as medidas foram realizadas em duplicata, no intervalo de potencial de -0,9 a -1,4 V e com pH do eletrólito ($NaClO_4$) = 6,0. Ao otimizar a frequência, manteve-se constante a amplitude em 50 mV e o incremento de varredura em 2 mV. Após otimizar a frequência, variou-se a amplitude, mantendo constante o incremento de varredura em 2 mV. A linha de base de todos os voltamogramas foi corrigida através do software GPES 3.0.

3.9 Imobilização do peptídeo sobre a superfície do Au-CDtrodo

A imobilização da sequência peptídica SEQPEP2 foi realizada pela adição de 10 μL da solução de diferentes concentrações (1×10^{-3} e 5×10^{-4} mol L^{-1}) e tempos de incubação (1 e 12 h), preparadas em água Milli-Q, à 25 ºC. Após, procedeu-se com a limpeza do eletrodo por imersão em água Milli-Q, sob leve agitação, num total de 3 vezes de 10 segundos, para a remoção das biomoléculas fracamente adsorvidas.

A avaliação da influência da concentração e do tempo de incubação foi realizada através de planejamento fatorial completo 2^2. Os níveis alto e baixo aplicados neste estudo estão representados na **Tabela 1**. Todas as medidas foram obtidas em triplicata.

Tabela 1. Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis e dois níveis.

Variável	Nível Alto	Nível Baixo
Concentração / mol L^{-1}	1×10^{-3}	5×10^{-4}
Tempo de incubação / h	12	1

3.10 Pré-concentração do pesticida diclorvós

As melhores condições para a pré-concentração do pesticida diclorvós foram avaliadas, tais como a influência do meio, tempo e pH de pré-concentração.

Os meios de pré-concentração foram investigados em acetonitrila, água e solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0 e consistiram na adição de 5 μL de solução na superfície do eletrodo em diferentes tempos de pré-concentração.

Selecionado o meio para pré-concentrar o pesticida, variou-se o pH em 5,7, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5 com um tempo de pré-concentração de 30 minutos. Após a otimização do valor de pH, variou-se o tempo de pré-concentração em 5, 15, 30, 45 e 60 minutos. Todas as medidas foram obtidas em triplicata. Após a etapa de pré-concentração, os Au-CDtrodos foram lavados em água Milli-Q, sob leve agitação, num total de 3 vezes de 10 segundos.

3.11 Construção da curva analítica para o pesticida diclorvós

Na construção da curva analítica, voltamogramas foram traçados após a realização da etapa de pré-concentração por 15 minutos empregando diferentes concentrações de pesticida diclorvós: $1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$, $3x10^{-7}$, $5x10^{-7}$, $7x10^{-7}$ e $1x10^{-6}$ mol L^{-1}, diluídos em solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0. As respectivas porcentagens de inibição foram calculadas através da comparação da intensidade de corrente obtida para o eletrodo submetido ao mesmo meio e tempo de pré-concentração, na presença e ausência do pesticida. Todas as medidas foram obtidas em triplicata.

À partir dos valores obtidos na região linear, calculou-se os respectivos limites de detecção (**Equação 5**) e quantificação (**Equação 6**) para o método, sendo (S_B) o desvio padrão e (b) o coeficiente angular da curva analítica[80].

$$LD = 3\ S_B/b \qquad (5)$$

$$LQ = 10\ S_B/b \qquad (6)$$

3.12 Seletividade do sensor biomimético

Os estudos de seletividade foram realizados para pesticidas de diferentes classes, com a finalidade de avaliar a interação destes compostos com o peptídeo que mimetiza o sítio ativo

da acetilcolinesterase, devendo interagir somente com pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos. A seletividade foi avaliada com os pesticidas carbaril, acefato, diclorvós, metamidofós, clomazone e metribuzin. A concentração de todos os pesticidas utilizados nos testes de seletividade foi de 5×10^{-7} mol L^{-1}.

3.13 Estabilidade do sensor biomimético

A estabilidade de estocagem dos eletrodos após a imobilização do peptídeo foi avaliada em 4 diferentes condições, mantendo os eletrodos: 1) na geladeira, 2) na geladeira em câmara úmida, 3) à temperatura ambiente e 4) à temperatura ambiente em câmara úmida. Após 7 dias, foram realizadas as medidas voltamétricas e calculada a porcentagem de sinal de corrente obtida em comparação com o eletrodo utilizado imediatamente após a imobilização.

3.14 Aplicação do sensor biomimético em amostras de alimentos

Segundo os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos divulgados pela ANVISA em dezembro de 2011[21], selecionou-se a cenoura e o tomate, culturas das quais foram identificados resíduos de diclorvós, para a execução dos ensaios de recuperação.

Os extratos de cenoura e tomate foram obtidos em uma centrífuga de alimentos Mondial (CF-02) e em seguida, foram filtrados em papel de filtro, obtendo-se soluções aquosas. Em seguida, foi ajustado o pH para 7,0 com NaOH 0,1 mol L^{-1} e as soluções foram fortificadas com 5×10^{-7} mol L^{-1} de diclorvós, diluído em solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0.

Voltamogramas foram obtidos após a realização da etapa de pré-concentração com as amostras por 15 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada através da comparação da intensidade de corrente obtida para o eletrodo submetido ao mesmo meio e tempo de pré-concentração, na presença e ausência do pesticida. O valor da concentração do analito encontrada foi obtido pela extrapolação na curva analítica. Em seguida, foram obtidas as porcentagens de recuperação (**Equação 7**) do pesticida nas diferentes amostras. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

$$\% \text{ Recuperação} = [\text{analito}]_{\text{encontrado}} / [\text{analito}]_{\text{adicionado}} \times 100 \qquad (7)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização do peptídeo que mimetiza o sítio ativo da AChE por meio de metodologia em fase sólida

Partindo da resina Fmoc-Ser(tBu)-WangResina, com grau de substituição de 0,64 mmol/g, e DIC/HOBt como agentes de condensação, acoplaram-se os 6 primeiros aminoácidos, comuns às duas sequências peptídicas a serem sintetizadas.

A sequência peptídica SEQPEP1, proposta através dos estudos de modelagem molecular, e a sequência SEQPEP2, foram sintetizadas pelo método de síntese em fase sólida. Após a desproteção do grupo α-amino do primeiro aminoácido, iniciou-se o acoplamento dos demais de acordo com as etapas de lavagem e desproteção apresentados na **Figura 10**. Após o acoplamento dos 6 primeiros aminoácidos, separou-se uma fração da peptidil-resina para o prosseguimento da síntese da sequência SEQPEP2.

Cada uma das peptidil-resinas resultantes do processo sintético foi submetida ao procedimento de clivagem à partir do tratamento ácido com as misturas contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%) e TIS (2,5%) para a SEQPEP1 e TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1%) para a SEQPEP2, a 25 ^{o}C por 2 horas.

Finalizado o procedimento de clivagem, precipitação, extração e liofilização, uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado foi dissolvida em solvente A (água, 0,045% TFA). Esta solução foi submetida à análise por CLAE em escala analítica, sob as condições descritas na seção **3.3**. A partir dos tempos de retenção observados nos cromatogramas, foram definidas as condições para a purificação dos peptídeos no modo semipreparativo (SEQPEP1: 0 a 25% de solvente B (ACN, 0,036% TFA) e SEQPEP2: 10 a 40% de solvente B).

Os cromatogramas obtidos antes e após processo de purificação da sequência SEQPEP1 estão representados na **Figura 16**. A caracterização do peptídeo por CLAE em escala analítica demonstrou a obtenção de um produto liofilizado com 97% de pureza.

A confirmação e identificação do pico com massa molecular correspondente ao valor teórico (582,57 g mol^{-1}) foi avaliada através de análise por injeção direta em um espectrômetro de massas, apresentada na **Figura 17**, cujo íon de relação massa/carga (m/z) +1 de 583,39 g mol^{-1} refere-se à protonação do peptídeo $[M+H]^+$ e comprova a obtenção da sequência SEQPEP1.

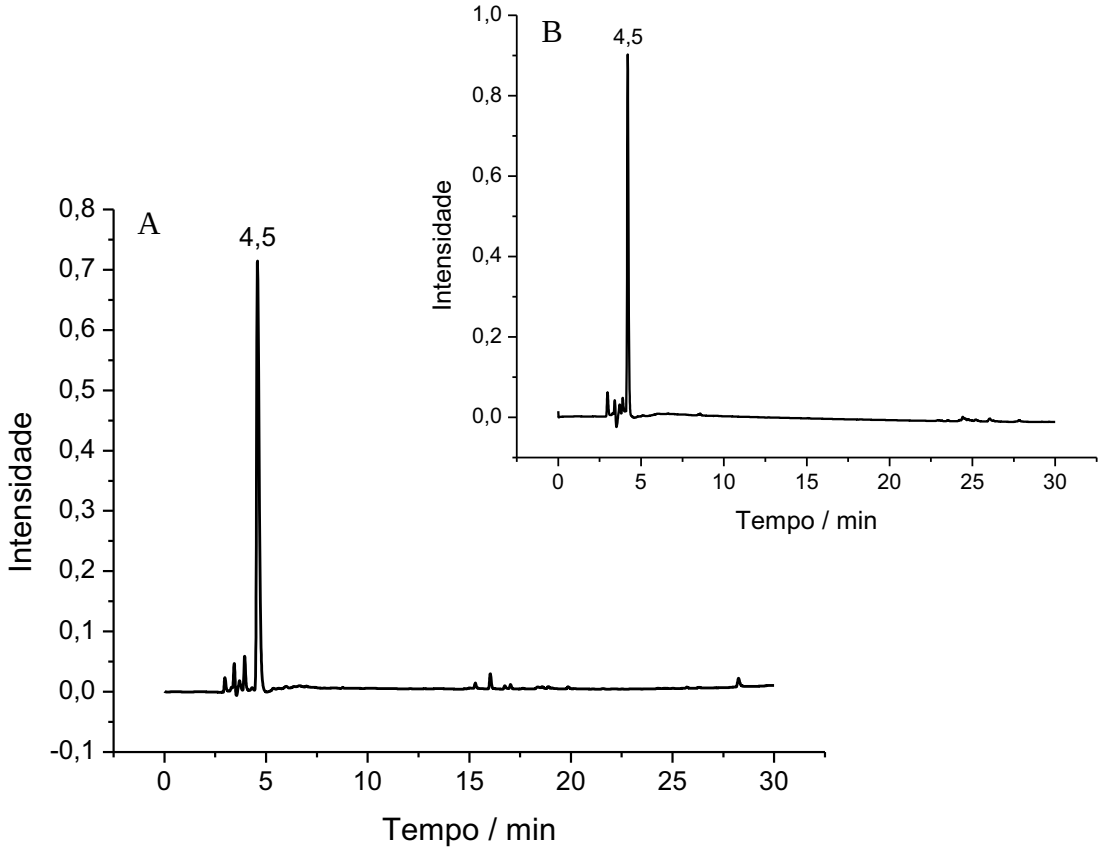


Figura 16. Cromatogramas obtidos em escala analítica para a sequência peptídica SEQPEP1: (A) peptídeo bruto e (B) peptídeo purificado.

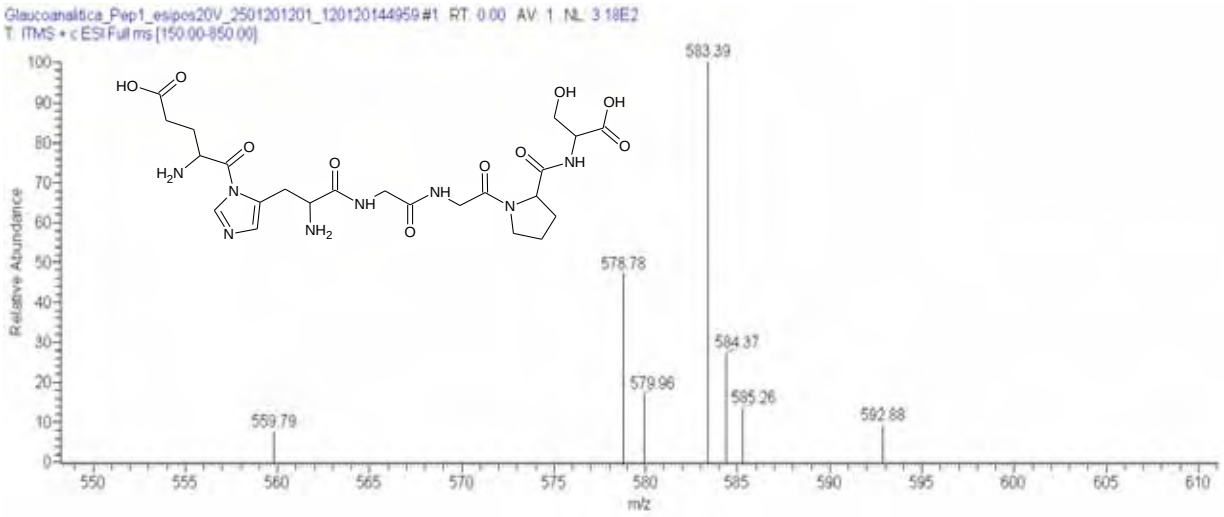


Figura 17. Espectro de massas obtido para a sequência peptídica SEQPEP1.

Como estratégia para a imobilização do peptídeo na superfície eletródica de ouro, adicionou-se à sequência SEQPEP1 um resíduo de cisteína, obtendo-se a sequência peptídica

SEQPEP2. Devido à alta afinidade do ouro pelo grupamento tiol, a imobilização do peptídeo pode ser realizada através do próprio grupamento S-H da cisteína, sem a necessidade de previamente tratar a superfície do eletrodo com um composto tiolado para a formação de monocamadas auto-organizadas.

A sequência SEQPEP2 foi sintetizada, purificada e caracterizada conforme descrito para o peptídeo anterior. O peptídeo bruto apresentou 3 frações com intensidade majoritárias com tempos de retenção t_{r1} = 7,4, t_{r2} = 8,2 e t_{r3} = 9,0 min (**Figura 18 A**), as quais foram separadas por meio de purificação. Verificou-se que a que fração 1 (**Figura 18 B**) apresentou o maior teor de pureza (98%) sendo então utilizada para os estudos de imobilização do peptídeo em superfície eletródica de ouro.

A confirmação e identificação do pico com massa molecular correspondente ao valor teórico (685,70 g mol^{-1}) foi avaliada através de análise por injeção direta em um espectrômetro de massas, apresentada na **Figura 19**, cujo íon de relação massa/carga (m/z) +1 de 686,24 g mol^{-1} refere-se à protonação do peptídeo $[M+H]^+$ e comprova a obtenção da sequência SEQPEP2.

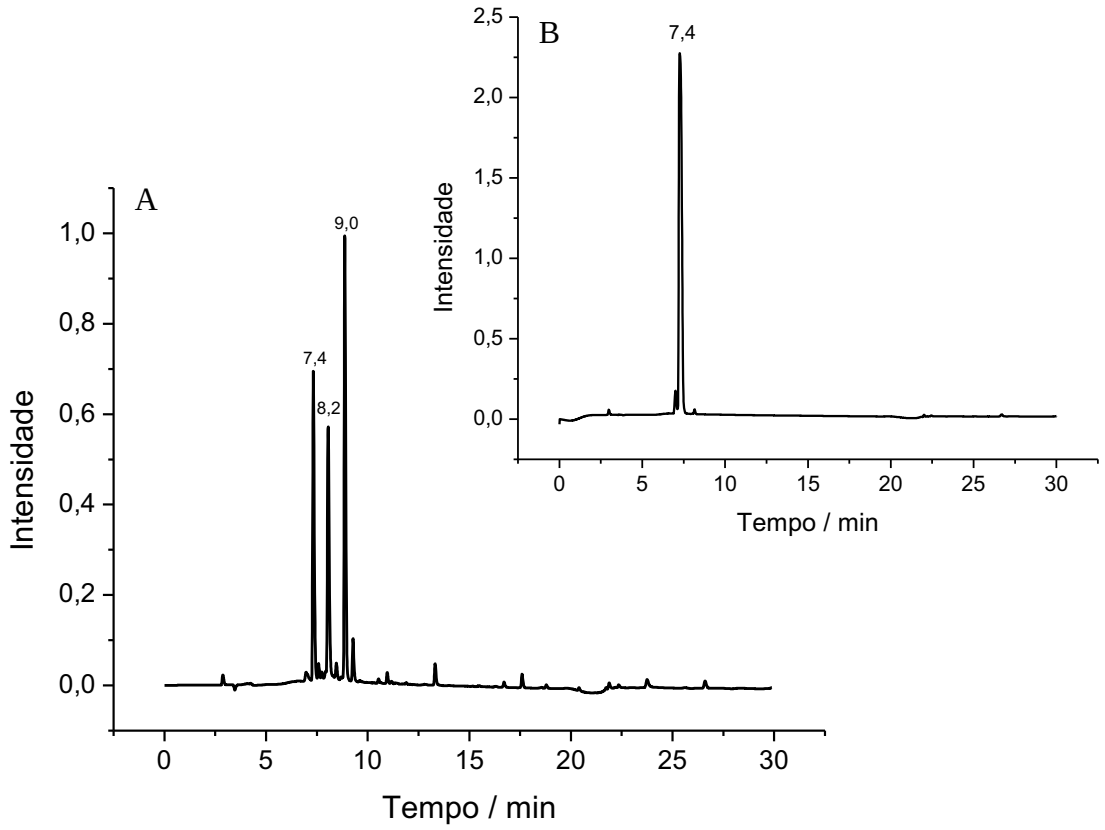


Figura 18. Cromatogramas obtidos em escala analítica para a sequência peptídica SEQPEP2: (A) peptídeo bruto e (B) peptídeo purificado.

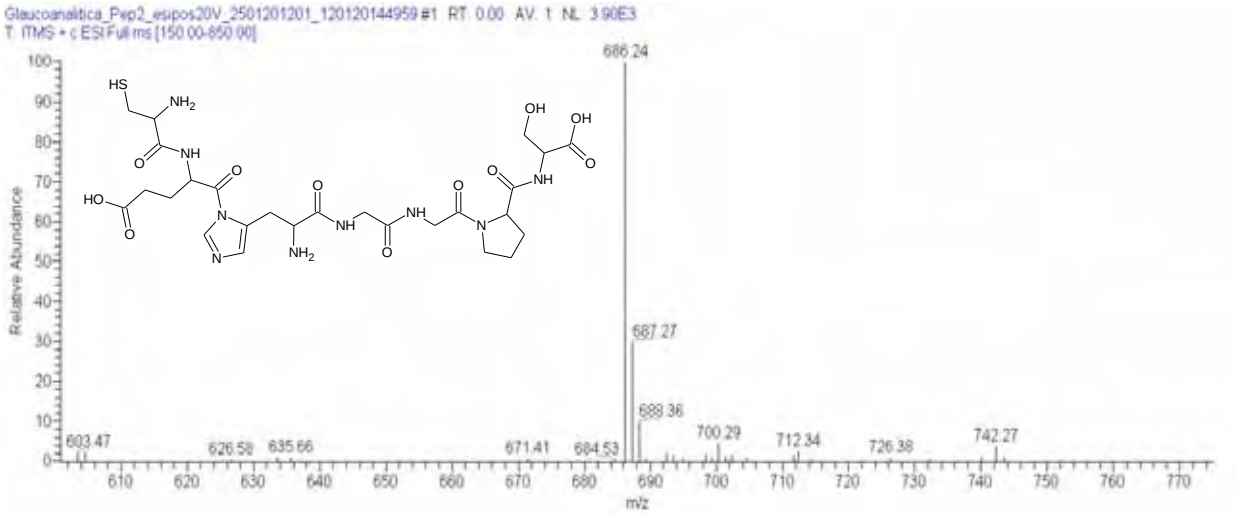


Figura 19. Espectro de massas obtido para a fração 1 da sequência peptídica SEQPEP2.

4.2 Avaliação espectrofotométrica da interação peptídeo-pesticida

A interação do peptídeo com o pesticida diclorvós foi avaliada pelos espectros de UV-Vis dos compostos individuais e das misturas (**Figura 20**).

O pesticida diclorvós apresentou uma banda com máximo de absorção em $\lambda = 205$ nm relacionado à transição $\pi \rightarrow \pi^{*}$[81]. O peptídeo apresentou uma banda de absorção em $\lambda = 210$ nm, referente às ligações peptídicas[82] e outa em $\lambda = 275$ nm relacionado ao anel imidazólico da histidina[83].

Ao adicionar quantidades conhecidas do pesticida diclorvós na solução contendo o peptídeo, observa-se o aparecimento de uma nova banda com máximo de absorção em $\lambda = 250$ nm, que indica a formação de um complexo peptídeo-pesticida, comprovando o processo de interação entre estes compostos.

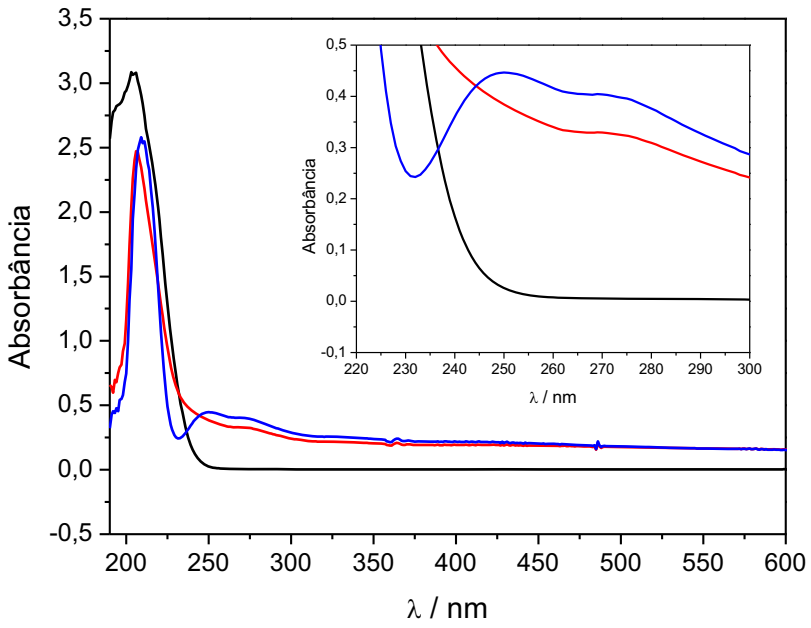


Figura 20. Espectros de UV-Vis das soluções contendo: (▬) pesticida diclorvós 2 x 10^{-3} mol L^{-1}, (▬) peptídeo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} e (▬) peptídeo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} + pesticida diclorvós 8 x 10^{-4} mol L^{-1}.

A **Figura 21** apresenta os espectros de absorção na faixa de 230 a 265 nm, obtidos para as misturas, com a concentração do peptídeo fixa em 8 x 10^{-4} mol L^{-1} e variando a concentração de pesticida diclorvós na faixa de 1 x 10^{-8} a 1 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Observa-se que com o aumento da concentração de pesticida aumenta a intensidade de absorção referente ao complexo peptídeo-pesticida (λ_{250}), sendo que para misturas nas quais as concentrações de peptídeo e pesticida são próximas, há uma estabilização do sinal (**Inset Figura 21**). Este resultado sugere que a estequiometria do complexo peptídeo-pesticida é de 1:1.

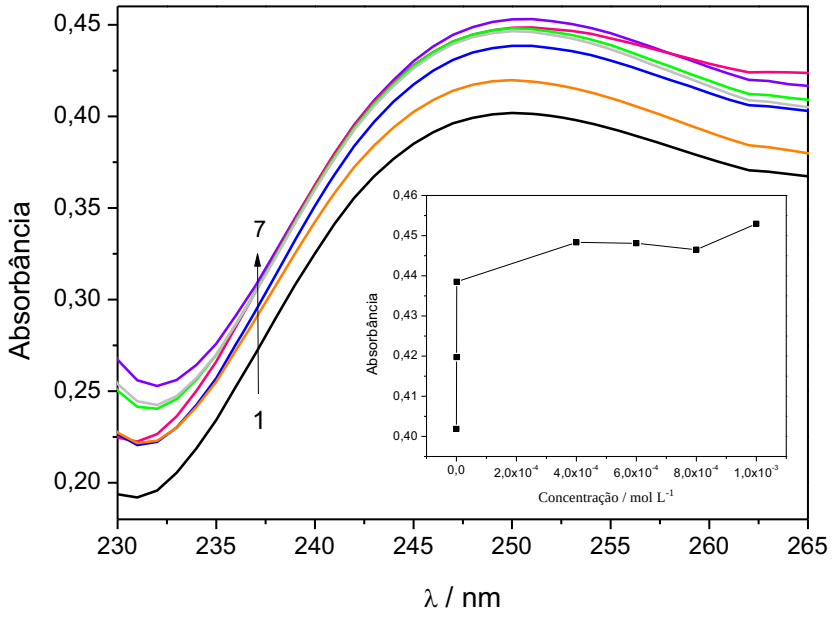


Figura 21. Espectros de UV-Vis das soluções contendo 8 x 10^{-4} mol L^{-1} do peptídeo e concentrações de pesticida variando de 1 x 10^{-8} mol L^{-1} a 1 x 10^{-3} mol L^{-1}. Inset: Gráfico da absorbância (λ_{250}) em função da concentração de pesticida diclorvós.

O grau de interação peptídeo-pesticida foi avaliado através do cálculo da constante de formação do complexo, segundo modelo matemático de Zhao et al.[79], adaptado para este estudo.

Para o cálculo da constante, os dados foram obtidos de acordo com as seguintes equações:

peptídeo + pesticida ↔ complexo peptídeo-pesticida

$$K = \frac{[complexo\ peptídeo - pesticida]}{[peptídeo][pesticida]} \quad (8)$$

À partir da equação (**8**), deduz-se a equação (**9**), que relaciona o coeficiente de absortividade molar do peptídeo com a concentração do pesticida:

$$\frac{1}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{1}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)K\,[pesticida]} + \frac{1}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} \quad (9)$$

O coeficiente de absortividade molar, ε_a, é obtido através do cálculo da A/[peptídeo]. ε_b e ε_f correspondem aos coeficientes de absortividade molar para o complexo peptídeo-pesticida e para o peptídeo livre, respectivamente.

Para a obtenção do coeficiente de absortividade molar do peptídeo, foi efetuada uma curva analítica (**Figura 22**), cujo coeficiente angular obtido (ε_f = 402,3 M^{-1} cm^{-1}) foi utilizado nas etapas posteriores para o cálculo da constante de interação.

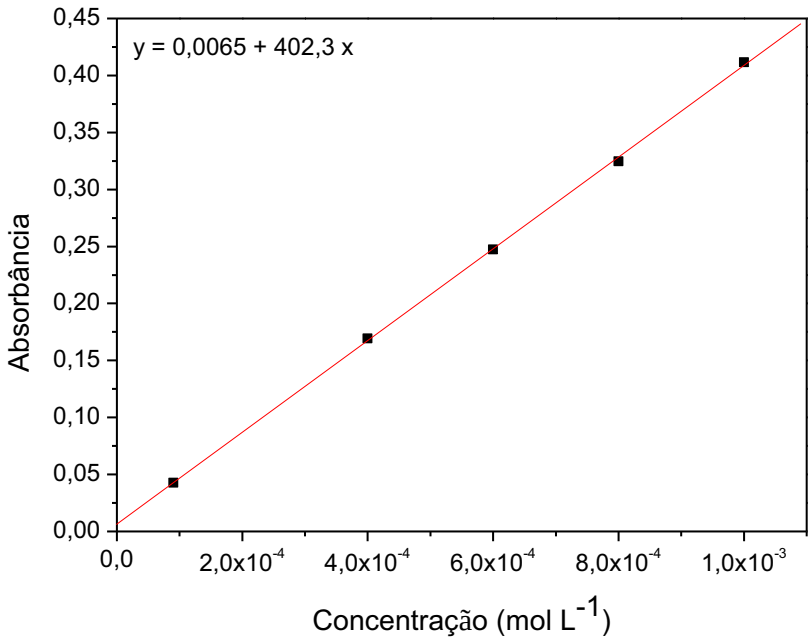


Figura 22. Curva analítica obtida para o peptídeo.

Rearranjando a equação (**9**) temos:

$$\frac{[pesticida]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{1}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)K} + \frac{[pesticida]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} \qquad (10)$$

O gráfico de [pesticida]/(ε_a-ε_f) em função da [pesticida] apresenta um coeficiente angular = 1/(ε_a-ε_f) e um coeficiente linear = 1/(ε_b - ε_f) K. Assim, o valor de K é obtido através da relação entre o coeficiente angular pelo coeficiente linear.

O valor obtido (K = 4,10 x 10^5 M^{-1}) evidencia um forte processo de interação, e está de acordo com o valor teórico proposto pelos estudos de modelagem molecular (**Figura 23**).

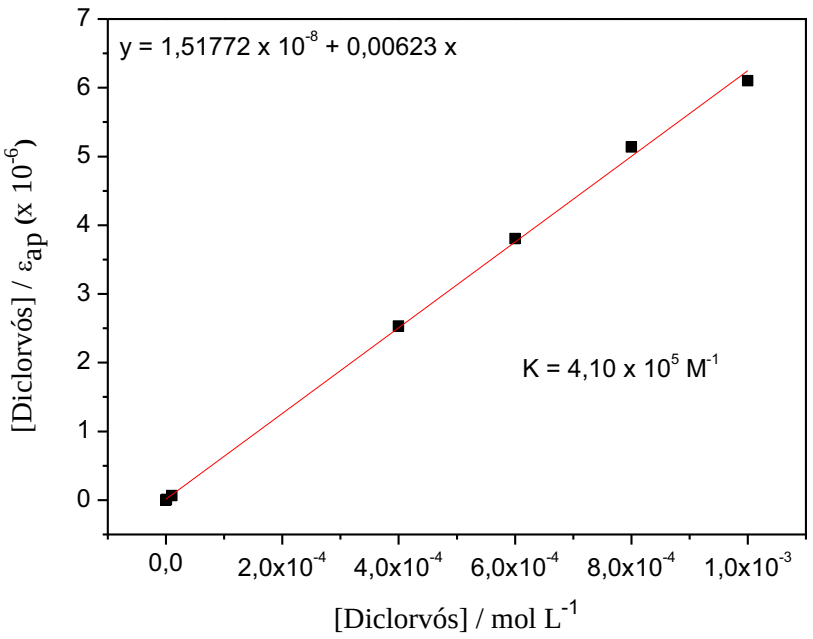


Figura 23. Gráfico da [diclorvós]/ε_{ap} em função da concentração de diclorvós utilizada para o cálculo da constante de interação peptídeo-pesticida.

4.3 Tratamento da superfície dos Au-CDtrodos

Após a construção dos Au-CDtrodos, foram obtidos voltamogramas cíclicos em eletrólito de suporte contendo $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, no intervalo de potencial de -0,4 a +0,7 V e ν = 50 mV s^{-1}.

Observa-se na **Figura 24** que o perfil voltamétrico não apresenta definição adequada, uma vez que os picos de oxidação e redução encontram-se deformados e bem afastados, ocasionados pela dificuldade na transferência eletrônica na superfície do eletrodo. Este resultado pode ser explicado pela provável formação de óxidos, gerados a partir da ação do ácido nítrico na retirada da película protetora que recobre o ouro.

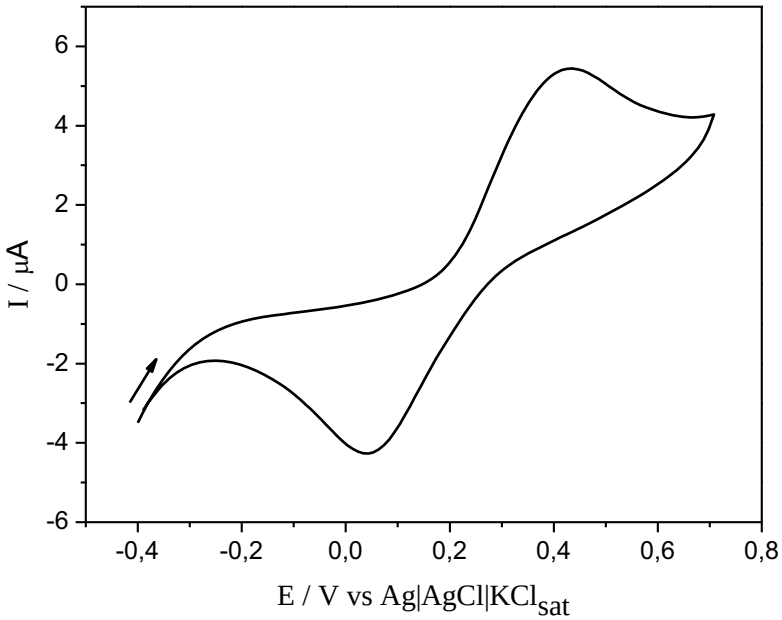


Figura 24. Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo, sem qualquer pré-tratamento da superfície, em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}.

Para a adequação do perfil voltamétrico, o Au-CDtrodo foi submetido a uma etapa de pré-tratamento eletroquímico[84] através de ciclagens sucessivas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}, no intervalo de potencial de +0,2 a +1,5 V e ν = 100 mV s^{-1}, conforme apresentado na **Figura 25**. A observação dos picos referentes à formação de óxido de ouro (entre +1,2 e +1,6 V) e a correspondente remoção (entre +0,8 e +1,0 V) são indicativos de que a superfície está praticamente livre da presença de óxidos[85].

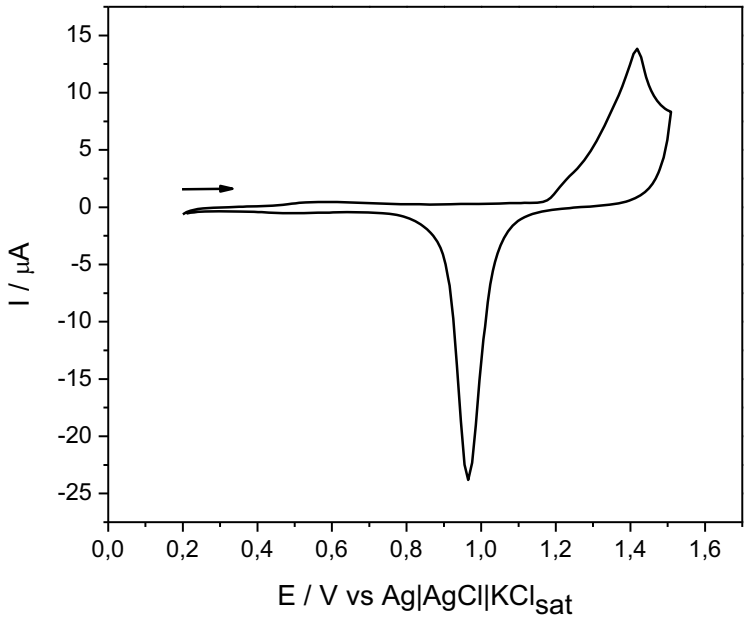


Figura 25. Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 100 mV s^{-1}.

Com o objetivo de comprovar a formação de óxido de ouro devido à ação do ácido nítrico na retirada da película protetora que recobre o ouro do CD-R, foram efetuadas análises de DRX (**Figura 26**). A identificação dos compostos cristalinos foram realizadas por meio do banco de dados contendo informações cristalográficas básicas e algumas propriedades físicas de compostos cristalinos atualizada pelo ICDD, *International Center for Diffraction Data*. Nas **Figuras 27 e 28** estão representadas as fichas cristalográficas do Au (ficha 00-001-1172) e do Au_2O_3 (ficha 00-043-1039) segundo a base da PDF (*Powder Diffraction File*) da ICDD.

Na **Figura 26** observam-se picos em 2θ = 28, 32, 46 e 54, característicos da estrutura cristalina ortorrômbica do Au_2O_3 e um pico em 2θ = 38, referente à estrutura cúbica do ouro metálico. Após a etapa de limpeza da superfície através de ciclagens em ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1}, observa-se que houve uma diminuição na intensidade dos picos referente ao Au_2O_3 de forma significativa, e, embora não tenha demonstrado a total retirada do óxido da superfície, o perfil voltamétrico se mostrou adequado para as medidas eletroquímicas posteriores.

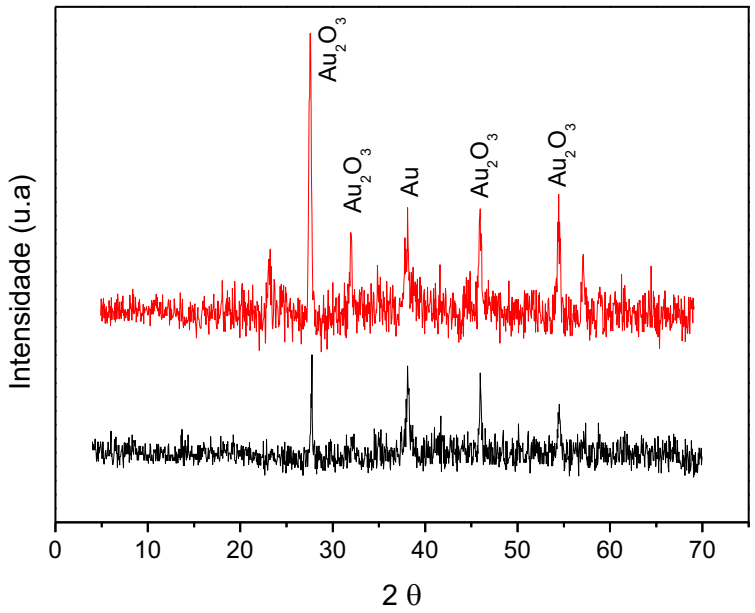


Figura 26. Difratogramas de raios X do Au-CDtrodo após a retirada da camada polimérica com a ação do ácido nítrico (▬) e após a limpeza através de ciclagens em ácido sulfúrico 0,5 M (▬).

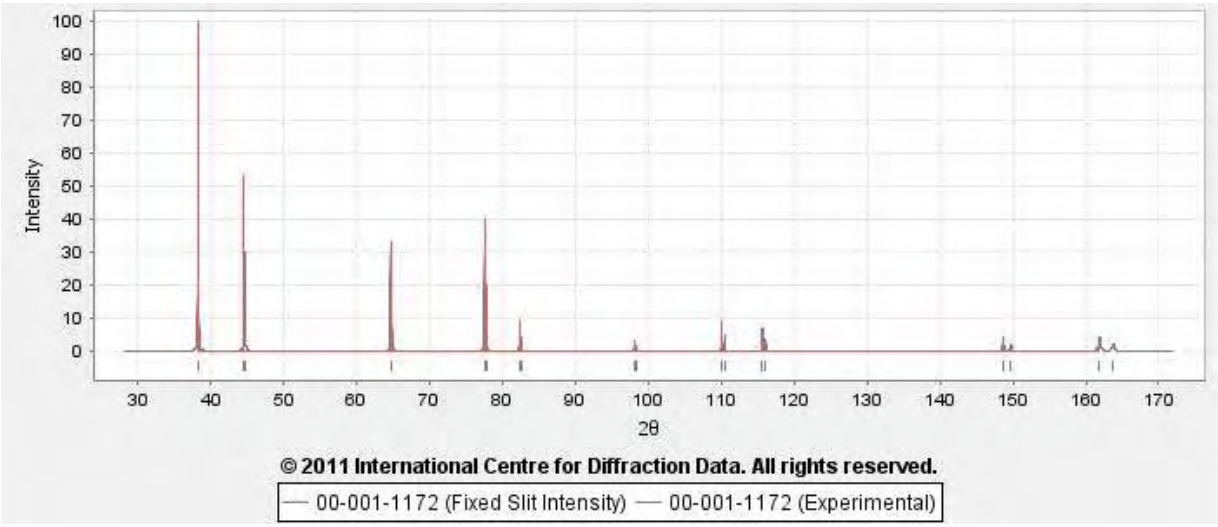


Figura 27. Ficha cristalográfica do Au (00-001-1172) segundo a base de dados da PDF.

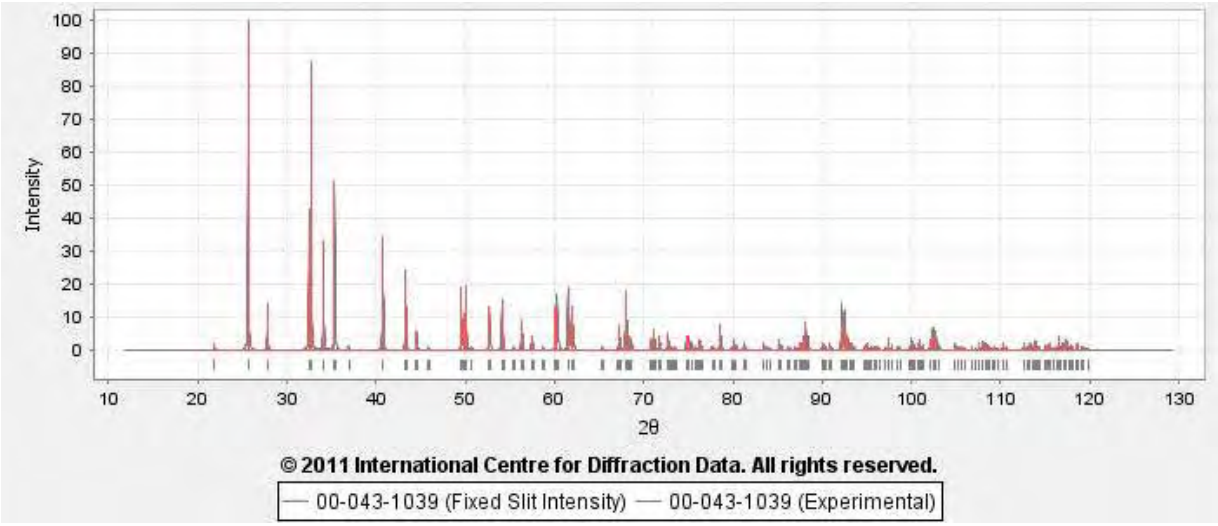


Figura 28. Ficha cristalográfica do Au_2O_3 (00-043-1039) segundo a base de dados da PDF.

Após o pré-tratamento da superfície com H_2SO_4, voltamogramas cíclicos foram obtidos em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} no intervalo de potencial de -0,4 a +0,7 V e ν = 50 mV s^{-1} (**Figura 29**), onde é possível observar uma melhora significativa do perfil voltamétrico, com ΔE_{pico} de aproximadamente 90 mV e razão de corrente de pico (Ip_a/Ip_c) de 1,1.

Estes dados estão bem próximos dos valores esperados para um processo de transferência eletrônica reversível que envolve um elétron, sendo assim, satisfatórios para o objetivo do estudo.

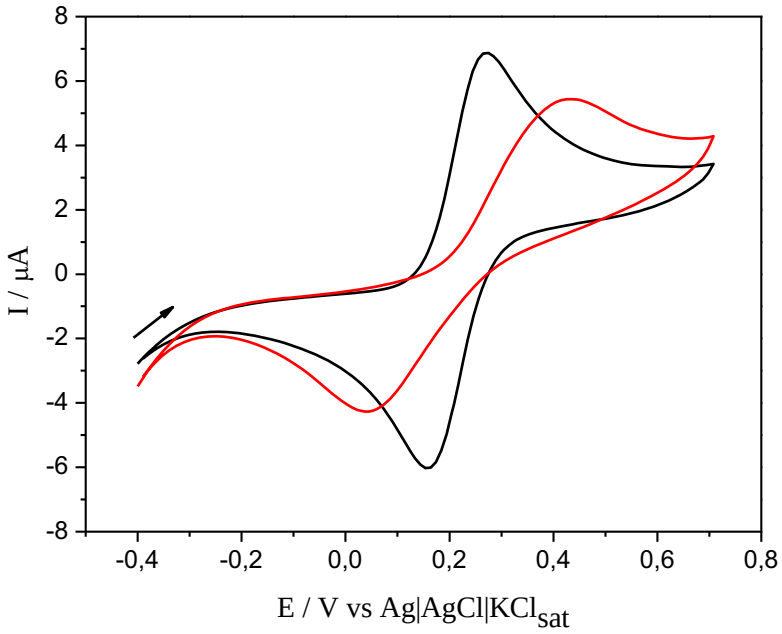


Figura 29. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, antes (—) e após o pré-tratamento da superfície com H_2SO_4 (—), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}.

4.4 Caracterização da superfície do Au-CDtrodo

A **Figura 30** apresenta a imagem de FE-SEM para a superfície do Au-CDtrodo, após a retirada da película polimérica com HNO_3, com ampliação de 2.000 e 5.000 x. Observa-se que a superfície do CD-R é composta por trilhas bem definidas, onde as informação digitais são gravadas.

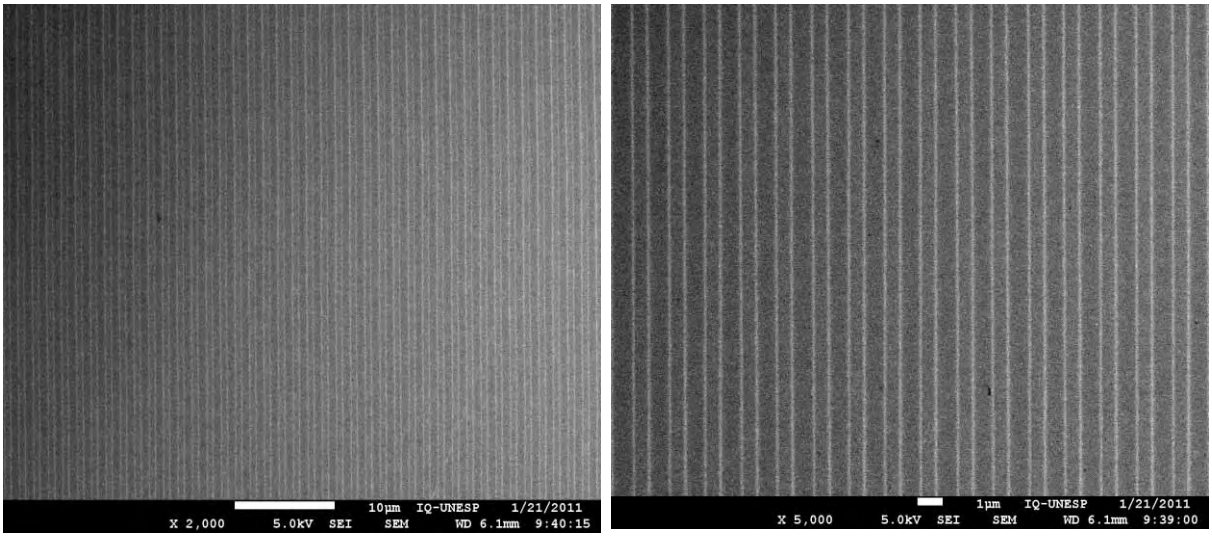


Figura 30. Imagem de FE-SEM da superfície do Au-CDtrodo.

A análise da superfície do Au-CDtrodo por EDX, sem qualquer modificação (**Figura 31**), revela a presença dos átomos de carbono e ouro. Devido à película de ouro ser muito fina (aproximadamente 140 nm de espessura), a presença do carbono provavelmente está relacionada à camada fotossensível (ftalocianina), que se situa logo abaixo da camada metálica.

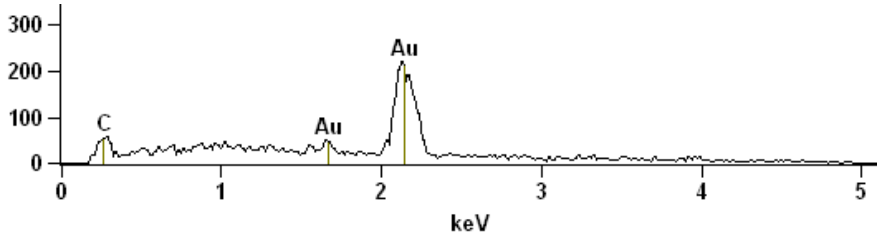


Figura 31. Espectro de EDX para o Au-CDtrodo.

A caracterização da superfície do Au-CDtrodo por AFM (**Figura 32**) foi realizada por M. V. Foguel[86], em cooperação com o departamento de Bioquímica da *Masaryk University* em Brno, Republica Tcheca, no projeto financiado pela União Européia.

A análise da borda externa do CD, região na qual é delimitada a área do eletrodo, permitiu a obtenção de alguns parâmetros tais como altura e espessura da trilha, espessura do vale e rugosidade da superfície de ouro utilizada nos estudos eletroquímicos (**Tabela 2**).

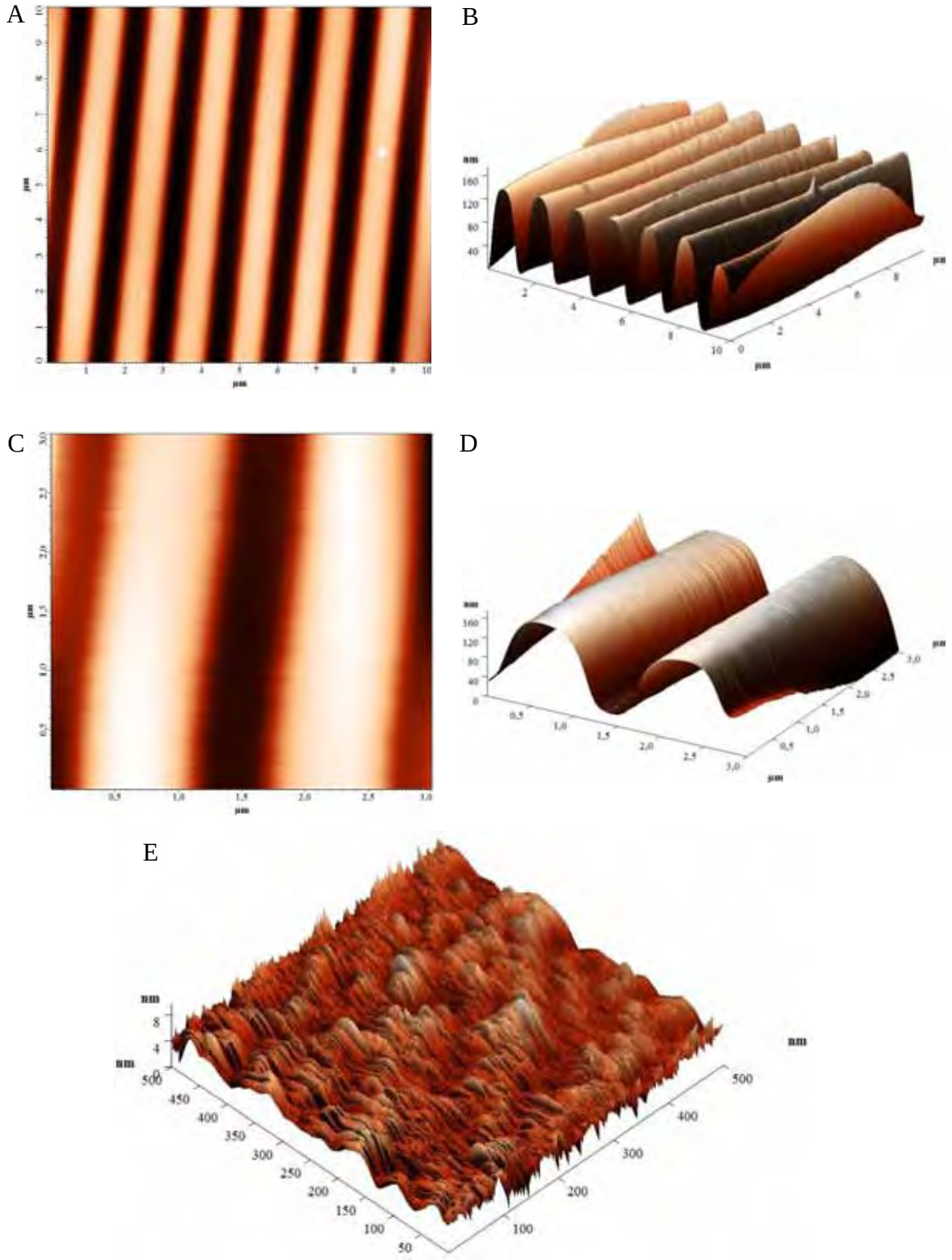


Figura 32. Imagem de AFM da superfície do Au-CDtrodo: (A) 10x10, (B) imagem em 3D 10x10, (C) 3x3, (D) imagem em 3D 3x3 μm e (E) imagem em 3D 500x500 nm.

Tabela 2. Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para a borda externa do CD-R

CD Archive Mitsui CD-R 100	Borda Externa
Altura da Trilha / nm	**140 ± 3**
Espessura da Trilha / nm	**0,41 ± 0,01**
Espessura do vale / nm	**0,13 ± 0,02**
Rugosidade / nm	**50,4**

4.5 Estudo da repetibilidade da área geométrica do eletrodo

O eletrodo construído com auxílio de fita de galvanoplastia e pré-tratado pelo método de limpeza de superfície com ácido sulfúrico foi avaliado segundo sua repetibilidade (**Figura 33**), comparando-se os valores de intensidade de picos de correntes anódica e catódica dos processos redox relativos à espécie $Fe(CN)_6^{4-}$.

O desvio padrão relativo medido para 5 Au-CDtrodos diferentes, construídos e avaliados no mesmo dia, sobre as mesmas condições de trabalho, foi de 1,1%. Este resultado indica que as áreas de trabalho dos eletrodos apresentaram-se muito similares, o que descreve um processo de confecção de Au-CDtrodos bastante repetitivo.

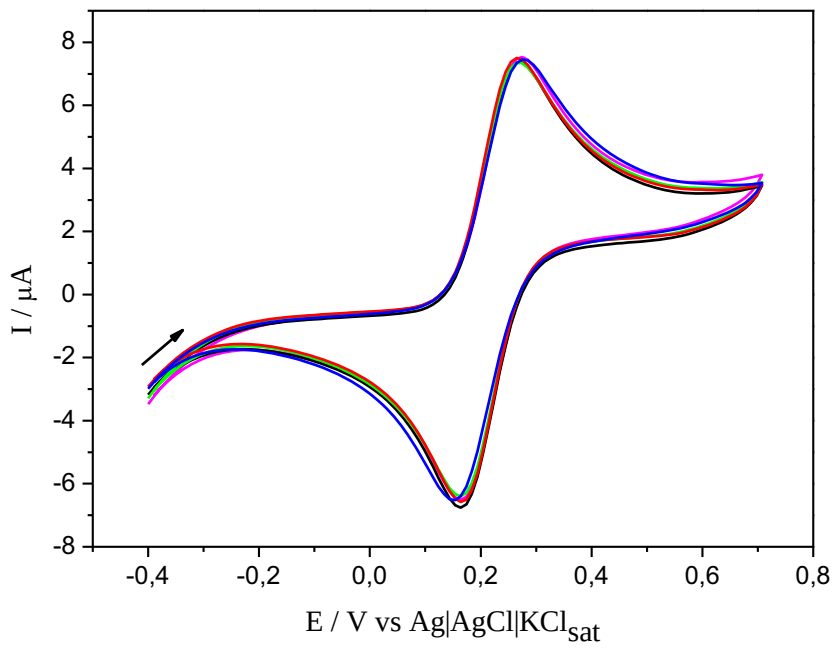


Figura 33. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, após o pré-tratamento da superfície com H_2SO_4, em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}.

4.6 Imobilização e caracterização da superfície do Au-CDtrodo modificada com o peptídeo

Sintetizado o peptídeo tiolado, procedeu-se com o estudo de imobilização do material biológico sobre a superfície do Au-CDtrodo (**Figura 34**). Para a obtenção da porcentagem de recobrimento da superfície com 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} do peptídeo imobilizado, empregando um tempo de incubação de 1h à 25 ºC, foram obtidos voltamogramas cíclicos em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Através da relação $\theta_{cv} = 1 - (I_{p,\ SAM} / I_{p,\ sem\ modificação})$[87], onde $I_{p,\ SAM}$ e $I_{p,\ sem\ modificação}$ representam os picos de oxidação do íon $Fe(CN)_6^{4-}$ para o Au-CDtrodo modificado e sem modificação, respectivamente, obteve-se um recobrimento de 68 % da superfície. A deformação dos picos de oxidação e redução indica uma diminuição na reação de transferência de carga.

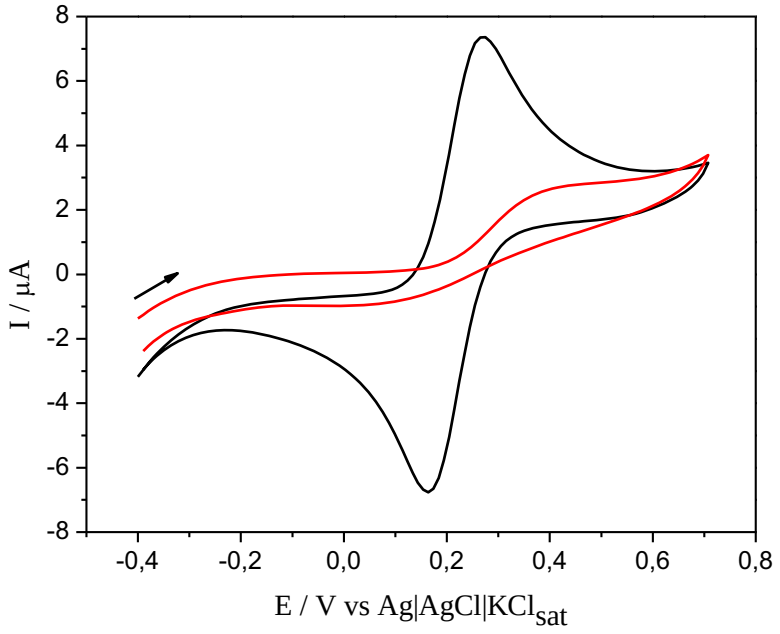


Figura 34. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, sem modificação (—) e modificado (—), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}.

Com a superfície do Au-CDtrodo modificada, comprovou-se o processo de imobilização do peptídeo através do espectro de infravermelho pelo método de DRIFTS na região de 500 a 4000 cm^{-1} (**Figura 35**).

A formação de banda na região de 3650-3584 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração de deformação axial de O-H livre. As bandas entre 3500-3180 cm^{-1} são referentes à deformação axial de N-H. A banda em 2940 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação axial de C-H (alcanos). A absorção forte e larga na região entre 3333-2380 cm^{-1} está relacionada à sobreposição de bandas de deformação axial de O-H e N-H. A banda em 1740 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial de C=O de ácido carboxílico, enquanto que as bandas entre 1500-1250 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento N-H de amidas e aminas. A presença de bandas entre 1250-1020 cm^{-1} está relacionada com a deformação axial do grupo C-N. A absorção entre 800-666 cm^{-1} pode estar relacionada à deformação angular fora do plano de N-H (amida) ou à deformação axial de C-S (entre 700-600 cm^{-1}).

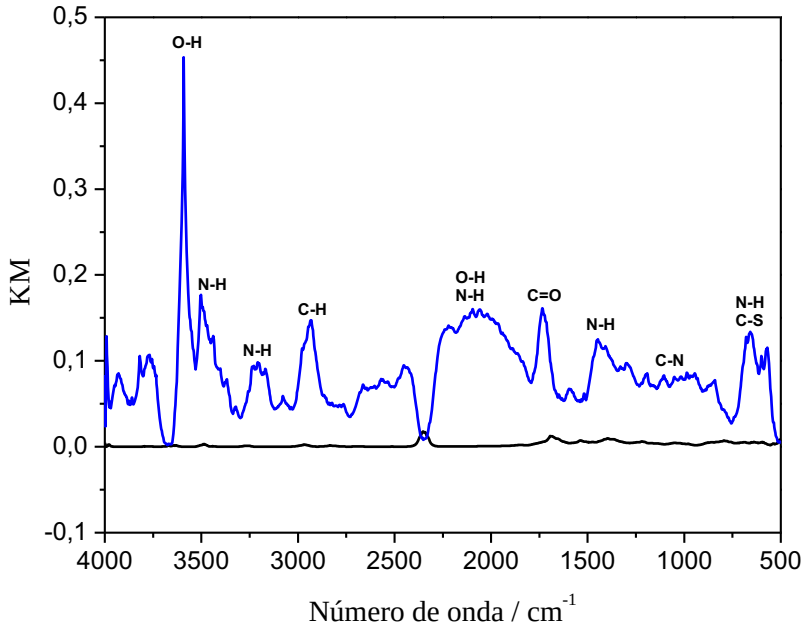


Figura 35. Espectros de infravermelho do Au-CDtrodo, no intervalo de 500 a 4000 cm^{-1}, para o eletrodo limpo (▬) e para o eletrodo modificado com o peptídeo (▬).

A **Figura 36** apresenta as imagens de FE-SEM para a superfície do Au-CDtrodo antes e após a etapa de modificação da superfície com a SEQPEP2, com ampliação de 5.000 x. Observa-se que a imobilização é realizada por toda a superfície, tanto no vale entre as trilhas quanto nas próprias trilhas de gravação.

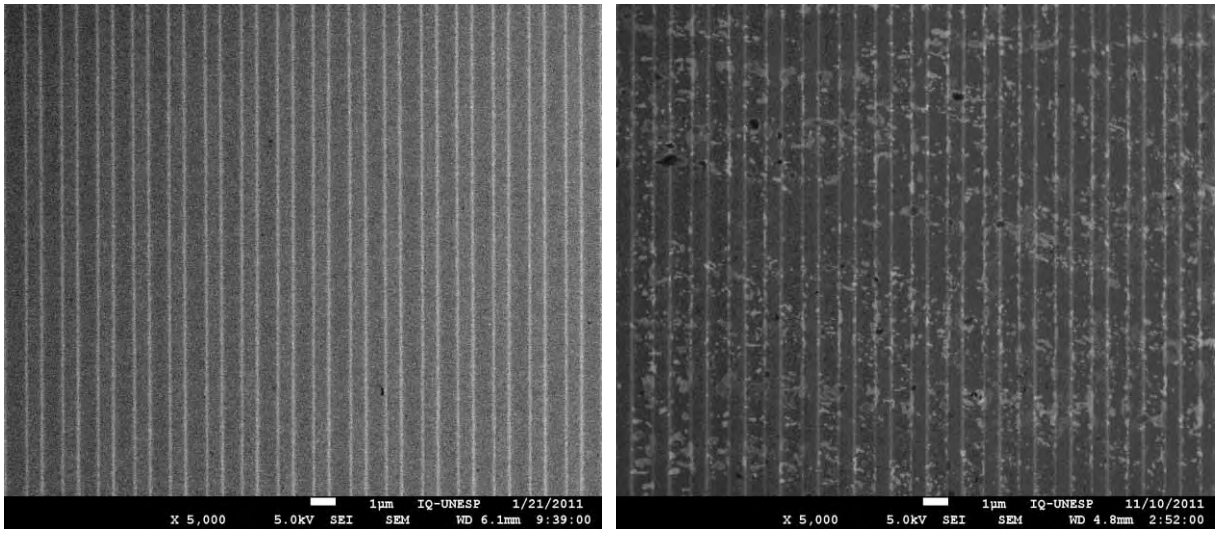


Figura 36. Imagens de FE-SEM da superfície do Au-CDtrodo sem modificação (A) e modificada com a seqüência peptídica (B).

Após a modificação com 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} do peptídeo imobilizado, empregando um tempo de incubação de 1h à 25 ºC, a superfície do Au-CDtrodo de ouro foi analisada por EDX (**Figura 37**). Observa-se a presença de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e ouro. Exceto o ouro, que refere-se à composição da superfície do CD-R, a presença dos demais átomos está relacionada com a sequência peptídica que foi imobilizada na superfície eletródica.

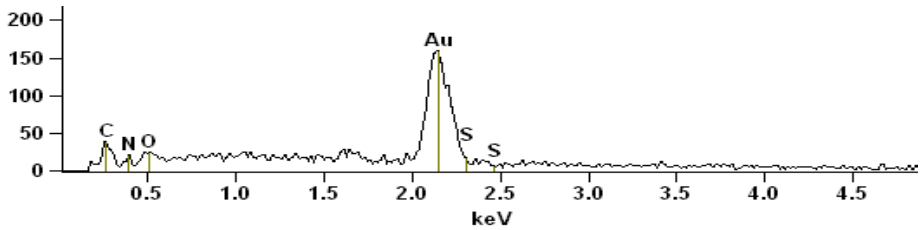


Figura 37. Espectro de EDX correspondente ao Au-CDtrodo modificado com a sequência peptídica SEQPEP2.

4.7 Resposta eletroquímica do pesticida diclorvós

Por meio de estudos utilizando voltametria cíclica (**Figura 38**) e de onda quadrada (**Figura 39**), observa-se que o pesticida diclorvós apresenta resposta sobre o Au-CDtrodo, em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1}, o que possibilita o desenvolvimento de metodologia de análise empregando técnicas eletroanalíticas.

Nas condições experimentais, no intervalo de potencial entre -0,3 a -1,4 V, observa-se a presença de um pico de redução em torno de -0,7 V, associado à redução da ligação dupla (C=C) presente na molécula do pesticida, segundo mecanismo apresentado na **Figura 40**.

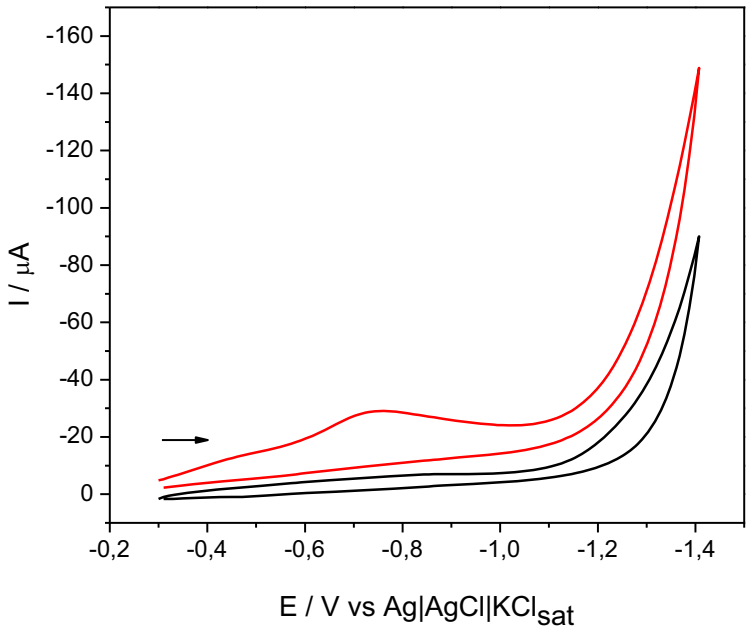


Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos para Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} (▬) e em $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo diclorvós 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 500 mV s^{-1}.

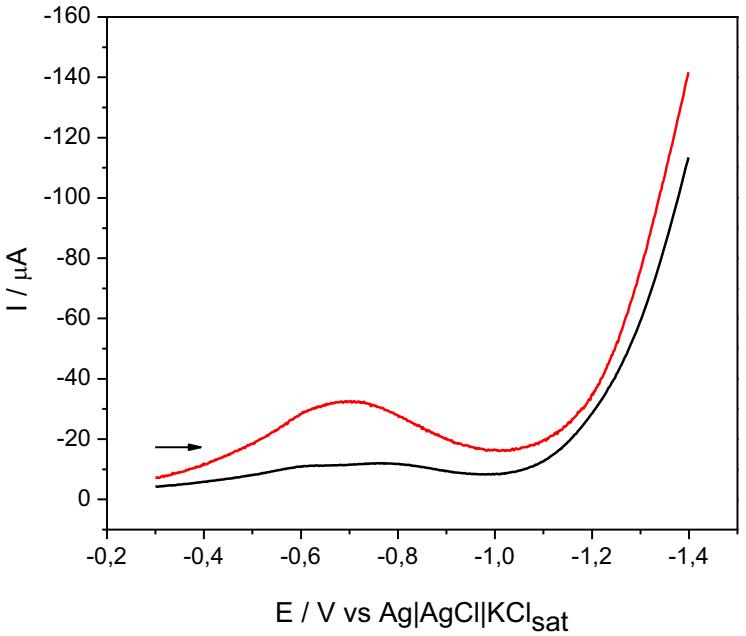


Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} (▬) e em $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo diclorvós 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; f = 250 s^{-1}, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV.

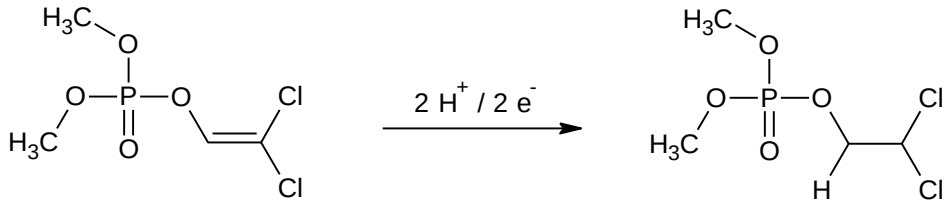


Figura 40. Mecanismo de redução do pesticida diclorvós[88].

4.8 Estudos preliminares de determinação do pesticida diclorvós através de pré-concentração com o peptídeo imobilizado na superfície do eletrodo

A **Figura 41** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} para o Au-CDtrodo modificado com o peptídeo e na presença ou ausência do pesticida diclorvós, no intervalo de potencial entre -0,3 a -1,4 V, f = 250 s^{-1}, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV e pH do eletrólito = 6,0. Borbulhou-se nitrogênio na solução eletrolítica por 15 minutos previamente a realização das medidas eletroquímicas.

Observa-se que o voltamograma para o Au-CDtrodo modificado com o peptídeo apresentou um pico de redução ao redor do potencial de -1,2 V. Como o peptídeo simula o sítio ativo da AChE, sua afinidade pelo pesticida diclorvós foi monitorada por meio da técnica de voltametria de onda quadrada. Após pré-concentrar 1,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-7} mol L^{-1} do pesticida diclorvós na superfície do eletrodo por 5 minutos, fez-se a redissolução por meio da SWV. Observa-se que quanto maior a concentração do pesticida, maior é a inibição do sinal ao redor de -1,2 V, o que indica uma interação do peptídeo com o pesticida. Também foi observado o aparecimento de picos ao redor de -0,8 V, relacionado ao pesticida que foi redissolvido após a pré-concentração.

Os experimentos indicam a viabilidade do monitoramento da interação do peptídeo com o pesticida no pico de redução ao redor de -1,2 V.

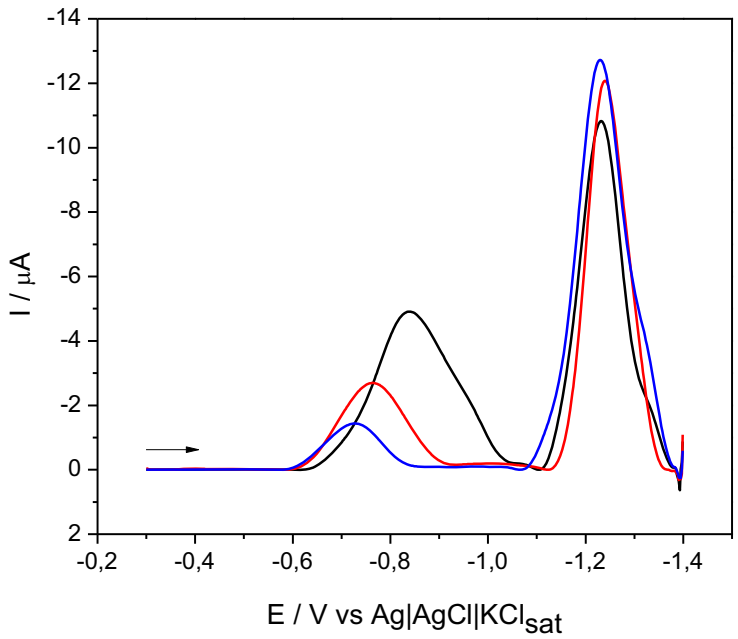


Figura 41. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} para a superfície eletródica modificada com o peptídeo 1 x 10^{-3} mol L^{-1} (▬), modificada e após a pré-concentração de 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} (▬) e 1,0 x 10^{-7} mol L^{-1} (▬) do pesticida diclorvós; f = 250 s^{-1}, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV, pH do eletrólito = 6,0.

4.9 Resposta eletroquímica do peptídeo

Através dos estudos preliminares, observou-se que o peptídeo apresenta um pico de redução ao redor de -1,2 V, provavelmente associado à redução da ligação dupla do anel imidazólico da histidina, o que possibilita o desenvolvimento de metodologia de análise por SWV. A **Figura 42** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1}, no intervalo de potencial de -0,9 a -1,5 V, para o Au-CDtrodo sem modificação e modificado com 1x10^{-3} mol L^{-1} do peptídeo.

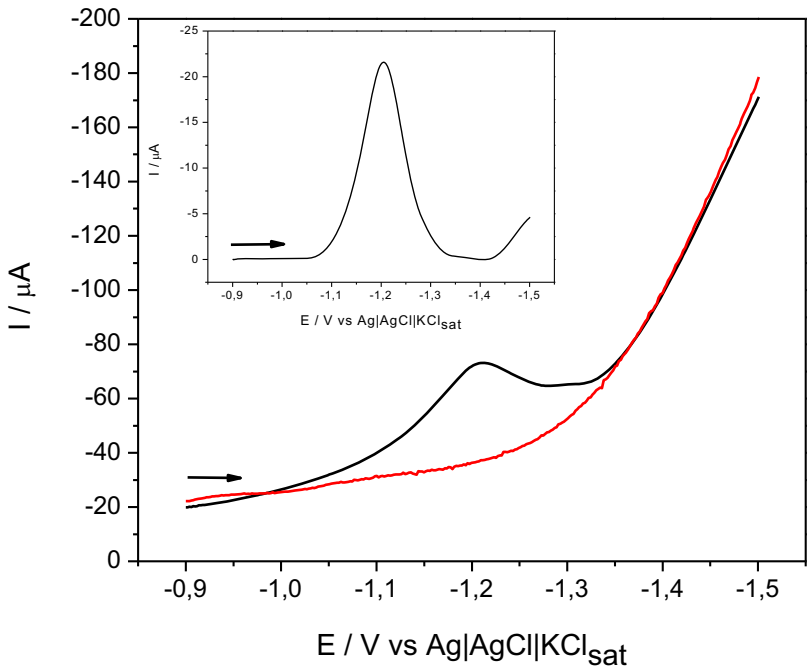


Figura 42. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em eletrólito de suporte ($NaClO_4$) (▬) e após a imobilização de $1x10^{-3}$ mol L^{-1} do peptídeo (▬); f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV e pH do eletrólito = 6,0. Inset: Ajuste da linha de base do voltamograma pelo software GPES 3.0.

Na **Figura 43** está representado o voltamograma de onda quadrada obtido em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1}, para o Au-CDtrodo modificado com $1x10^{-3}$ mol L^{-1} do peptídeo, no intervalo de potencial de -0,9 a -1,6 V, com suas respectivas separações de corrente. A componente direta de corrente está relacionada ao processo de redução e a componente reversa de corrente ao processo de oxidação. A ausência de corrente reversa demonstra que o processo é irreversível.

Em todos os experimentos realizados utilizando a técnica de SWV, foram consideradas as correntes resultantes para análise dos dados.

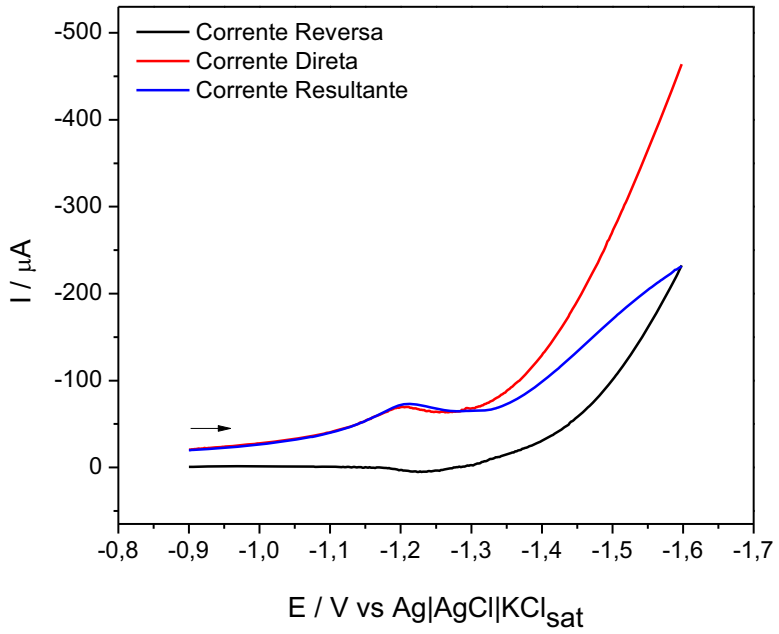


Figura 43. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o peptídeo imobilizado na superfície do Au-CDtrodo. Curvas correspondentes à corrente: direta (▬), reversa (▬) e resultante (▬).

O sítio ativo da acetilcolinesterase, assim como o peptídeo biomimético, apresenta a tríade catalítica (Ser 220-His 440-Glu 327) (**Figura 44**), responsável pela interação com o substrato. A ocorrência de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxilato do Glu e o N-1 do imidazol da His aumentam a habilidade do N-3 da His para atuar como uma base e extrair o H do grupo hidroxila da Ser, tornando o oxigênio um forte nucleófilo. Os pesticidas inibem a atividade da enzima se ligando ao sítio ativo e impedindo a conversão do substrato em produto. O mecanismo envolve o ataque nucleofílico da serina ao átomo de fósforo dos organofosforados ou ao carbono carbonílico dos carbamatos, que ficam ligados de forma covalente. Assim, ocorre a desativação da enzima, devido ao grupo hidroxila da serina não estar mais disponível para atacar o substrato acetilcolina.

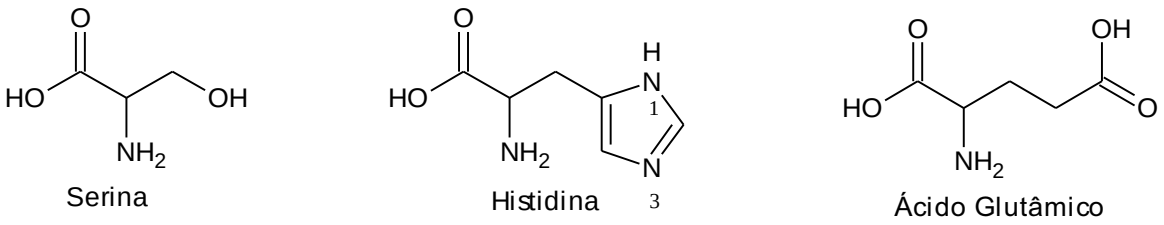


Figura 44. Estrutura dos aminoácidos que formam a tríade catalítica da acetilcolinesterase.

Tendo demonstrado a possibilidade de monitorar a interação do peptídeo com o pesticida no pico de redução ao redor de -1,2 V, e que, o aminoácido da tríade catalítica que

poderia estar sofrendo redução neste potencial seria a histidina (anel imidazólico), realizou-se experimentos para avaliar o comportamento eletroquímico da histidina livre em solução.

A **Figura 45** mostra o voltamograma de onda quadrada obtido para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} contendo 1 x 10^{-2} mol L^{-1} de histidina, no intervalo de potencial de -0,9 a -1,4 V. Observa-se que a histidina apresenta um pico ao redor de -1,2 V, sendo atribuído portanto, à redução do anel imidazólico da histidina presente na estrutura do peptídeo.

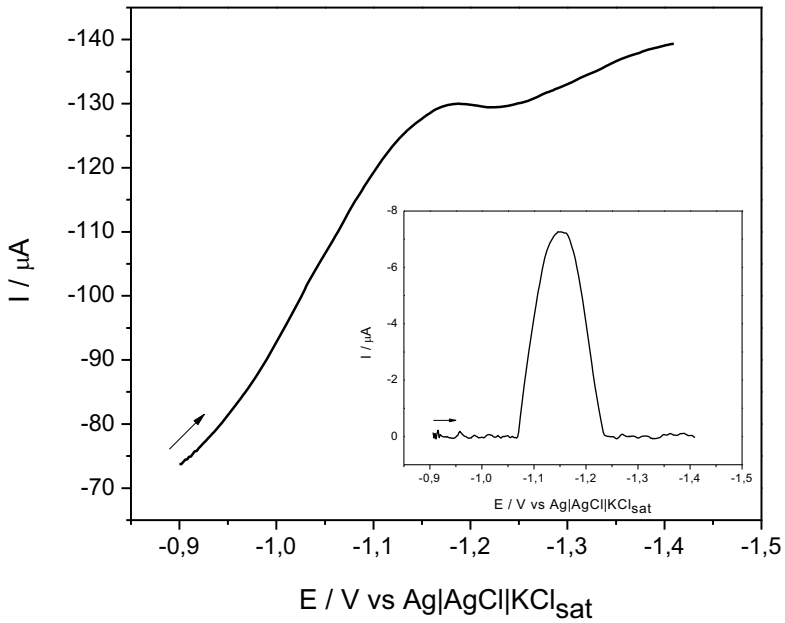


Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ contendo 1 x 10^{-2} mol L^{-1} de histidina; f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 2 mV e pH do eletrólito = 6,0. Inset: Ajuste da linha de base do voltamograma pelo software GPES 3.0.

4.10 Otimização das condições experimentais para a construção do sensor

No desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica, é necessária a otimização dos parâmetros que possam influenciar na resposta voltamétrica. Neste estudo, avaliou-se a influência da concentração do peptídeo e do tempo de incubação para sua imobilização, do pH do eletrólito e dos parâmetros da voltametria de onda quadrada[89], como freqüência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s), buscando desta forma o melhor sinal analítico.

4.10.1 Influência da concentração do peptídeo e tempo de incubação

Na otimização das condições experimentais, a utilização do planejamento fatorial possibilita definir quais parâmetros afetam de forma mais significativa a análise. Além disso, permite analisar o sistema de maneira multivariada, buscando estudar todas as variáveis que compõem o sistema experimental, pela existência de interação entre os parâmetros estudados, o que não seria possível ser percebido em uma otimização univariada.

Nesta etapa, o planejamento fatorial completo 2^2 foi utilizado para avaliar a influência da concentração de peptídeo e do tempo de incubação para sua imobilização na superfície do Au-CDtrodo. A **Tabela 3** apresenta as combinações de valores de concentração e tempo de incubação com as respectivas intensidades de corrente obtidas.

Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial completo 2^2 e respectivas intensidades de corrente obtidas

Experimento	$C_{peptídeo}$ (x 10^{-4} mol L^{-1})	$t_{incubação}$ (h)	I (μA)
1	5	1	15,9
2	10	1	23,6
3	5	12	12,5
4	10	12	24,1
5	5	1	13,7
6	10	1	21,9
7	5	12	11,6
8	10	12	23,4
9	5	1	14,7
10	10	1	22,8
11	5	12	10,4
12	10	12	21,5

Através dos resultados apresentados na **Tabela 3** e com o auxílio do *Minitab® 15 Statistical Software* foi possível avaliar a influência de cada parâmetro sobre o sistema. Observa-se no Gráfico de Pareto (**Figura 46**) que a variável que influencia significativamente na resposta é a concentração do peptídeo. Já o tempo de incubação não apresentou influência no processo de imobilização.

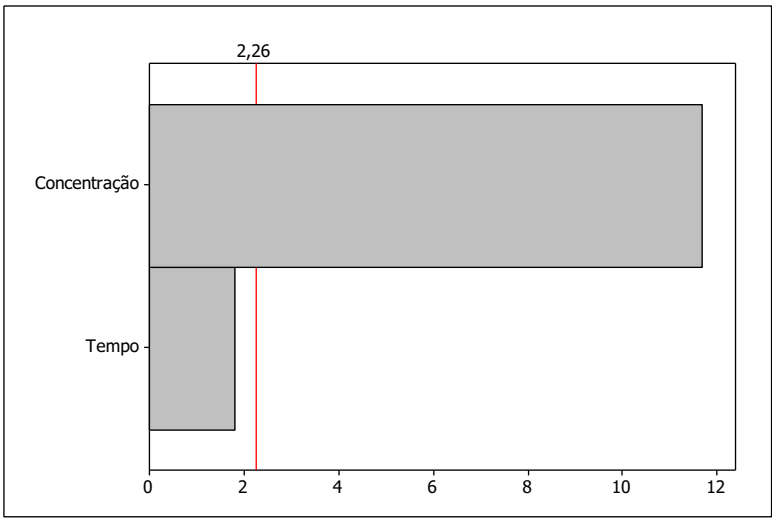


Figura 46. Gráfico de Pareto: influência das variáveis na imobilização do peptídeo no Au-CDtrodo.

A influência dos níveis altos e baixos das variáveis a serem otimizadas também foram avaliadas. As retas apresentadas na **Figura 47** expressam a tendência em termos da intensidade de corrente quando se altera o parâmetro do nível baixo para o nível alto. Quanto mais inclinada for a reta, maior a influência do parâmetro sobre o sistema. Observa-se que a intensidade de corrente tende aumentar para valores mais altos de concentração do peptídeo, enquanto que o tempo de incubação não apresentou influência no sistema, evidenciado pela pequena inclinação da reta.

O aumento da concentração do peptídeo leva à imobilização de uma maior quantidade de material biológico na superfície do Au-CDtrodo e consequemente resulta no aumento da intensidade de corrente referente à redução do anel imidazólico da histidina, aminoácido que compõe a estrutura do peptídeo. Portanto, os parâmetros avaliados foram fixados, sendo a concentração de peptídeo de 1 x 10^{-3} mol L^{-1} e um tempo de incubação de 1 h.

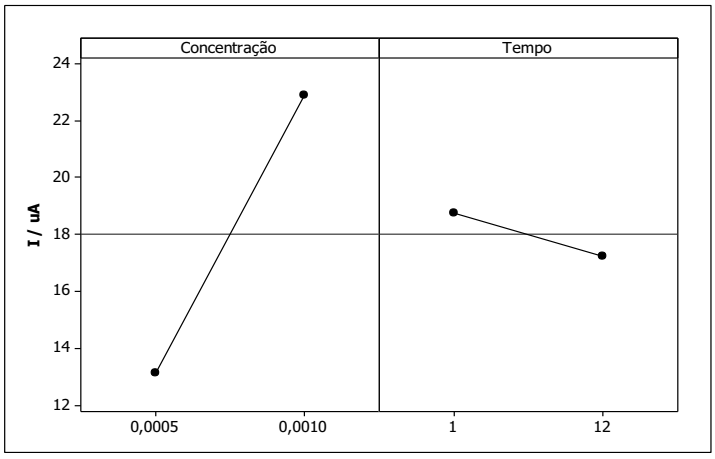


Figura 47. Gráfico de tendência: intensidade de corrente para os níveis alto e baixo de cada variável.

4.10.2 Influência do pH do eletrólito

A sensibilidade da resposta analítica do sensor em diferentes valores de pH do eletrólito ($NaClO_4$) foi investigada na faixa de 2 a 10 através do voltamograma de onda quadrada do Au-CDtrodo modificado com o peptídeo. Observa-se na **Figura 48** que a maior intensidade de corrente foi obtida no intervalo pH de 6,0 a 8,0; o pH ótimo da enzima acetilcolinesterase se localiza ao redor de 7,0[90]. Portanto, o pH 6,0 do eletrólito de suporte foi fixado para as próximas etapas.

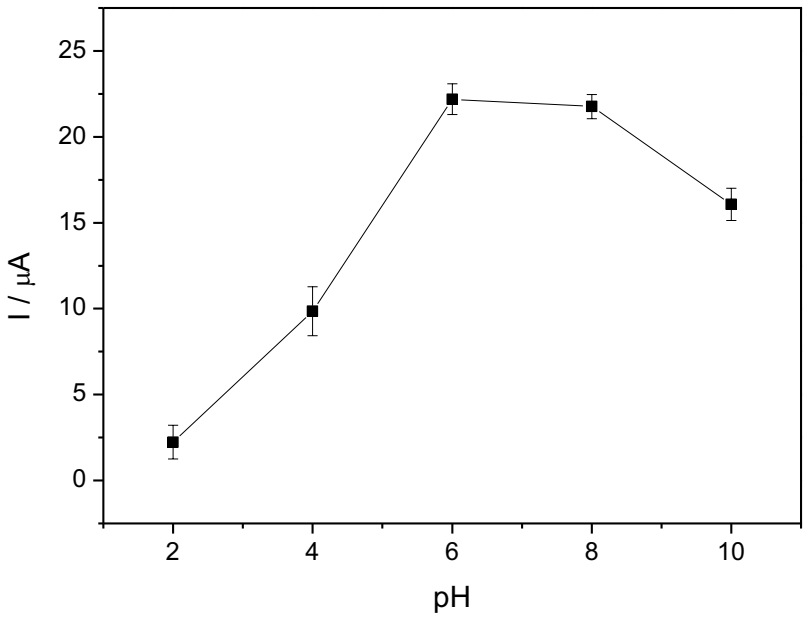


Figura 48. Efeito do pH do eletrólito ($NaClO_4$) no sinal de corrente do peptídeo imobilizado na superfície do Au-CDtrodo.

4.10.3 Influência dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Para sistemas onde ocorram reações irreversíveis[91], a corrente de pico é dada pela seguinte relação:

$$I_p = \text{constante}\ \alpha\ n^2\ a\ f\ \Delta E_s^{\,x}\ t_0^{1/2}\ A^* \qquad (11)$$

Assim, pode-se aumentar a sensibilidade da resposta voltamétrica variando os parâmetros de frequência (*f*), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s).

4.10.3.1 Influência da freqüência (*f*)

A frequência da onda quadrada é um parâmetro muito importante da SWV, pois é ela quem determina a intensidade dos sinais e consequentemente a sensibilidade do método. Neste estudo, variou-se a frequência de 20 a 250 Hz. Observa-se na **Figura 49** que com o aumento no valor da frequência, ocorre um aumento proporcional na intensidade de corrente de pico. Além disso, não houve influência significativa na largura de meia onda ($\Delta E_{p/2}$). Portanto, a frequência de trabalho escolhida por apresentar um voltamograma bem definido e com maior corrente de pico foi de 250 Hz.

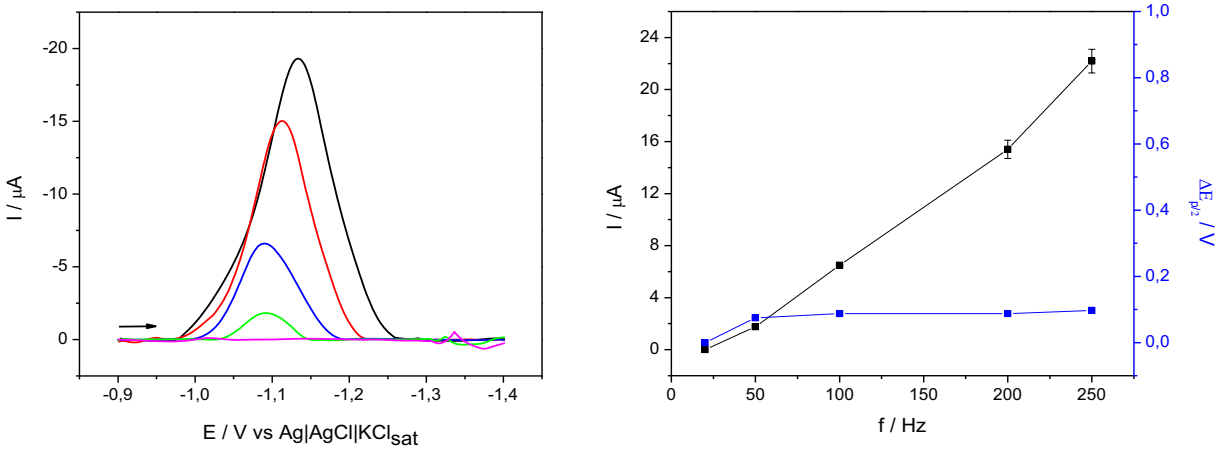


Figura 49. Influência das frequências (*f*) = 20, 50, 100, 200 e 250 Hz na corrente de pico, mantendo a amplitude e o incremento de potencial constantes em 50 e 2 mV, respectivamente.

4.10.3.2 Influência da amplitude de pulso (a)

A sensibilidade analítica na voltametria de onda quadrada também sofre grande influência com a variação da amplitude de onda. A **Figura 50** mostra o efeito da variação da amplitude na intensidade da corrente de pico do peptídeo. Observa-se que valores acima de 50 mV parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos. Assim como no caso da frequência, a largura de meia onda manteve-se praticamente constante. Em função disto, optou-se em trabalhar com amplitude de onda quadrada de 50 mV.

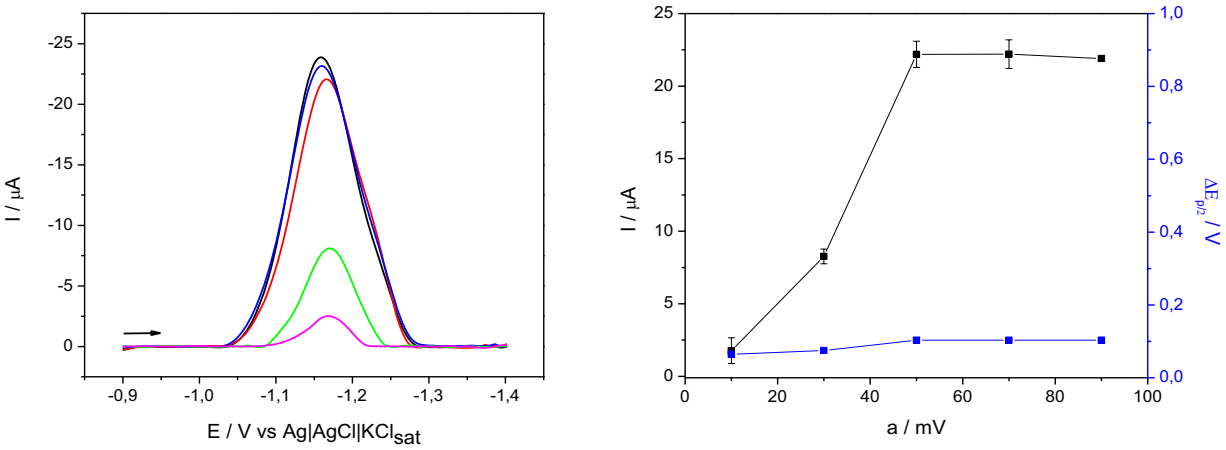


Figura 50. Influência da amplitude (a) = 10, 30, 50, 70 e 90 mV na corrente de pico, mantendo a amplitude e o incremento de potencial constantes em 250 Hz e 2 mV, respectivamente.

4.10.3.3 Influência do incremento de varredura (ΔE_s)

A velocidade na voltametria de onda quadrada é o resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura. Assim, um incremento de potencial maior pode aumentar o sinal obtido, melhorando a sensibilidade do método. A **Figura 51** mostra o efeito do incremento de varredura na corrente de pico para o peptídeo. Observa-se que com o aumento do incremento de varredura ocorre um aumento na corrente de pico, atuando de modo significativo na sensibilidade do sistema para fins analíticos. À partir de 10 mV, observa-se que a largura de meia onda começa a aumentar, podendo comprometer a resolução dos picos. Desta forma, optou-se por utilizar um incremento de potencial de 10 mV.

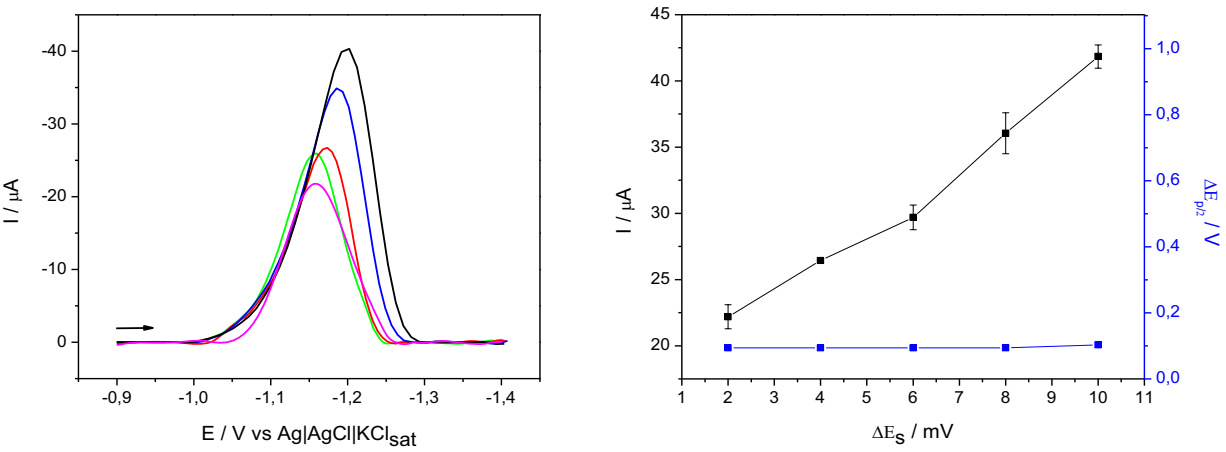


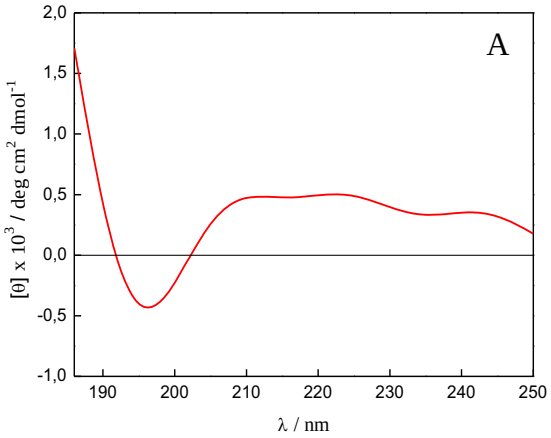
Figura 51. Influência do incremento de potencial (ΔE_s) = 2, 4, 6, 8 e 10 mV na corrente de pico, mantendo a frequência e a amplitude constantes em 250 Hz e 50 mV, respectivamente.

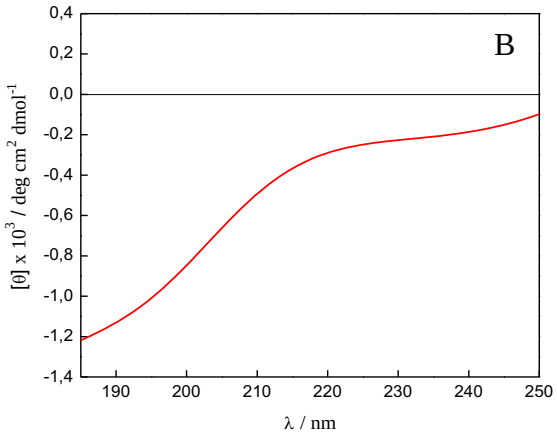
4.11 Dicroísmo Circular

A análise conformacional do peptídeo é uma estratégia muito importante na busca de informações sobre sua atividade biológica. Assim, o peptídeo foi analisado por meio da técnica de dicroísmo circular (**Figura 52**). Estes estudos foram realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 (A), em água (B) e em trifluoretanol (TFE) (C). O TFE atua como um solvente indutor de estruturas. Observa-se que o peptídeo, em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, apresenta uma estrutura ao acaso (*random coil*), com uma banda negativa em 195 nm. Em meio aquoso, a ausência de bandas indicam uma estrutura sem definição. Já com o indutor de estruturas (TFE), observa-se uma banda positiva em 190 nm e uma banda negativa em 205 nm, que pode estar associada à formação de dobras β tipo 1 (*turns*)[92] na estrutura do peptídeo, previstas pelos estudos de modelagem molecular.

Os resíduos de glicina e prolina frequentemente aparecem nas dobras β. A glicina por ser um resíduo de aminoácido pequeno e flexível, e a prolina devido às ligações peptídicas que envolvem o nitrogênio imínico facilmente assumirem a configuração cis, uma forma que é particularmente susceptível a se dobrar[71].

A análise da estrutura do peptídeo por dicroísmo circular nos diferentes meios é importante, uma vez que a interação do peptídeo com o pesticida depende da estrutura conformacional da molécula no meio em que será realizada a pré-concentração do pesticida.





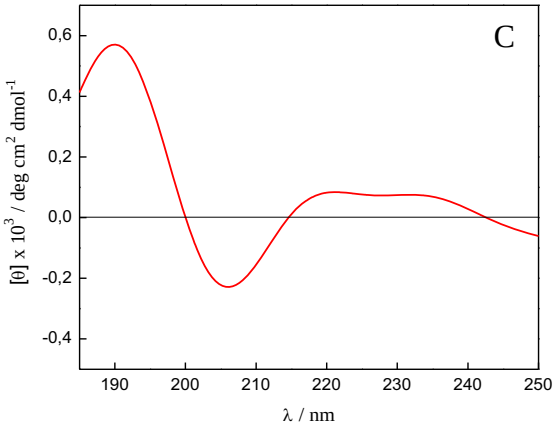


Figura 52. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo em solução tampão fosfato pH 7,0 (A), em água (B) e em solução de TFE (C).

4.12 Estudos de pré-concentração do pesticida na superfície do Au-CDtrodo modificado com o peptídeo

Para que a interação do peptídeo com o pesticida seja adequada, faz-se necessária a otimização de algumas variáveis tais como o meio, o pH e o tempo de pré-concentração.

4.12.1 Influência do meio de pré-concentração

A estrutura conformacional da molécula no meio em que será realizada a pré-concentração do pesticida é essencial para o bom funcionamento do sensor. Como meio de pré-concentração, foram avaliados 3 diferentes procedimentos, conforme detalhados abaixo:

Procedimento 1: Pré-concentração de diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1} em meio de acetonitrila durante 30 minutos. Este procedimento não se mostrou viável devido à rápida evaporação da acetonitrila e do desprendimento da fita de galvanoplastia empregada na delimitação da área do eletrodo.

Procedimento 2: Pré-concentração de diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1} em meio aquoso durante 30 minutos. Não foi observada interação do peptídeo com o pesticida devido à provável formação de ligações de hidrogênio e solvatação dos sítios responsáveis pela interação com o pesticida.

Procedimento 3: Pré-concentração de diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1} em meio de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0 durante 30 minutos. Observou-se interação do peptídeo com o pesticida, com uma porcentagem de inibição média de 48% (**Figura 53**). Assim, adotou-se a solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} pH 7,0 para os estudos posteriores de pré-concentração.

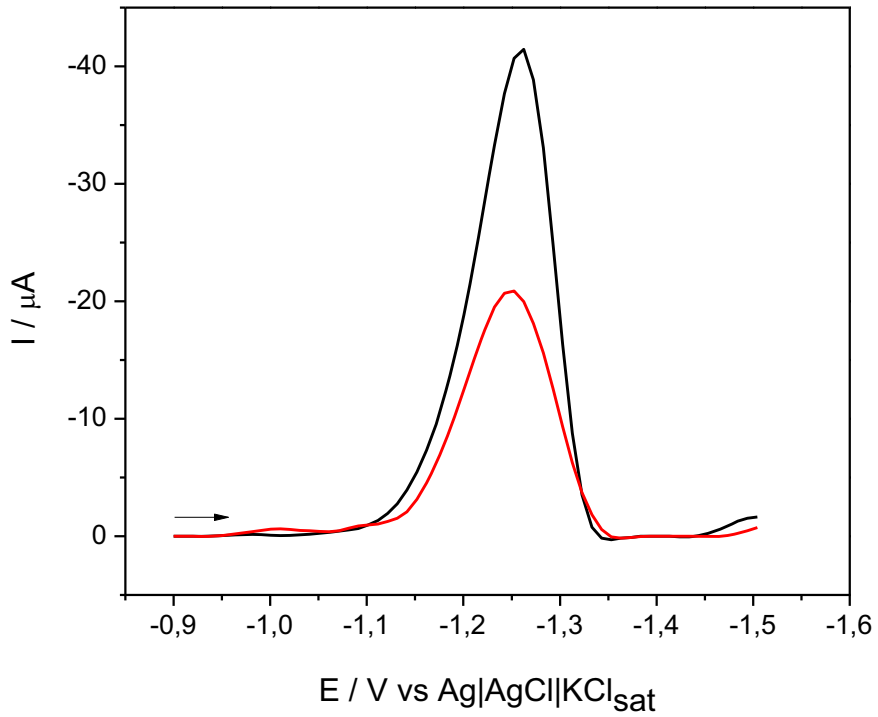


Figura 53. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} na ausência (▬) e na presença (▬) de pesticida diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1}; f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 10 mV e pH do eletrólito = 6,0.

4.12.2 Influência do pH na pré-concentração

As cargas das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da acetilcolinesterase refletem no pH ótimo da enzima atuando como ácidos ou bases fracas, que podem impedir o desempenho funcional das enzimas, assim como no caso do peptídeo que mimetiza seu sítio ativo.

A **Figura 54** mostra o efeito do pH na resposta eletroquímica do peptídeo. Observa-se que no pH 7,0 há uma maior porcentagem de inibição durante a pré-concentração realizada em um tempo de 30 minutos. Considerando que o ponto isoelétrico do peptídeo é 5,12, a carga negativa (-1) no pH 7,0 mostrou ser a mais adequada para que os resíduos de

aminoácidos estejam na conformação e na condição ideal para a interação com o pesticida, sendo este pH fixado para os próximos estudos.

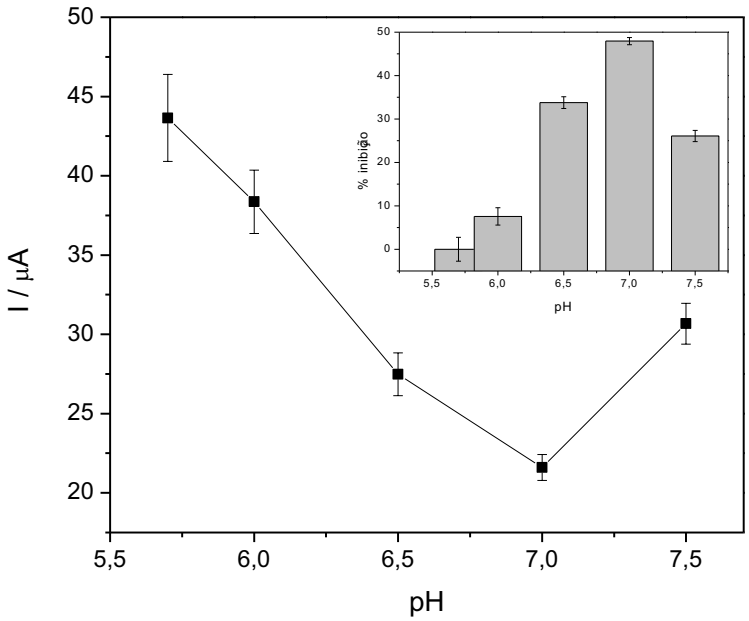


Figura 54. Gráfico da intensidade de corrente em função do pH na pré-concentração do pesticida diclorvós. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do pH de pré-concentração.

4.12.3 Influência do tempo de pré-concentração

Após otimizar o meio e o pH, avaliou-se a influência do tempo de pré-concentração no sinal analítico em 5, 15, 30, 45 e 60 minutos. Observa-se na **Figura 55** que a porcentagem de inibição aumenta com o tempo de pré-concentração até a estabilização ao redor de 45 minutos. Este comportamento para tempos maiores pode ser atribuído a saturação dos sítios ativos do peptídeo na superfície do eletrodo. Como a partir de 15 minutos houve uma diferença de apenas 9% em relação ao tempo de 45 minutos, optou-se por fixar o tempo de pré-concentração em 15 minutos.

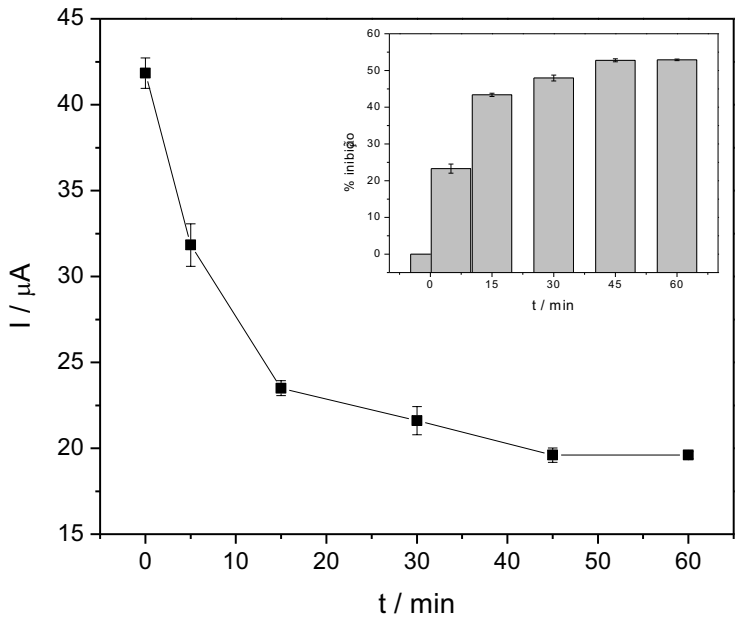


Figura 55. Gráfico da intensidade de corrente em função do tempo na pré-concentração do pesticida diclorvós. Inset: Histograma da porcentagem de inibição em função do tempo de pré-concentração.

Otimizados os parâmetros da pré-concentração, avaliou-se a interação do peptídeo com o pesticida através de voltametria cíclica. A **Figura 56** apresenta os voltamogramas cíclicos em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} após a etapa de interação com o pesticida diclorvós 1 x 10^{-5} mol L^{-1} com um tempo de pré-concentração de 15 minutos em meio de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Conforme apresentado na **Figura 34**, uma porcentagem de recobrimento de 68% foi atingida após a imobilização do peptídeo. Já após a interação com o pesticida (**Figura 56**), a porcentagem de recobrimento foi para 42%.

Este resultado pode ser explicado por meio da organização das moléculas na superfície do eletrodo. Ao interagir com o pesticida, o peptídeo atinge sua conformação ideal, de modo a se auto-organizar devido à formação do complexo peptídeo-pesticida, que ocasiona a liberação da superfície, melhorando a transferência eletrônica. Outra possibilidade está relacionada à densidade de carga na superfície do eletrodo. Estando o peptídeo com carga negativa no pH 7,0, há uma repulsão dos íons ferrocianeto, dificultando a transferência eletrônica. Após a interação com o pesticida, sugere-se uma diminuição das cargas negativas na superfície, o que diminui a repulsão dos íons ferrocianeto e consequentemente melhora a transferência eletrônica, gerando uma menor porcentagem de recobrimento da superfície.

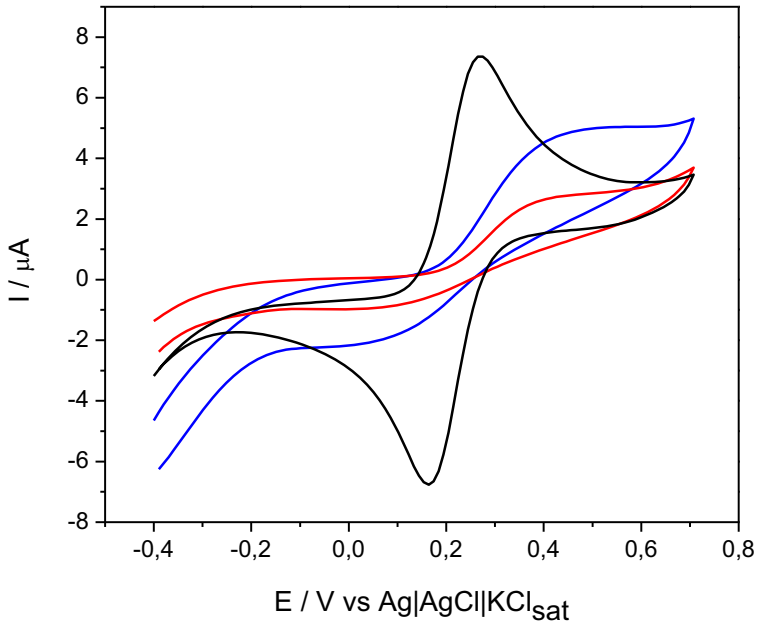


Figura 56. Voltamogramas cíclicos do Au-CDtrodo, sem modificação (▬), modificado com o peptídeo (▬) e após a interação do peptídeo com o pesticida (▬), em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} *vs* Ag|AgCl|KCl_{sat}; ν = 50 mV s^{-1}.

4.13 Curva analítica para o pesticida diclorvós

Após a otimização de todas as variáveis envolvidas no processo de desenvolvimento do sensor, foi construída a curva analítica (**Figura 57**). As respectivas porcentagens de inibição foram calculadas através da comparação da intensidade de corrente obtida para o eletrodo submetido ao mesmo meio e tempo de pré-concentração, na presença e ausência do pesticida, segundo procedimento descrito na seção **3.11**.

A curva apresentou-se linear na faixa de 1 x 10^{-8} mol L^{-1} a 7 x 10^{-7} mol L^{-1}, com coeficiente de correlação de 0,9998. Os limites de detecção e quantificação do método desenvolvido foram de 1,40 x 10^{-8} mol L^{-1} e 4,66 x 10^{-8} mol L^{-1}, respectivamente. Estes valores estão abaixo das concentrações médias definidas como LMR aceitáveis pela ANVISA para amostras de alimentos, que se situam na faixa de 8,20 x 10^{-7} mol L^{-1} para os limites de detecção e 1,64 x 10^{-6} mol L^{-1} para os limites de quantificação.

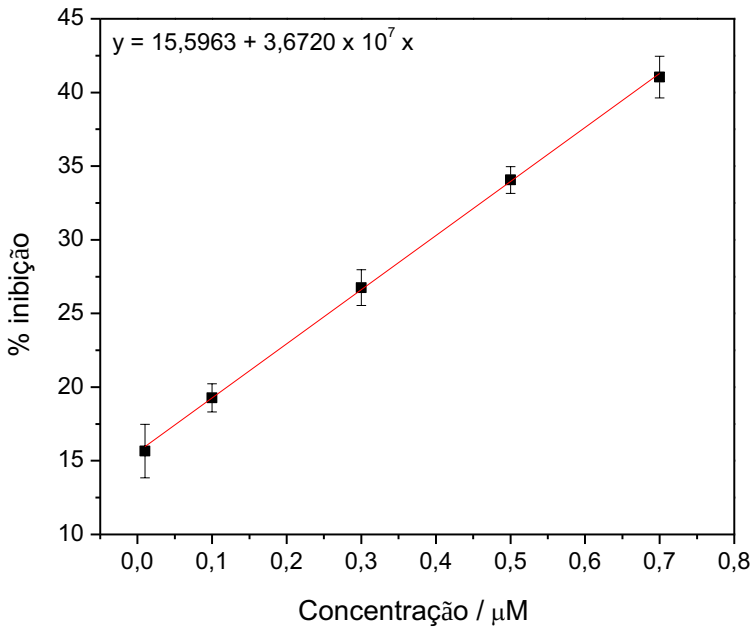


Figura 57. Curva analítica da porcentagem de inibição em função da concentração do pesticida diclorvós.

4.14 Estudo preliminares de seletividade

A seletividade do sensor biomimético foi avaliada de forma preliminar com os pesticidas organofosforados acefato, diclorvós e metamidofós, com o carbamato carbaril e com os herbicidas clomazone e metribuzin, cujas estruturas estão apresentadas na **Figura 58**. A etapa de pré-concentração consistiu na adição de 10 μL de uma solução 5 x 10^{-7} mol L^{-1} dos pesticidas por um tempo de pré-concentração de 15 minutos sobre a superfície do eletrodo.

Os resultados apresentados na **Tabela 4** indicam que além do diclorvós, os pesticidas organofosforados acefato e metamidofós e o carbamato carbaril também apresentaram interação com o peptídeo, conforme esperado.

No caso do clomazone, não foi observado interação com o peptídeo, estando coerente com a seletividade do peptídeo para as classes dos organofosforados e carbamatos. Porém, o metribuzin apresentou uma inibição do sinal do peptídeo. A provável hipótese é de que como há um enxofre na estrutura deste pesticida, pode ter sido formada uma ligação com a superfície de ouro. Assim, a estrutura do peptídeo fica comprometida e o sistema tem sua transferência eletrônica dificultada.

Outras investigações devem ser realizadas bloqueando a superfície do eletrodo previamente à etapa de pré-concentração evitando a adsorção inespecífica de moléculas na superfície do eletrodo.

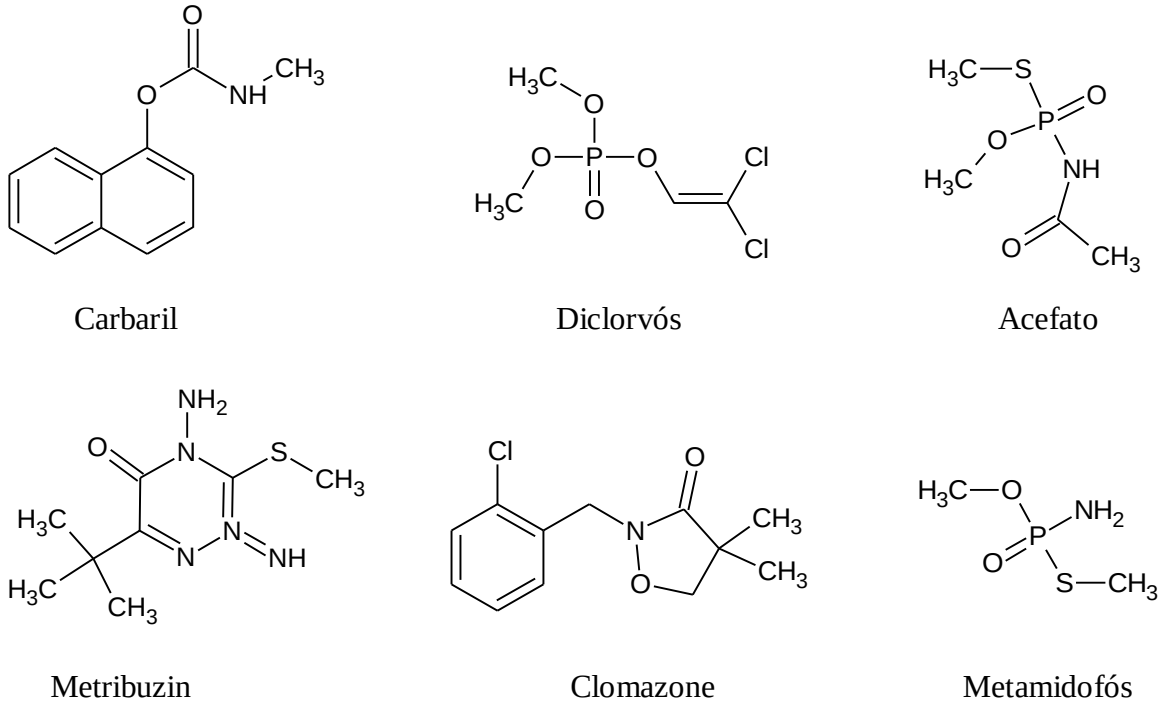


Figura 58. Fórmula estrutural dos pesticidas utilizados no teste de seletividade.

Tabela 4. Avaliação da seletividade do sensor biomimético para diferentes classes de pesticidas.

Pesticida	Porcentagem de inibição (%)
Carbaril	36,9 ± 0,3
Diclorvós	34,1 ± 0,4
Metamidofós	44,0 ± 2,2
Acefato	33,1 ± 4,1
Metribuzin	53,5 ± 5,7
Clomazone	Não apresentou inibição

4.15 Estudo da estabilidade do peptídeo imobilizado na superfície do eletrodo

A estabilidade de estocagem refere-se a capacidade da molécula biológica manter sua atividade durante o período entre sua produção e seu uso. Assim, a estabilidade do sensor foi avaliada após a etapa de imobilização do peptídeo biomético segundo as condições descritas na seção **3.13**.

Através do histograma apresentado na **Figura 59,** observa-se que a melhor condição para estocagem do dispositivo é na geladeira, sendo que a intensidade de corrente após 7 dias mantêm cerca de 82%. Já a temperatura ambiente, a intensidade de corrente cai para 62% e em câmara úmida, tanto em geladeira quanto à temperatura ambiente, a porcentagem permanece ao redor de 60%. As quedas nas porcentagens de corrente para as condições apresentadas podem estar relacionadas à degradação do peptídeo, como por exemplo pela ação da temperatura, assim como pela provável formação de óxido na superfície do eletrodo, o que diminui a transferência eletrônica além de comprometer a estabilidade do peptídeo imobilizado.

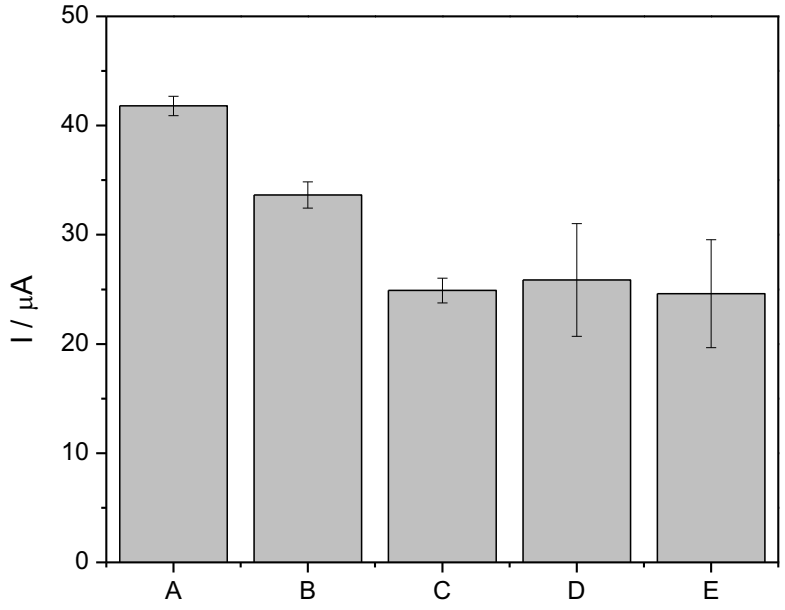


Figura 59. Histograma da intensidade de corrente para o Au-CDtrodo utilizado logo após a imobilização (A) e estocado durante 7 dias: (B) na geladeira, (C) na geladeira em câmara úmida, (D) à temperatura ambiente e (E) à temperatura ambiente em câmara úmida.

4.16 Aplicação em amostras de alimentos

Para os estudos em amostras de alimentos, selecionou-se a cenoura e o tomate, culturas das quais foram identificados resíduos de diclorvós pela ANVISA[21], para a execução dos ensaios de recuperação, de acordo com a metodologia descrita na seção **3.14**.

A **Figura 60 A e B** mostra os voltamogramas obtidos em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} após a realização da etapa de pré-concentração de 5 x 10^{-7} mol L^{-1} do pesticida diclorvós com as amostras de cenoura e tomate por 15 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada através da comparação da intensidade de corrente obtida para o eletrodo submetido ao mesmo meio e tempo de pré-concentração, na presença e ausência do pesticida. O valor da concentração do analito foi obtido pela extrapolação na curva analítica.

Em seguida, foram obtidas as porcentagens de recuperação (**Tabela 5**), que demonstram que a metodologia desenvolvida é sensível e está na faixa de 80 a 120 % exigida pela ANVISA para determinação quantitativa do analito[93].

Tabela 5. Porcentagens de recuperação do diclorvós em amostras de cenoura e tomate.

Amostra	Recuperação (%)
Cenoura	106,8 ± 5,2
Tomate	96,7 ± 5,6

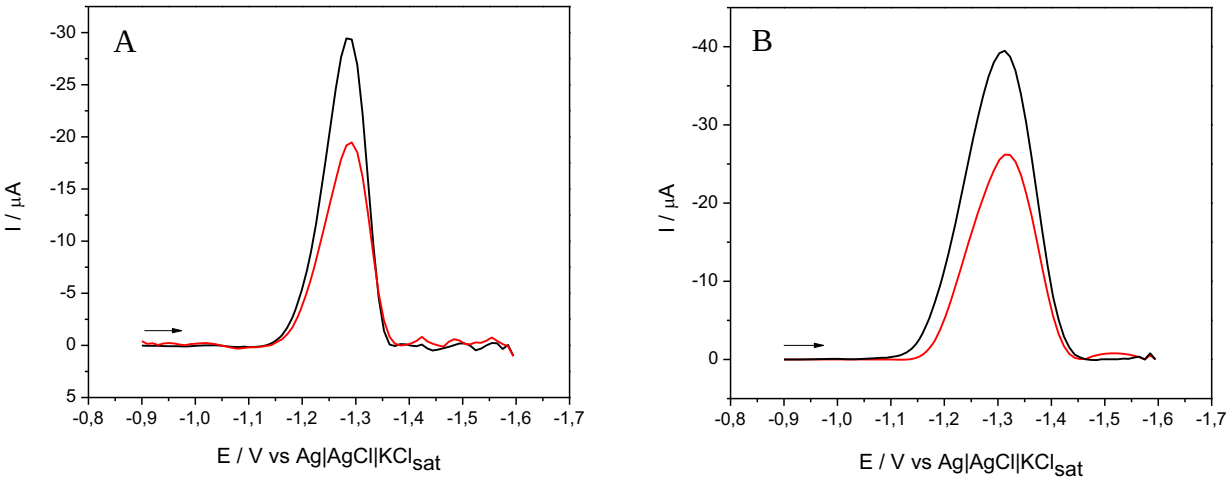


Figura 60. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Au-CDtrodo em meio de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} para as amostras de cenoura (A) e tomate (B) na ausência (▬) e na presença (▬) de pesticida diclorvós 5 x 10^{-7} mol L^{-1}; f = 250 Hz, a = 50 mV, ΔE_s = 10 mV e pH do eletrólito = 6,0.

5 CONCLUSÕES

O trabalho envolveu a síntese, purificação e caracterização do peptídeo proposto por estudos de modelagem molecular para mimetizar o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase e possibilitou o desenvolvimento de metodologia analítica para detectar pesticida em amostras de alimentos empregando técnica eletroanalítica.

Por meio da síntese de peptídeos em fase sólida obtiveram-se duas sequências peptídicas, sendo a sequência proposta por modelagem molecular e outra na qual foi inserido o aminoácido cisteína com a finalidade de imobilizá-lo de forma ordenada na superfície de ouro, com purezas de 97 e 98%, respectivamente.

Os estudos espectrofotométricos envolvendo o peptídeo e o pesticida diclorvós demonstraram um forte processo de interação ($K = 4 \times 10^5\ M^{-1}$), sendo que o aparecimento de um pico em 250 nm foi atribuído a formação de um complexo peptídeo-pesticida.

A utilização dos eletrodos descartáveis à base de CD-R (Au-CDtrodo), por serem de construção simples, rápida e de baixo custo, apresentou-se como uma alternativa viável no desenvolvimento do sensor biomimético. A superfície do Au-CDtrodo limpa e modificada com o peptídeo foi caracterizada por meio das técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia por energia dispersiva de raios X, difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo e microscopia de força atômica. Observou-se que a imobilização é realizada por toda a superfície, tanto no vale entre as trilhas quanto nas próprias trilhas de gravação do CD-R.

A otimização das condições experimentais para a imobilização do peptídeo na superfície do Au-CDtrodo foram realizadas por meio de planejamento fatorial. Os parâmetros avaliados que conduziram aos melhores resultados correspondem a concentração de peptídeo de 1×10^{-3} mol L^{-1} e o tempo de incubação de 1 h à 25 ºC. A estratégia de inserir cisteina para imobilizar o peptídeo indicou recobrimento de 68 % da superfície, que esta em consonância com outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Demonstrou-se a viabilidade do monitoramento da interação do peptídeo com o pesticida pela inibição do pico de redução ao redor de -1,2 V. Para a obtenção de uma melhor sensibilidade de detecção, os parâmetros da voltametria de onda quadrada foram avaliados. As condições mais adequadas foram obtidas utilizando uma frequência de 250 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e o incremento de potencial de 10 mV.

As análises de dicroísmo circular revelaram uma estrutura do tipo *random coil* para o peptídeo em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e a provável formação de dobras

(*turns*) em meio de TFE. A análise da estrutura do peptídeo por dicroísmo circular nos diferentes meios foi importante para a adequação do melhor meio de pré-concentração.

Os resultados obtidos com o peptídeo imobilizado na superfície eletródica demonstraram que a pré-concentração do pesticida deve ser realizada em meio de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L^{-1} pH 7,0 em um tempo de pré-concentração de 15 minutos.

A seletividade preliminar do sensor biomimético foi avaliada para os pesticidas diclorvós, carbaril, metamidofós, acefato, metribuzin e clomazone. Os resultados indicam que o pesticida clomazone não apresenta interação com o peptídeo. Além do diclorvós, os pesticidas organofosforados acefato e metamidofós e o carbamato carbaril também apresentaram interação com o peptídeo, conforme esperado. Embora o metribuzin tenha apresentado uma inibição do sinal do peptídeo, outras investigações devem ser realizadas bloqueando a superfície do eletrodo previamente à etapa de pré-concentração para evitar a adsorção inespecífica de moléculas na superfície do eletrodo.

Avaliaram-se as formas de estocagem do eletrodo após a etapa de imobilização sendo que o armazenamento na geladeira possibilitou 82% de estabilidade do peptídeo imobilizado após um período de 7 dias.

Com todas as variáveis do sistema otimizadas, a curva analítica para o pesticida diclorvós foi construída, sendo obtidos limites de detecção e quantificação de $1,40 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} e $4,66 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}, respectivamente. Estes valores estão bem próximos ou com desempenho superior aos biossensores que utilizam a enzima acetilcolinesterase imobilizada na superfície de eletrodos publicados na literatura (Di Tuoro et al.[37], Chauhan et al.[39], Song et al.[40]), apresentando a vantagem de ser um peptídeo de estrutura menos complexa e com maior estabilidade que a enzima.

A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de cenoura e tomate fortificadas com 5×10^{-7} mol L^{-1} do pesticida diclorvós, sem qualquer pré-tratamento da amostra, obtendo-se recuperações aceitáveis, sendo muito importante para detectar pesticidas organofosforados e carbamatos em alimentos. No caso da necessidade de identificar e quantificar individualmente cada pesticida apenas aquelas amostras positivas seriam submetidas ao pré-tratamento para posterior análise empregando CLAE.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Investigação de bloqueio da superfície eletródica previamente à etapa de pré-concentração evitando a adsorção inespecífica de moléculas;

2. Realização da etapa de pré-concentração em meio do indutor de estruturas TFE;

3. Avaliação da seletividade do sensor empregando diferentes classes de pesticidas;

4. Aplicação do sensor biomimético para outras amostras de alimentos.

REFERÊNCIAS

1 SAMPAIO, M. R. F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS and liquid chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 2, p. 197-205, 2012.

2 PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estud. Av.**, v. 15, n. 43, p. 303-326, 2001.

3 PRATI, G.; PIETRANTONI, L.; ZANI, B. The prediction of intention to consume genetically modified food: test of an integrated psychosocial model. **Food Qual. Prefer.**, v. 25, n. 2, p. 163-170, 2012.

4 COSTA, T. E. M. M.; DIAS, A. P. M.; SCHEIDEGGER, E. M. D; MARIN, V. A. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 327-336, 2011.

5 PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

6 PANG, G. F.; CAO, Y.; ZHONG, J. J.; FAN, C. L.; LIU, Y. M.; LI, X. M.; JIA, G. Q.; LI, Z. Y.; SHI, Y. Q.; WU, Y. P.; GUO, T. T. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography clean up/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1125, n. 1, p.1-30, 2006.

7 RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L. C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **Holos Environ.**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2008.

8 OS PERIGOS dos agrotóxicos no Brasil. **Carta Capital**. Disponível em: <http://www.cartacapital.com.br/sociedade/os-perigos-dos-agrotoxicos-no-brasil>. Acesso em: 8 jan. 2012.

9 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota técnica de esclarecimento sobre o risco do consumo de frutas e hortaliças cultivadas com agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d0c9f980474575dd83f3d73fbc4c6735/nota+tecnica+risco+consumo+frutas+e+hortalicas.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 fev. 2012.

10 ARBUCKLE, T. E.; LIN, Z.; MERY, L. S. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n. 8, p. 851-857, 2001.

11 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Nova publicação orienta sobre eficiência na aplicação de agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2010/janeiro/1a-semana/nova-publicacao-orienta-sobre-eficiencia-na-aplicacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 8 fev. 2012.

12 JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

13 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Rev. de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

14 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos. nota técnica – resultados PARA 2008 e 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3989428047457d5189a7dd3fbc4c6735/nota+tecnica+-+resultados+para+2008.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 8 jan. 2011.

15 UM TERÇO dos alimentos consumidos pelos brasileiros estão contaminados por agrotóxicos. **Jornal Meio Ambiente**. Disponível em: <http://jornalmeioambiente.com/materia/3359/um-terco-dos-alimentos-consumidos-pelos-brasileiros-esta-contaminado-por-agrotoxicos>. Acesso em: 5 maio 2012.

16 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: reavaliações de produtos agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Reavaliacoes+de+Agrotoxicos/W+Reavaliacao+de+Agrotoxicos++Resolucao+RDC+n+10+2008>. Acesso em: 8 jan. 2011.

17 FERREIRA, A.; MAROCO, E.; YONAMINE, M.; OLIVEIRA, M. L. F. Organophosphate and carbamate poisonings in the northwest of Paraná state, Brazil from 1994 to 2005: clinical and epidemiological aspects. **Braz. J. Pharmac. Scien.**, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2008.

18 GALLI, A.; SOUZA, D. de; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

19 BERTRAND, N.; BARCELÓ, D. Photodegradation of the carbamate pesticides aldicarb, carbaryl and carbofuran in water. **Anal. Chim. Acta**, v. 254, n. 1, p. 235-244, 1991.

20 OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO, S. A. S. Quantificação do pesticida diclorvós por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 911-915, 2004.

21 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: nota técnica – resultados PARA 2010. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6abf74ed75891ae/Relatório+PARA+2010+-+Versão+Final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 5 maio 2012.

22 MILLARD, C. B.; KRYGER, G.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H. M.; HAREL, M.; RAVES, M. L.; SEGALL, Y.; BARAK, D.; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7032-7039, 1999.

23 SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

24 CAVALIERE, M. J.; CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; PUGA, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 1996.

25 XU, Z. X.; FANG, G. Z.; WANG, S. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. **Food Chem.**, v. 119, n. 2, p. 845-850, 2010.

26 PRIMEL, E. G.; MILANI, M. R.; DEMOLINER, A.; NIENCHESKI, L. F. H.; ESCARRONE, A. L. V. Determination and application of methods using SPE, HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS and GFAAS for the determination of herbicides and metals in surface and drinking water. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 90, n. 14, p. 1048-1062, 2010.

27 WANG, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H.; SHI, Y.; REN, R.; ZHANG, H.; YU, Y. Application of pneumatic nebulization single-drop microextraction for the determination of organophosphorous pesticides by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Sep. Sci**, v. 34, p. 1880-1885, 2011.

28 PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; GARCIA, M. D. Determination of N-methylcarbamate pesticides in environmental samples by an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1164, n. 1/2, p. 174-180, 2007.

29 MA, J.; XIAO, R.; LI, J.; ZHAO, X.; SHI, B.; LI, S. Determination of organophosphorous pesticides in underground water by SPE-GC-MS. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 47, n. 2, p. 110-115, 2009.

30 WU, C-C; WANG, Y-S.; LUR, H-S. Multiresidue method for high-performance liquid chromatography determination of carbamate pesticides residues in tea samples. **J. Environ. Sci. Health, Part B**, v. 44, n. 1, p. 58-68, 2009.

31 RAJU, M. B.; RAO, C. N.; KUMAR, G. V. R.; RAO, T. B.; KRISHNA, P. M.; SREENIVASULU, V.; PRASAD, K.; VENKATESWARLU, P. Method for the determination of organophosphorous pesticide residues in okra (*ABLEMOSCHUS ESCULENTUS*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 35, n. 3, p. 375-384, 2012.

32 SINHA, S. N.; RAO, M. V. V.; VASUDEV, K.; ODETOKUN, M. A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples. **Food Control.**, v. 25, n. 2, p. 636-646, 2012.

33 LIU, Z.; LIU, W.; HUAN, R.; FENG, T.; LI, C.; WANG, C.; WANG, Z. Determination of some carbamate pesticides in watermelon and tomato samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 92, n. 5, p. 571-581, 2012.

34 MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

35 RAGHU, P.; REDDY, T. M.; SWAMY, B. E. K.; CHANDRASHEKAR, B. N.; REDDAIAH, K.; SREEDHAR, M. Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples: a cyclic voltammetric study. **J. Electroanal. Chem.**, v. 665, p. 76-82, 2012.

36 SUN, X.; WANG, X. Y. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, n. 12, p. 2611-2614, 2010.

37 DI TUORO, D.; PORTACCIO, M.; LEPORE, M.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; BENCIVENGA, U.; MITA, D. G. An acetylcholinesterase biosensor for determination of low concentrations of paraoxon and dichlorvos. **New Biotechnol.**, v. 29, n. 1, p. 132-138, 2011.

38 SU, S.; HE, Y.; ZHANG, M. L. High-sensitivity pesticide detection via silicon nanowires–supported acethylcholinesterase-based electrochemical sensors. **Appl. Phys. Lett.**, v. 93, n. 2, p. 1-3, 2008.

39 CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorous insecticides. **Anal. Chim. Acta**, v. 701, n. 1, p. 66-74, 2011.

40 SONG, Y.; ZHANG, M.; WANG, L.; WAN, L.; XIAO, X.; YE, S.; WANG, J. A novel biosensor based on acetylcholinesterase/Prussian blue-chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. **Electrochim. Acta**, v. 56, n. 21, p. 7267-7271, 2011.

41 SKLADAL, P.; NUNES, G. S.; YAMANAKA, H.; RIBEIRO, M. L. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. **Electroanalysis**, v. 9, n. 14, p. 1083-1087, 1997.

42 TIKHONOVA, O. V.; SKVORTSOV, V. S.; RAEVSKY, O. A. Molecular modeling of acetylcholinesterase interaction with irreversible and reversible organophosphorous inhibitors. **Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B.**: Biomed. Chem., v. 4, n. 4, p. 342-352, 2010.

43 MASCINI, M.; SERGI, M.; MONTI, D.; CARLO, M. D.; COMPAGNONE, D. Oligopeptides as mimic acethylcholinesterase: from the rational design to the application in solid-phase extraction for pesticides. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 23, p. 9150-9156, 2008.

44 MILLARD, C. B.; KRYGER, G.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H. M.; HAREL, M.; RAVES, M. L.; SEGALL, Y.; BARAK, D; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7032-7039, 1999.

45 KOVARIK, Z.; RADI C, Z.; BERMAN, H. A.; SIMEON-RUDOLF, V.; REINER, E.; TAYLOR, P. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. **Biochem. J.**, v. 373, p. 33-40, 2003.

46 SANTOS, H. F. O conceito da modelagem molecular. **Quim. Nova na Escola**, n. 8, p. 3-6, 1998.

47 SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Ver. Virtual Quim.**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

48 RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Quim. Nova na Escola**, n. 3, p. 43-49, 2001.

49 HUANG, S-Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, n. 8, p. 3016-3034, 2010.

50 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

51 GODINEZ, L. A. Substratos modificados con monocapas autoensambladas: dispositivos para fabricar sensores y estudiar procesos químicos e fisicoquímicos interfaciales. **Rev. Soc. Quím. Méx.**, v. 43, n. 6, p. 219-229, 1999.

52 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.

53 WU, J.; PARK, J. P.; DOOLEY, K.; CROPEK, D. M.; WEST, A. C.; BANTA, S. Rapid development of new protein biosensors utilizing peptides obtained via phage display. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 1-9, 2011.

54 LEVY, R. Peptide-capped gold nanoparticles: towards artificial proteins. **ChemBioChem**, v. 7, n. 8, p. 1141-1145, 2006.

55 RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H.; MIOSHI, R. N.; ANGNES, L. Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 366, n. 5, p. 444-448, 2000.

56 FOGUEL, M. V.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. Avaliação da limpeza de CDtrodo construídos à partir de CD de ouro gravável/fita adesiva de galvanoplastia. **Eclet. Quím.**, v. 34, n. 2, p. 59-66, 2009.

57 ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H. Gold electrodes from recordable CDs. **Anal. Chem.**, v. 72, n. 21, p. 5503-5506, 2000.

58 FOGUEL, M. V.; SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor for Chagas' disease using gold CD-R transducer. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2555-2561, 2011.

59 CRISTEA, N. I.; RADULESCU, M. C.; CIOMARTAN, R. Mercury determination in fish samples by flow injection using gold electrodes made from CD-R's. **Rev. Chim.**, v. 62, n. 10, p. 951-957, 2011.

60 PAIXÃO, R. L. C.; BERTOTTI, M. Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using prussian blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration. **Sens. Actuators, B**, v. 137, n. 1, p. 266-273, 2009.

61 KIRKPATRICK, D. C.; ANTWI, C.; MARTIN, R. S. Use of recordable compact discs to fabricate electrodes for microchip-based analysis systems. **Anal. Methods**, v. 2, n. 7, p. 811-816, 2010.

62 MILLER, C.; CUENDET, P.; GRATZEL, M. J. Adsorbed omega-hydroxy thiol monolayers on gold electrodes: evidence for electron tunneling to redox species in solution. **Phys. Chem.**, v. 95, p. 877-886, 1991.

63 FULLER, M. P. E.; GRIFFITHS, P. R. Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 50, p.1906-1910, 1978.

64 SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: dosagem por regressão multivariada. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 3, p. 437-445, 2006.

65 ALLEN, T.; RUTHERFORD, S.; MURRAY, S.; REIPERT, S.; GOLDBERG, M. Field emission scanning electron microscopy and visualization of the cell interior. In: CELIS, J. E. **Cell biology**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2006. v. 3, cap. 33, p. 325-333.

66 OLIVEIRA, D. M. F. **Síntese e caracterização de óxidos metálicos nanoestruturados e sua utilização em nanocompósitos com poli (álcool vinílico)**. 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

67 ALBERS, A. P. F.; MELCHIADE, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.

68 FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

69 SIDNEY, P. C. W.; NATHAN, O. K. **Methods in enzimology**. New York: Academic Press, 1955. v.1.

70 MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

71 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

72 MARQUARDT, M.; LIMA, V. L. E. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

73 NOWAK, C. L. **Design, synthesis and evaluation of bicyclic peptides as ammonium ionophores**. 2003. 103 p. Thesis (Degree of Master of Science in Chemistry), Worcester Polytechnic Institute, Massachusetts, 2003.

74 GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerases bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

75 Cleavage, deprotection and isolation of peptides after fmoc synthesis. **Technical Bulletin**.

Disponível em:

<http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_marketing/documents/generaldocuments/cms_040654.pdf>. Acesso em: 8 fev 2012.

76 MILIO, F. R.; LOFFREDO, W. M. **Qualitative testing for amino acids and proteins**. Pennsylvania: Chemical Education Sources, 1995. 12 p.

77 ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. **Solid phase peptide synthesis**: a pratical approach. Oxford: Oxford University Press, 1989. 216 p.

78 PEARSON, D. A.; BLANCHETTE, M.; BAKER, M. L.; GUINDON, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. **Tetrahedron Lett.**, v. 30, n. 21, p. 2739-2742, 1989.

79 ZHAO, G-C.; ZHU, J-J.; CHEN, H-Y. Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of beta-ciclodextrin. **Spectrochim. Acta, Part A.**, v. 55, n. 5, p. 1109-1117, 1999.

80 MOCAK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques (technical report). **Pure Appl. Chem.**, v. 69, n. 2, p. 297-328, 1997.

81 FEIGENBRUGEL, V.; LOEW, C.; LE CALVÉ, S.; MIRABEL, P. Near-UV molar absortivities of acetone, alachlor, metolachlor, diazinon and dichlorvos in aqueous solution. **J. Photochem. Photobiol., A**, v. 174, n. 1, p. 76-81, 2005.

82 WINK, S.; ORLOWSKI, M. Determination of specify of endopeptidases by combined high-performance liquid chromatography and amino acid analysis. **J. Chromatogr., A**, v. 249, n. 1, p. 121-129, 1982.

83 MASON, B. D.; McCRACKEN, M.; BURES, E. J.; KERWIN, B. A. Oxidation of free L-histidine by tert-Butylhydroperoxide. **Pharm. Res.**, v. 27, n. 3, p. 447-456, 2010.

84 AKRAM, M.; STUART, M. C.; WONG, D. K. Y. Direct application strategy to immobilise a thioctic acid self-assembled monolayer on a gold electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 504, n. 2, p. 243-251, 2004.

85 CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C.; FATÁS, E.; PINGARRÓN, J. M. Characterization of alkanethiol-self assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **J. Electroanal. Chem.**, v. 586, n. 1, p. 112-121, 2006.

86 FOGUEL, M. V. **Desenvolvimento de imunossensor para aflatoxina B_1**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

87 JANEK, R. P.; FAWCETT, W. R. Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au(111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes. **Langmuir**, v. 14, n. 11, p. 3011-3018, 1998.

88 SUBBALAKSHMAMMA, M.; REDDY, S. J. Electrochemical reduction behavior and analysis of some organophosphorous pesticides. **Electroanalysis**, v. 6, n. 5, p. 521-526, 1994.

89 PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 844-849, 2003.

90 STOYTCHEVA, M. Electrochemical evaluation of the kinetic parameters of a heterogeneous enzyme reaction in presence of metal íons. **Electroanalysis**, v. 14, n. 13, p. 923-927, 2002.

91 SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

92 PERCZEL, A.; FASMAN, G. D. Quantitative analysis of cyclic β-turn models. **Protein Sci.**, v. 1, n. 3, p. 378-395, 1992.

93 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 02 maio 2012.