UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

Lívia Flório Sgobbi

**Potencialidades do ácido 4-[(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico como
biomimético para a esterase da acetilcolina**

São Carlos
2012

Lívia Flório Sgobbi

Potencialidades do ácido 4-[(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico como biomimético para a esterase da acetilcolina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, *como requisito para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos

2012

Exemplar revisado.

**O exemplar original encontra-se disponível no
Serviço de Pós-Graduação do IQSC-USP.**

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao
Usuário do SBI/IQSC*

Sgobbi, Livia Flório
Potencialidades do ácido 4-[(1E)etanohidrazonoil]benzóico como
biomimético para a esterase da acetilcolina. / Livia Flório Sgobbi. -- São
Carlos, IQSC, 2012.
117 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2012.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Anatonio Spinola Machado

1. Analítica. 2. Eletroanalítica. 3. Molécula biomimética. 4.
Acetilcolinesterase. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

*Aos meus pais, Ariovaldo e Kátia, por todas as oportunidades e pelo incentivo à
sabedoria desde sempre...*

Aos meus tios, Anete e André, pelo apoio e por acreditarem em mim...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ariovaldo e Kátia, pelo carinho, compreensão e por estarem sempre ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos meus tios, Anete e André, que me proporcionaram oportunidades únicas.

Ao meu irmão, Hugo, pelos momentos de companheirismo e alegria.

Ao Rodrigo por todo o carinho, companheirismo e pelo apoio nessa fase tão importante da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pelos ensinamentos, ideias, oportunidades e principalmente, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Bender Burtoloso por tornar possível o desenvolvimento deste projeto, pelas discussões e pelo aprendizado que tive.

Ao doutorando Vagner D. Pinho pela paciência acima de tudo, por me ensinar tanta coisa durante esses dois anos.

Aos Dr. Leandro Gurgel e Prof. Dr. Fergus Gessner pelos ensinamentos em cinética química.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza por fornecer suporte para complementar este projeto.

Aos técnicos João Tiengo e Marcelo L. Calegaro pela ajuda nos mais diversos assuntos.

Aos amigos que aqui encontrei, Bruno Manzolli e Natalia Ashino, pelos momentos inesquecíveis e pela amizade.

Ao Dr. Murilo Feitosa Cabral pelas discussões que me ajudaram a enriquecer este trabalho.

Aos companheiros do GMEME, Dyovani, Tiago, Sara, Tony, Deodato, Milena, Raquel, Cláudia, Jaqueline, Patrícia, Fernando, Ivana, Vivian, Heloísa, Diego, pela amizade e pelo companheirismo profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

Obrigada!

“O verdadeiro conhecimento é para o homem como o sol que fecunda o solo.”

N. F. S. Grundtvig

RESUMO

SGOBBI, L. F. **Potencialidades do ácido 4-[(1*E*)etanohidrazonoil]benzoico como biomimético para a esterase da acetiltiocolina.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

O uso de agrotóxicos e a consequente contaminação têm sido motivo de constante preocupação, sendo necessário monitorar esses compostos por metodologias que as quantifiquem em água e alimentos. As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a este tipo de análise, mas apresentam desvantagens para aplicações “in situ” ou em tempo real. As técnicas eletroquímicas, como os biossensores enzimáticos que utilizam a acetilcolinesterase, têm sido estudadas para a determinação quantitativa de pesticidas em diferentes amostras. No entanto, as enzimas apresentam algumas desvantagens relacionadas com sua capacidade de desnaturação e com a inibição por outras espécies. Diante disso, foi proposta neste projeto a síntese de uma molécula mimética [ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico] para a acetilcolinesterase para catalisar a hidrólise do substrato (acetiltiocolina). A molécula mimética foi caracterizada por RMN e FTIR. Os produtos da reação, acetato e tiocolina, foram identificados pelo método de Ellman e FTIR. A cinética química do processo catalítico foi estudada, verificando-se que a reação era de primeira ordem em relação à concentração de acetiltiocolina e a constante de velocidade foi $0,623\text{ s}^{-1}$. Os dados experimentais obtidos com a molécula artificial foram aplicados ao modelo cinético de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos foram determinados, constatando que a constante de velocidade calculada foi 13000 vezes menor que aquela calculada pelo método diferencial, o que mostrou a inconveniência de aplicar tal modelo enzimático aos catalisadores sintéticos. Além disso, verificou-se que o K_M é uma constante que não possui significado quando aplicada às moléculas miméticas.

Palavras-Chave: Cinética química; acetilcolinesterase; molécula biomimética.

ABSTRACT

SGOBBI, L. F. **Potentialities of 4-[(1*E*)ethanehydrazonoyl]benzoic acid as a biomimetic for acetylthiocholine esterase.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The application of pesticides and the resulting contamination have been a matter of constant concern, being necessary to monitor these compounds by methods that are able to quantify these compounds in water and food. The chromatographic techniques are most often used for this kind of analysis, but present some drawbacks for “in situ” or in real time applications. Electrochemical techniques, like biosensors based on the inhibition of acetylcholinesterase, have been studied for the quantitative determination of pesticides in different samples. However, the use of enzymes is complicated due to their ability to denaturation and the possible inhibition by other species. Therefore, in this project the synthesis of [4-(1*E*)ethanehydrazonoyl]benzoic acid], a mimetic molecule for acetylcholinesterase, was carried out, aiming the catalysis of acetylcholine hydrolysis. The mimetic molecule was characterized by NMR and FTIR. The products of reaction, such as acetate and thiocholine, were identified by Ellman's method and FTIR. The chemical kinetic of the catalytic process was characterized as of first order with respect to the acetylthiocholine concentration with a rate constant of 0.623 s^{-1} . The experimental data obtained with the artificial molecule were applied to the Michaelis-Menten's model and the kinetic parameters were determined, noting that the rate constant was calculated as 13000 times smaller than that obtained by the differential method, which indicates the inconvenience of using the enzymatic model to the mimetic catalysts. Moreover, it was found that K_M has no meaning when applied to mimetic molecules.

Keywords: Chemical kinetic; acetylcholinesterase; biomimetic molecule.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos componentes de um biossensor divididos em tipos de materiais biológicos e de transdutores.	22
Figura 2: Esquema referente à transmissão de um impulso nervoso. ACh designa o neurotransmissor acetilcolina, M1 são os receptores nicotínicos, M2 são os receptores muscarínicos, AChE-S é a acetilcolinesterase e vAChT são as vesículas que transportam acetilcolina	27
Figura 3: A) Representação do dímero da AChE de <i>Torpedo californica</i> , com um monômero em verde e o outro em vermelho. B) Representação da estrutura tetramérica da AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	28
Figura 4: A) Esquema da cavidade do sítio ativo da AChE do <i>Torpedo californica</i> , mostrando os principais resíduos que compõe o sítio periférico aniônico, o sítio catalítico aniônico e a tríade catalítica. B) Modelo da ACh ligada no sítio ativo da AChE do <i>Torpedo californica</i>	29
Figura 5: Mecanismo da hidrólise da acetilcolina.	30
Figura 6: Mecanismo clássico da inibição da AChE por pesticidas organofosforados.....	32
Figura 7: Mecanismo de inibição da AChE por carbamatos.	33
Figura 8: Estrutura molecular do cloreto de acetiltiocolina.	33
Figura 9: Curva de Michaelis-Menten que mostra a dependência da velocidade inicial com a concentração de substrato.....	38
Figura 10: Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco).	40
Figura 11: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor competitivo. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor competitivo.	42
Figura 12: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor não-competitivo, onde $\alpha = \alpha'$. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor não-competitivo.	43
Figura 13: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor incompetitivo. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor incompetitivo.....	44
Figura 14: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor misto. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor misto.	45
Figura 15: Representação excêntrica dos fatores envolvidos na oxidação enzimática seletiva	50
Figura 16: A) Molécula mimética da AChE proposta por <i>Hof et al.</i> (2003) que não apresenta atividade catalítica. B) Molécula mimética proposta por <i>Biros et al</i> (2003). para AChE que apresenta estabilidade em água.....	54
Figura 17: Comparação da estrutura da molécula mimética com o substrato acetilcolina.....	56
Figura 18: Esquema da síntese da molécula biomimética.	61
Figura 19: A) Reação de hidrólise da acetiltiocolina catalisada pela AChE. B) Reação entre o produto da catálise enzimática e o reagente de Ellman (DTNB), cuja formação do TNB^{2-} é monitorada espectrofotometricamente em 412 nm.	62
Figura 20: Espectro de RMN ¹ H do ácido 4-acetilbenzóico em CD ₃ OD.	67

Figura 21: Espectro de RMN ¹ H do ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) em CD ₃ OD.	68
Figura 22: Espectros no infravermelho do (•) ácido 4-acetilbenzóico e do (•) ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil) benzóico; mostrando as bandas dos grupos característicos de cada molécula como mostrado na Tabela 2.	70
Figura 23: Ampliação da região do espectro no infravermelho da (•) molécula mimética para verificar a banda do grupo hidrazona em 1628 cm ⁻¹	71
Figura 24: Espectro de RMN ¹ H do ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) em solução de D ₂ O.	72
Figura 25: Espectro de RMN ¹ H do ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) após 1 semana em solução de D ₂ O armazenada na geladeira.	73
Figura 26: Espectro de RMN ¹ H do ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) após 3 meses em solução de tampão BR pH 7 armazenada na geladeira.	74
Figura 27: Curvas de Michaelis-Menten para diferentes concentrações de enzima: (•) 0,15 U; (•) 0,3 U e (•) 1,5 U.	76
Figura 28: Efeito da concentração de DTNB na hidrólise da ATCh. (•) 5x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (•) 5x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (•) 2,5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (•) 2,5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (•) 5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (•) 5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (•) 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (•) 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (•) 2,5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (•) 2,5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB. ...	79
Figura 29: Espectro de UV-Vis acetiltiocolina em tampão BR (•) pH 7,0 e (•) pH 8,0; na presença de DTNB.	80
Figura 30: A) Fotos do experimento de hidrólise espontânea da ATCh na presença de DTNB em pHs 7 e 8, no tempo zero. B) Fotos do mesmo experimento após três dias. Todos feitos em tampão BR.	82
Figura 31: Curvas de Michaelis-Menten feitas com 0,3 U de AChE, com concentração de ATCh de 5x10 ⁻⁶ a 1x10 ⁻³ mol L ⁻¹ (•) feita no mesmo mês e (•) feita após quatro meses.	83
Figura 32: Curvas de Michaelis-Menten. (•) 0,3U de AChE em solução; (•) 1x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ de carbaril; (•) 5x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ de carbaril e (•) 1x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril.	85
Figura 33: Curvas de Michaelis-Menten. (•) 0,3U de AChE em solução; (•) 1x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de carbaril; (•) 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de parathion e (•) 1x10 ⁻³ mol L ⁻¹ de parathion.	87
Figura 34: Mecanismo especulativo da hidrólise da ATCh catalisado pela molécula mimética para formação de acetato e tiocolina, restaurando o catalisador ao final do processo.	88
Figura 35: Experimento cinético para avaliar o efeito catalítico de 4x10 ⁻³ mol L ⁻¹ da molécula mimética, variando-se a concentração de ATCh: (•) 2x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; (•) 5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; (•) 7x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; (•) 1x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; (•) 1,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; (•) 2x10 ⁻³ mol L ⁻¹ e (•) 3x10 ⁻³ mol L ⁻¹	90

Figura 36: Fotografias do experimento espectrofotométrico relacionado à formação do TNB^{2-} após 1 hora. A) 1: [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 2: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 3: tampão BR pH 7; [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5}$. B) 1: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 2: [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.	91
Figura 37: Experimento cinético para avaliar a influência da concentração de catalisador na velocidade da reação de hidrólise da [ATCh] = $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. (•) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (•) $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram as concentrações de molécula mimética.	92
Figura 38: Espectros no infravermelho para verificar os produtos de reação da hidrólise da acetiltiocolina, catalisada pela molécula mimética. (•) ATCh; (•) mistura reacional (proporção 1:1 de molécula mimética e ATCh) e (•) acetato de sódio.	96
Figura 39: Ampliação da região do espectro no infravermelho da (•) ATCh e (•) mistura reacional para verificar o desaparecimento da banda em 630 cm^{-1} após a reação.	97
Figura 40: Esquema da reação de catálise homogênea da hidrólise da ATCh.	99
Figura 41: Curvas de absorvância <i>versus</i> tempo para diferentes concentrações de substrato (ATCh) e concentração fixa de substrato em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Concentrações de ATCh foram (•) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (•) $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.	102
Figura 42: Gráfico de $\ln v$ <i>versus</i> $\ln [\text{ATCh}]$. A concentração de molécula mimética foi mantida constante ($6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).	104
Figura 43: Curva de Michaelis-Menten aplicada aos dados experimentais obtidos para a molécula mimética, na catálise do substrato ATCh.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos de inibidores sobre os parâmetros da equação de Michaelis-Menten	44
Tabela 2 - Grupos característicos do precursor ácido 4-acetilbenzóico e do ácido (4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil)benzóico	69
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos para concentrações diferentes de AChE	76
Tabela 4 - Efeito do carbaril nos parâmetros cinéticos da AChE	86
Tabela 5 - Efeito do carbaril nos parâmetros cinéticos da AChE	87
Tabela 6 - Velocidade da reação catalisada pela molécula mimética e a relação com sua concentração	93
Tabela 7 - Bandas no infravermelho características da acetilticolina e dos produtos de reação da hidrólise da ATCh	97
Tabela 8 - Valores de velocidade de formação do produto de reação	103
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos determinados para a molécula mimética	107

LISTA DE SIGLAS

OPs: Organofosforados

AChE: Acetilcolinesterase

LMR: Limites Máximos de Resíduos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

SNVS: Sistema nacional de Vigilância Sanitária

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG: Cromatografia Gasosa

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

DDP: Diferença de Potencial Elétrico

ACh: Acetilcolina

ATCh: Acetilcolina

PAS: Sítio Aniônico Periférico

FTIR: Infravermelho com transformada de Fourier

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)

s: singleto

d: dubleto

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO 16

1.1 – MONITORAMENTO DE PESTICIDAS E SEUS RESÍDUOS	16
1.2 – Métodos de detecção	19
1.2.2.1 - Acetilcolinesterase	25
1.3 – Cinética Enzimática	34
1.4 – ESTADO DA ARTE	47
1.4.1 – Moléculas miméticas para acetilcolinesterase	52

2 - OBJETIVOS 57

3 – METODOLOGIA 58

3.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES.....	58
3.2 – INSTRUMENTAÇÃO	59
3.2.1 – Medidas espectrofotométricas	59
3.2.2 – Instrumentação geral.....	59
3.3 – SÍNTESE DA MOLÉCULA BIOMIMÉTICA (ÁCIDO (4-(1E)-ETANOHIDRAZONOIL) BENZÓICO)	60
3.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM SOLUÇÃO	61
3.5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MOLÉCULA MIMÉTICA NA HIDRÓLISE DA ACETILTIOCOLINA (ATCh).....	63
3.5.1 – Método espectrofotométrico de Ellman	63
3.6 – IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE REAÇÃO DA HIDRÓLISE DA ACETILTIOCOLINA (ATCh) CATALISADA PELA MOLÉCULA MIMÉTICA	64
3.6.1 – Espectrometria no Infravermelho	64
3.7 – ANÁLISE DOS RESULTADOS DA CINÉTICA DE REAÇÃO	64

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

4.1 – CARACTERIZAÇÃO DA MOLÉCULA MIMÉTICA (ÁCIDO (4-(1E)-ETANOHIDRAZONOIL) BENZÓICO).....	66
4.1.1 – Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	66
4.1.2 - Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	69
4.1.3 – Estabilidade do ácido (4-(1E)-etanohidrazonoil) benzóico.....	71
4.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM SOLUÇÃO	75
4.2.1 – Otimização da concentração de acetilcolinesterase	75
4.2.2 – Efeito da concentração do DTNB	78

4.2.3 – Efeito do pH na hidrólise da acetilcolina.....	79
4.2.4 – Efeito do tempo de estocagem da AChE	82
4.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MOLÉCULA BIOMIMÉTICA NA HIDRÓLISE DA ACETILCOLINA (ACh)	88
4.3.1 – Método espectrofotométrico de Ellman	89
4.4 – AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE REAÇÃO DA HIDRÓLISE DA ACETILCOLINA (ACh) CATALISADA PELA MOLÉCULA MIMÉTICA....	94
4.4.1 – Espectrometria no Infravermelho (FTIR)	94

5 – CONCLUSÕES 108

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Monitoramento de pesticidas e seus resíduos

A demanda por alimentos torna inevitável a utilização de pesticidas, já que apenas com o emprego de agrotóxicos é possível assegurar o controle de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção da lavoura. Anualmente, cerca de 4 milhões de toneladas de pesticidas são aplicadas em lavouras em todo o mundo para controlar as pragas ¹. A fração desta quantidade que entra em contato direto, ou é consumida, pelas pragas alvo é extremamente pequena. Pimentel (1995) mostrou que a fração de pesticidas que atinge as pragas é menor que 0,1%; assim, 99,9% dos pesticidas aplicados encontram-se “em algum outro lugar” no meio ambiente².

Como o uso de pesticidas na agricultura, inevitavelmente, implica na exposição de organismos não visados, incluindo humanos; efeitos colaterais não desejados podem afetar estas espécies, assim como o ecossistema. Entre os efeitos nocivos causados ao homem por essas substâncias podem ser citados: danos ao sistema nervoso central e problemas no sistema reprodutivo e locomotor ^{3,4}.

O uso de agrotóxicos na produção agrícola e a conseqüente contaminação têm sido motivo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo dos diversos níveis do governo investimento e organização para implementar programas e ações de controle de resíduos que possam eliminar ou reduzir os riscos à saúde dos brasileiros quanto à presença destes resíduos na água e nos alimentos.

O estabelecimento e a regulamentação de limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos por agências governamentais de diversos países e pela Comissão da União Européia têm se tornado mais freqüente na última década ⁵. Esses procedimentos, em geral, visam garantir a segurança dos alimentos e a regulamentação do comércio externo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pertencente ao Ministério da Saúde, é o órgão responsável pelo estabelecimento do LMR para as culturas comercializadas no Brasil e pelo intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola; além de fazer a avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos.

A ANVISA iniciou em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Este programa é uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), coordenado pela ANVISA em conjunto com os órgãos de vigilância sanitária de 25 estados participantes e o Distrito Federal. Em 2009, o PARA monitorou 20 alimentos: abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate, uva, couve, beterraba e pepino. A escolha destas culturas baseou-se nos dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes Unidades da Federação e no uso intensivo de agrotóxicos nestas culturas.

Nessas análises foram investigados até 234 diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos, dependendo da cultura analisada. Desde 2001, o método analítico empregado pelos laboratórios do programa é o de Multiresíduos. Trata-se do mais

difundido e reconhecido método para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos⁶.

Os resultados observados nas culturas monitoradas pelo PARA dividem-se em duas categorias: resíduos que podem causar dano à saúde porque excederam os limites máximos estabelecidos pela legislação e os resíduos de produtos não autorizados para aquela cultura. A continuidade do PARA é importante para garantir a segurança dos alimentos consumidos pela população, identificar as fontes de contaminação, proporcionar avaliação quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos, bem como fornecer subsídios para possível reavaliação dos agrotóxicos ⁶.

O monitoramento de agrotóxicos nos alimentos constitui ferramenta importante para a caracterização e o gerenciamento dos riscos decorrentes do uso desses produtos nas condições reais de aplicação. A avaliação do risco envolvido na exposição ao pesticida exige a compreensão da dispersão de uma substância química no meio ambiente e a estimativa da concentração ambiental à qual os organismos serão expostos. Para isto, as concentrações de pesticidas em matrizes de solos, águas e ar devem ser precisamente avaliadas, muitas vezes envolvendo técnicas analíticas utilizadas “in situ” e que respondam em tempo real, para acompanhar o perfil de concentrações ou a contaminação local e temporal do meio ambiente ou de alimentos com pesticidas prejudiciais.

1.2 – Métodos de detecção

1.2.1 - Análises Cromatográficas

As técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), com diferentes tipos de detecção, são indiscutivelmente, as técnicas mais utilizadas para a análise de pesticidas em diferentes matrizes, entre elas água e sólidos residuais, água potável e alimentos; sendo essas as técnicas padrão aceitas pelos órgãos regulamentadores ^{6,7}. Além disto, técnicas de imunoensaios também têm sido utilizadas para quantificar diferentes pesticidas e amostras ambientais e de alimentos⁸.

Em muitos casos, CG tem sido a técnica selecionada para a análise de agrotóxicos em frutas e hortaliças. Entretanto, nos últimos anos pode-se observar uma tendência para o uso de agrotóxicos mais polares, os quais apresentam menor persistência e toxicidade ao meio ambiente, quando comparados aos apolares. Os compostos polares são menos adequados para análise por essa técnica, o que implica no uso de técnicas alternativas.

A CLAE tornou-se a técnica analítica mais utilizada para a detecção da maioria dos inseticidas e seus metabólitos, herbicidas, entre outros. Os pesticidas alvo incluem carbamatos, paraquat e diquat, glifosato. As vantagens da CLAE estão relacionadas com detecção sensível e seletiva para compostos que absorvem radiação ultravioleta (UV) ou que fluorescem⁷. A CLAE acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) é a melhor escolha para compostos polares, que geralmente apresentam

volatilidade baixa ou instabilidade térmica. A cromatografia líquida é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto que a espectrometria de massas em série permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} .

Entretanto, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, devido sua complexidade, exigindo equipamentos sofisticados, laboratórios avançados com equipe muito bem treinada. Os laboratórios precisam possuir um estoque grande de padrões que devem ser checados com frequência para garantir sua qualidade e estabilidade⁹. As maiores limitações desses métodos analíticos são que, além de exigirem muito trabalho e tempo de operação, requerem quantidades excessivas de solventes tóxicos¹⁰. Para um método ser de aplicação viável, é necessário considerar os custos das análises, incluindo reagentes, equipamento, mão de obra e restrições ambientais. Para isto, é necessário o desenvolvimento de métodos eficientes, rápidos e ambientalmente corretos.

As análises de resíduos de agrotóxicos envolvem geralmente duas etapas principais: 1) a extração dos analitos de interesse da matriz, que pode ou não ser acompanhada por uma etapa posterior de purificação para eliminação de interferentes (*clean-up*), dependendo das características da matriz do tipo de extração utilizada e 2) a determinação qualitativa e quantitativa, que frequentemente é realizada empregando técnicas cromatográficas^{11,12}.

A primeira etapa, preparo da amostra, é considerada como sendo um ponto crítico na determinação de resíduos de agrotóxicos. Nesta etapa, tradicionalmente, a extração desses resíduos na análise de vegetais tem sido feita por homogeneização da amostra em um solvente orgânico, geralmente em um agitador. Em geral estes métodos

são trabalhosos e consomem tempo, além de requererem grande volume de solventes. A etapa de *clean-up* é usada para extrair vários componentes com tamanho molecular elevado, como lipídeos, pigmentos e resinas que precisam ser eliminados para identificar melhor resíduos com menores concentrações^{13,14}.

Os métodos multiresíduos, para detecção de um grande número de pesticidas, têm a detecção dificultada devido às diferentes classes e propriedades físico-químicas desses compostos. Muitas vezes tratamentos diferentes para as amostras são necessários, incluindo diferentes técnicas *clean-up*⁹.

As técnicas cromatográficas são, de modo geral, pouco práticas para aplicações “in situ” ou em tempo real. Dentro desta perspectiva, as técnicas eletroquímicas, como os biossensores, têm sido estudadas com sucesso para a determinação quantitativa de pesticidas em diferentes amostras^{15,18}. Estas técnicas são simples, de baixo custo, empregam aparelhos simples com possibilidade de miniaturização, apresentam baixos limites de detecção, não requerem um tratamento prévio extensivo da amostra e requerem do técnico responsável, apenas treinamento básico para sua aplicação¹⁹. Assim, elas têm sido utilizadas para medidas “in situ”^{15,20}.

1.2.2 – Biossensores

Biossensores são definidos como um dispositivo analítico que contém material biológico (enzimas, anticorpos, DNA, hormônios, microorganismos, organelas) ou material biomimético (receptores sintéticos, catalisadores biomiméticos, polímeros) imobilizados, intimamente associados com ou integrados dentro de um transdutor, que

pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico, magnético, entre outros²¹. A Figura 1 esquematiza os componentes de um biossensor, exemplificando os tipos de materiais biológicos e transdutores. O material biológico ou mimético interage especificamente com um analito, e produz sinal químico, físico ou elétrico que pode ser medido, sendo este sinal proporcional à concentração do analito.

Biossensores envolvem, basicamente, análises quantitativas de várias substâncias, convertendo seu mecanismo biológico em sinais mensuráveis. Estes dispositivos possuem sistema de operação simples e fazem uso de instrumentação de baixo custo. A principal vantagem deles consiste em explorar a especificidade biológica, que leva à detecção de concentrações baixas de analito em matrizes complexas.²¹

Figura 1: Esquema dos componentes de um biossensor divididos em tipos de materiais biológicos e de transdutores.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo que confere especificidade biológica e também pelo modo do sinal do transdutor. Duas categorias relacionadas ao componente biológico podem ser distinguidas: biocatalisadores (enzimas, células e organelas), no qual o reconhecimento e a ligação de uma molécula são seguidos por uma mudança química; e reações de afinidade (anticorpos, DNA e receptores de membranas celulares) onde a ligação é essencialmente irreversível e não-catalítica. Vários transdutores físico-químicos têm sido utilizados para monitorar esses eventos de reconhecimento biológico e podem ser classificados em eletroquímicos, ópticos, térmicos e piezoelétricos, como anteriormente mencionado.²¹

Os biossensores eletroquímicos são considerados eletrodos modificados desde que o material condutor seja recoberto por material biológico. Eles podem ainda ser subclassificados em potenciométricos, conductimétricos, amperométricos, entre outros. Os amperométricos vêm sendo um dos mais empregados na detecção de pesticidas. Seu mecanismo de funcionamento é baseado na medida de corrente resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas, mantendo-se constante o potencial do eletrodo de trabalho em relação ao de referência. A corrente resultante é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas.²²

Os biossensores enzimáticos podem fazer uso da atividade enzimática como sendo o sinal analítico a ser monitorado. O monitoramento da concentração de analito pode ser feito pelo mecanismo de inibição enzimática, sendo que a atividade da enzima é medida antes e após a inibição. A enzima é colocada na presença de um inibidor

específico por certo tempo e a porcentagem de inibição sofrida pela enzima está quantitativamente relacionada com a concentração deste agente inibidor ²³. Estes dispositivos podem ser aplicados em diversos setores para realizar o monitoramento ambiental, industrial, de saúde, entre outros.^{24,25} A grande aplicabilidade está relacionada às vantagens desta técnica eletroanalítica, como sensibilidade, baixo custo relativo, respostas rápidas, especificidade, detecção de baixas concentrações de analito, possibilidade de miniaturização e de análises “in situ”.^{23,26}

Várias enzimas vêm sendo empregadas na construção destes sensores, podendo citar colinesterases, ureases e tirosinases; utilizando transdutores eletroquímicos, como os amperométricos, conductimétricos, entre outros. Diversos tipos de analitos inibidores da atividade enzimática têm sido investigados como metais pesados, pesticidas organofosforados e carbamatos, além de sulfitos e peróxidos.

Os biossensores baseados nos mecanismos de inibição da enzima AChE estão entre os biossensores de inibição mais empregados na literatura ²³. São sistemas rápidos, seletivos, sensíveis, de fácil uso, com tempo de resposta bastante curto e necessitando de mínimo tratamento da amostra, além das possibilidades de efetuar análises quantitativas e qualitativas em tempo real ²⁷. A AChE é inibida por pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos, sendo então, muito utilizada em biossensores que se baseiam no mecanismos de inibição enzimática para detectar pesticidas em amostras de alimentos, água, entre outras. Os biossensores baseados em enzimas colinesterases mais estudados são os amperométricos. Como suportes, estes sensores têm utilizado grafite, 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.^{28 - 31}

1.2.2.1 - Acetilcolinesterase

A AChE (EC 3.1.1.7) está presente no cérebro, músculos e eritrócitos tanto de vertebrados, como invertebrados, e atua no sistema nervoso central, controlando impulsos e transmissões dos estímulos nervosos. Os impulsos nervosos caracterizam-se como uma alteração na diferença de potencial elétrico (DDP) através da membrana do neurônio, alteração esta que se propaga ao longo do mesmo. A Figura 2 mostra um esquema referente à transmissão de impulso nervoso.

Em condições de repouso, existe uma diferença de potencial elétrico entre o interior e o exterior do neurônio. Essa diferença decorre de gradientes nas concentrações de íons dentro e fora da célula.

Um estímulo físico ou químico num ponto do neurônio promove uma alteração na configuração espacial de certa proteína presente na membrana do neurônio, a qual está associada ao transporte facilitado de íons Na^+ através da membrana (canais de Na^+).

Os canais de Na^+ se abrem e, como consequência, ocorre um fluxo rápido desses íons para dentro da célula. Essa entrada altera a DDP no ponto de entrada de Na^+ . Parte do Na^+ que entrou difunde-se para o ponto adjacente, alterando menos intensamente a DDP nesse ponto, porém, o suficiente para que os canais de Na^+ se abram automaticamente, já que sua abertura/fechamento depende da DDP através da membrana. Assim, a entrada de íons Na^+ num ponto da membrana provoca uma

entrada sequencial desses íons ao longo da membrana do neurônio. A entrada sequencial de Na^+ é seguida de uma saída sequencial de íons K^+ , outras proteínas presentes na membrana, associadas ao transporte de íons K^+ através da membrana (canais de K^+), mudam sua configuração espacial, facilitando a saída desses íons. A saída de K^+ retorna a DDP para a condição de repouso. Essa alteração no potencial elétrico da membrana, que se propaga ao longo do neurônio/axônio, caracteriza o impulso nervoso. Quando o impulso chega à extremidade do neurônio, ele provoca a liberação (na sinapse, ou seja, na junção ou espaço entre neurônios ou entre um neurônio e um músculo ou glândula) de uma substância química chamada neurotransmissor. Este se liga temporariamente à proteína associada ao canal de Na^+ na membrana da célula adjacente, promovendo a abertura desse canal e, assim, a passagem do impulso nervoso de uma célula à outra. Como exemplo de substâncias neurotransmissoras tem-se a acetilcolina (ACh). No neurônio pré-sináptico ocorre a síntese da acetilcolina a partir da colina e acetil-coenzima A, pela ação da enzima colina acetil-transferase. A ACh é, então, armazenada em vesículas. A diferença de potencial desencadeia a liberação de ACh na fenda sináptica, onde a ACh pode se ligar aos receptores muscarínicos localizados nas membranas pré e pós sinápticas.

Tão logo a acetilcolina cumpre seu papel, ela precisa ser degradada, para que a célula adjacente não fique com os canais de Na^+ constantemente abertos. Para isso, existe na sinapse a enzima acetilcolinesterase, que prontamente degrada a acetilcolina em colina e ácido acético. Estes retornam ao interior do neurônio e são reutilizados na síntese da acetilcolina.³²

Figura 2: Esquema referente à transmissão de um impulso nervoso. ACh designa o neurotransmissor acetilcolina, M1 são os receptores nicotínicos, M2 são os receptores muscarínicos, AChE-S é a acetilcolinesterase e vAChT são as vesículas que transportam acetilcolina.³²

O conhecimento da estrutura tridimensional da AChE é essencial para a compreensão de seu comportamento catalítico. As informações estruturais sobre os sítios de ligação da ACh na enzima fornecem parâmetros para que se possa compreender o reconhecimento que a enzima faz do substrato, sendo úteis para o desenvolvimento de medicamentos, por exemplo³³. Existem várias formas oligoméricas da AChE, como a dimérica extraída da arraia elétrica do Pacífico (*Torpedo californica*) e a tetramérica da enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), Figura 3, entre outras.

Figura 3: A) Representação do dímero da AChE de *Torpedo californica*, com um monômero em verde e o outro em vermelho³³. B) Representação da estrutura tetramérica da AChE de *Electrophorus electricus*.

A característica mais marcante da estrutura da AChE é o sítio ativo profundo e estreito, com cerca de 20Å de profundidade, com alargamento na base; o que permite que o substrato esteja cercado quase que 360° com a proteína, possibilitando várias formas de interação enzima/substrato³⁴. Estudos cinéticos indicaram que o sítio ativo da AChE contém dois subsítios, o esterásico e o aniônico, correspondendo respectivamente, a “maquinaria” catalítica e o local de ligação da colina.

O subsítio esterásico assemelha-se aos subsítios catalíticos de outras serinas hidrolases; no caso da AChE, o subsítio é constituído por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos histidina (His), serina (Ser) e glutamato (Glu), que estão localizados no fundo da cavidade do sítio. A cavidade do sítio ativo está rodeada por até 14 resíduos aromáticos; os anéis que compõe cerca de 70% da superfície do sítio, com resíduos de triptofano e fenilalanina, compõe o subsítio catalítico aniônico que interage com o grupo quaternário positivamente carregado da colina formada a partir da ACh. Além desses dois subsítios, esta enzima apresenta ainda sítios de ligação adicionais para a ACh e outros ligantes quaternários, como o sítio aniônico periférico (PAS) que é diferente daquele onde se liga a colina dentro do

sítio ativo, sendo formado por dois resíduos de tirosina e um de triptofano (Figura 4)

33,34

Rosenberry e colaboradores³⁵ mostraram que a acetilticolina (ACh) se liga ao PAS como um primeiro estágio da catálise; e que tal ligação em concentrações elevadas de substrato (ACh) originou a inibição da AChE. No entanto, em concentrações baixas de substrato, a ligação deste com o PAS acelera a etapa de acilação da catálise enzimática. A quantidade elevada de compostos aromáticos nas paredes e na base da cavidade do sítio ativo explica a variedade de sítios de ligação hidrofóbicos e aniônicos distintos.

Figura 4: A) Esquema da cavidade do sítio ativo da AChE do *Torpedo californica*, mostrando os principais resíduos que compõe o sítio periférico aniônico, o sítio catalítico aniônico e a tríade catalítica³³. B) Modelo da ACh ligada no sítio ativo da AChE do *Torpedo californica*³⁴.

O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por

ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima, sendo que os produtos da catálise consistem em colina e ácido acético (Figura 5).^{36,37}

Figura 5: Mecanismo da hidrólise da acetilcolina.³⁶

Os pesticidas organofosforados e carbamatos são conhecidos como inibidores da enzima AChE, tanto em insetos, quanto em mamíferos. Quando há contaminação com alguma dessas espécies ocorre a inibição da AChE, reduzindo sua atividade para

catalisar a hidrólise da ACh, acumulando este neurotransmissor na fenda sináptica. Este acúmulo leva à estimulação excessiva do sistema nervoso.

Dentro da classe dos OPs existem os inibidores diretos (que possuem =O) e os indiretos (com =S), dependendo se necessitam ou não de ativação metabólica para inibir a AChE. Portanto, as espécies indiretas (contendo =S) devem sofrer bioativação para tornarem-se ativas biologicamente (contendo =O). Os OPs indiretos incluem o parathion, malathion, clorpirifós; que se tornam mais tóxicos do que o original. O processo de dessulfuração oxidativa, ou seja, a troca do enxofre pelo oxigênio resulta na formação dos oxons, por exemplo, o paration transforma-se em paraoxon.³⁸

Os organofosforados, geralmente, inibem a AChE irreversivelmente, já que ocorre uma ligação covalente no sítio ativo da enzima. O resíduo de serina é prontamente fosforilado (Figura 6). Ao contrário da enzima acetilada, a fosforilada reage lentamente com a água, o que permite a desalquilação do substituinte alcóxila ligado ao átomo de P (processo conhecido como “envelhecimento”). Essas espécies inativam a AChE pelo processo de fosforilação em seu sítio ativo. O resultado é o surgimento de uma ligação química forte entre o resíduo da histidina protonada do sítio catalítico e o átomo de oxigênio negativamente carregado do inibidor. A histidina protonada não pode funcionar como um catalisador básico geral para a hidrólise da AChE fosforilada, necessária para a reativação da enzima.^{36,39}

Figura 6: Mecanismo clássico da inibição da AChE por pesticidas organofosforados.³⁶

Os carbamatos não necessitam de bioativação para inibir a AChE e promovem inibição reversível, ao invés de irreversível, e o processo de “envelhecimento” não acontece. A reversão da inibição ocorre em cerca de algumas horas depois da contaminação. O primeiro passo da inibição ocorre envolvendo a formação do complexo enzima-inibidor com subsequente carbamilação da hidroxila da serina, resultando na enzima inibida (Figura 7). Diferentemente da inibição por organofosforados, há uma etapa de regeneração, na qual a enzima carbamilada se regenera espontaneamente sob condições específicas de equilíbrio entre as concentrações da enzima e substrato.⁴⁰

Figura 7: Mecanismo de inibição da AChE por carbamatos.

As colinesterases também hidrolisam ésteres de tiocolina, tais como acetiltiocolina (ATCh), butiriltiocolina, propioniltiocolina, entre outras. Os mecanismos de inibição destas enzimas já se encontram bem difundidos na literatura e têm sido utilizados como ferramentas para a construção de biossensores para monitoramento destes pesticidas. A ATCh é utilizada no processo de detecção de ambas as classes de pesticidas, ao invés da acetilcolina, pois o produto da hidrólise da ACh, a colina (Figura 5), não é eletroquimicamente ativo.^{41,42} Desta forma, não há utilização de ACh em biossensores amperométricos, sendo esta substituída pela ATCh, que possui um átomo de enxofre no lugar do de oxigênio (Figura 8).

Figura 8: Estrutura molecular do cloreto de acetiltiocolina.

1.3 – Cinética Enzimática

Entende-se por cinética enzimática a análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influencia a atividade enzimática avaliada através do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada.

A atividade da enzima, e, portanto a cinética enzimática é determinada pela concentração da enzima, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores, pH, força iônica e temperatura.⁴³

- **Influência da concentração de enzima**

Sob determinadas condições, a velocidade de transferência do substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima. Desvios da linearidade podem ocorrer devido à presença de inibidores na própria solução de enzima, de substâncias tóxicas (como metais pesados), além de limitações do método de análise. Para evitar tais efeitos, recomenda-se o uso tanto de enzimas, como de substratos com alto grau de pureza e métodos confiáveis.

- **Influência do pH**

O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas que contêm muitos grupos ionizáveis, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH.

- **Efeito da temperatura**

A atividade catalítica da enzima é altamente dependente da temperatura. À medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: a) a taxa de reação aumenta e b) a estabilidade da enzima decresce devido à desnaturação. Toda enzima possui uma temperatura ótima para a qual atinge sua atividade máxima.

- **Equação de Michaelis-Menten**

A reação enzimática mais simples consiste de um único substrato (S) se transformando em um único produto (P), envolvendo duas reações elementares, nas quais o substrato forma um complexo com a enzima (E) que, subsequentemente decompõe-se nos produtos e na enzima:

Segundo este modelo, quando a concentração de substrato for alta o suficiente para converter completamente a enzima na forma ES (complexo enzima-substrato), a segunda etapa torna-se a etapa limitante da velocidade e a reação de velocidade total é insensível ao aumento da concentração do substrato.

A expressão geral para a velocidade dessa reação é:

$$V_0 = k_2 [ES] \quad (\text{Equação 2})$$

No entanto, a $[ES]$ não é experimentalmente mensurável. Então o termo $[E_t]$ foi introduzido e designa a concentração de enzima total (a soma da enzima livre com a enzima ligada ao substrato). A enzima livre ou ligada pode ser representada por $[E_t] - [ES]$. Como $[S]$ é muito maior que $[E_t]$, a quantidade de substrato ligado na enzima é desprezada. Com essas condições, os próximos passos conduzem a expressar V_0 em termos mensuráveis:

1. As velocidades de formação e rompimento de ES são determinadas pelas etapas governadas pelas constantes de velocidade k_1 (formação) e $k_{-1} + k_2$ (rompimento), de acordo com as expressões:

$$\text{Velocidade de formação de } ES = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Velocidade de rompimento de } ES = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (\text{Equação 4})$$

2. À exceção do estágio inicial da reação, $[ES]$ permanece aproximadamente constante até que o substrato seja totalmente consumido. Então, durante a maior parte do curso da reação, a velocidade de síntese de ES deve ser igual a velocidade de seu consumo, isto é, $[ES]$ mantém-se em estado estacionário e pode-se supor que $[ES]$ é constante. Combinando-se as Equações 3 e 4, obtém:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (\text{Equação 5})$$

3. Através de vários passos algébricos, a Equação 5 é resolvida:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \quad (\text{Equação 6})$$

O termo $[(k_2 + k_{-1}) / k_1]$ é definido como a constante de Michaelis (K_M).

4. Pode-se expressar V_0 em termos de $[ES]$. Substituindo K_M e V_0 na Equação 6, simplifica-se a expressão para:

$$V_0 = \frac{k_2 [E_t][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 7})$$

Como a velocidade máxima ocorre quando a enzima está saturada ($[ES] = [E_t]$), $V_{\max}$ pode ser definido como $k_2[E_t]$, substituindo na Equação 7:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 8})$$

A Equação 8 é definida como a equação de Michaelis-Menten. A equação de velocidade da reação enzimática que envolve um substrato. Uma importante relação numérica desta equação é quando V_0 é a metade de $V_{\max}$. Verifica-se que nesta condição $K_M = [S]$, quando $V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$.

A equação de Michaelis-Menten descreve o comportamento cinético de várias enzimas que exibem a dependência hiperbólica de V_0 com $[S]$ (Figura 9). A partir desta curva, podem-se obter os parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_M . O K_M varia de enzima para

enzima, e ainda varia de acordo com o tipo de substrato para uma mesma enzima. Esta constante indica a afinidade entre a enzima e o substrato.

Figura 9: Curva de Michaelis-Menten que mostra a dependência da velocidade inicial com a concentração de substrato.

A velocidade máxima da reação, V_{max} , ocorre em altas concentrações de substrato, quando a enzima está saturada, o que corresponde a quando ela estiver inteiramente na forma ES: $V_{\text{max}} = k_2[E_t]$. A magnitude de V_{max} também varia de enzima para enzima.

Os parâmetros cinéticos de uma enzima fornecem uma maneira de quantificar a eficiência catalítica da enzima. Pode-se definir a constante catalítica como:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_t]} \quad (\text{Equação 9})$$

Esta grandeza também é conhecida como número de renovação enzimática (*turnover*), porque indica o número de vezes que cada sítio ativo da enzima catalisa uma reação por unidade de tempo. Para o modelo de Michaelis-Mente, $k_{cat} = k_2$. A relação k_{cat} / K_M é a constante aparente de segunda ordem de velocidade da reação enzimática: o avanço da reação varia segundo a frequência com que a enzima e o substrato encontram-se na solução. Assim, a grandeza k_{cat} / K_M constitui uma medida da eficiência catalítica.

- **Análise dos dados cinéticos**

Há vários métodos para determinar os valores dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten. Quando $[S]$ tem valores muito altos, a velocidade inicial V_0 aproxima-se assintoticamente a V_{max} . Na prática, é muito difícil obter o valor de V_{max} com precisão a partir do gráfico de V_0 *versus* $[S]$ (Figura 12). No entanto, a partir da linearização desta equação constrói-se o gráfico de Lineweaver-Burk ou de duplo-recíproco (Figura 10):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max} + [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Equação 10})$$

O coeficiente angular da reta é K_M / V_{max} e o intercepto $1 / V_{max}$. Este gráfico possui algumas limitações, uma vez que a maioria das medidas experimentais envolve concentrações relativamente altas de substrato, os pontos acumulam-se no lado

esquerdo do gráfico. Assim, para valores pequenos de $[S]$, pequenos erros em V_0 , levam a grandes erros em K_M e V_{max} . Com os computadores, os dados cinéticos são tratados e analisados por meios matemáticos sofisticados, por tratamentos estatísticos.^{43 - 45}

Figura 10: Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco).

- **Inibição Enzimática**

O conceito biológico de inibidor enzimático diz respeito à substância que é capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação. Os processos de inibição enzimática estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica está na formação do complexo enzima-inibidor, que pode ou não ser desfeito por etapas de diluição ou diálise, dependendo do processo²³.

- Inibição Reversível:

Os inibidores reversíveis levam à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações dos reagentes no meio (enzima, inibidor e substrato), permanecendo constante a partir de um tempo determinado. O processo de inibição reversível pode ser dividido em quatro tipos básicos, competitivo, não competitivo, incompetitivo e misto.

1) Competitivo

Um inibidor (I) competitivo compete com o substrato (S) pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor ocupa o sítio ativo, ele impede a ligação do substrato. Muitos inibidores competitivos são compostos que se assemelham ao substrato e se combinam, então, com a enzima para formar o complexo enzima-inibidor (EI), impedindo a enzima de efetuar a catálise.

Como o processo é reversível, a simples adição de uma maior quantidade de substrato pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES), minimizando a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima. Quando [S] é muito superior a [I], a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima é minimizada e a reação exibe o comportamento esperado.

Na equação de Michaelis-Menten, o valor de K_M é alterado por um fator $\alpha = 1 + ([I]/K_i)$. Portanto, o valor de [S] é αK_M , quando $V_0 = V_{\max}/2$. Quanto maior [S], V_0 tende a

$V_{\max}$ para qualquer valor de α . Entretanto, quanto maior for o valor de α , maior deve ser $[S]$ para que se chegue a $V_{\max}$. Portanto, o inibidor não afeta o número de renovação enzimática. Em vez disso, o inibidor tem o efeito de parecer que $[S]$ pareça mais diluído, ou seja, fazendo com que K_M seja maior do que realmente é.

O efeito em K_M aparente combinado com a ausência de efeito em $V_{\max}$ leva a constatação do processo de inibição competitiva. O processo de inibição reversível competitiva é descrito pela reação da Figura 11B:

Figura 11: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor competitivo. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor competitivo.

2) Não-competitivo

Neste processo, o inibidor liga-se a um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, o que indica que a inibição não pode ser revertida pela adição de quantidades de substrato. Ocorre a formação de complexos, tanto entre a enzima e o

inibidor (EI), quanto entre este e o substrato (EIS). Um inibidor não competitivo apresenta um comportamento de remoção da enzima ativa da solução, o que resulta na diminuição da velocidade da reação, devido à quantidade de enzima livre. Neste caso, a $V_{\max}$ é alterada, diminuindo; já K_M não é alterado. O mecanismo da reação é mostrado na Figura 12B:

Figura 12: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor não-competitivo, onde $\alpha = \alpha'$. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor não-competitivo.

3) Incompetitivo

Um inibidor incompetitivo é aquele que se liga somente ao complexo enzima-substrato formado. A ligação entre o inibidor e o complexo é feita em um sítio diferente daquele em que o substrato se encontra ligado à enzima; porém, neste caso, o inibidor se liga apenas ao complexo enzima-substrato e não à enzima livre. Os inibidores incompetitivos têm um efeito inesperado sobre K_M . Como o inibidor se liga ao complexo enzima-substrato, ele reduz efetivamente a concentração desta espécie, formando o complexo ternário EIS. O equilíbrio é então deslocado para direita, aumentando a quantidade de substrato que se liga a enzima. Desta forma, o inibidor aumenta a afinidade enzima-substrato e diminui K_M . Como o inibidor não compete com grandes

quantidades de substrato, muito pelo contrário, pois precisa de substrato para ligar a primeira enzima, ele é, então, eficaz em concentrações elevadas de substrato e, portanto, diminui $V_{\max}$. A Figura 13B mostra o mecanismo de inibição incompetitivo:

Figura 13: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor incompetitivo. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor incompetitivo.

4) Misto

O inibidor misto também se liga a um sítio distinto do sítio ativo do substrato, mas ele se liga tanto à enzima, quanto no complexo ES, assemelhando-se ao processo não-competitivo. A equação de Michaelis-Menten para a inibição mista é mostrada na Figura 14A. O nome inibição mista vem do fato que o denominador tem o fator α multiplicando o K_M , como no caso da inibição competitiva, e o fator α' multiplicando $[S]$, como na inibição incompetitiva. Portanto, os inibidores mistos são efetivos tanto em concentrações elevadas de S, como nas baixas. Nesta situação, tanto $V_{\max}$, como K_M são alterados.

Figura 14: A) Gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima na presença de um inibidor misto. B) Modelo da reação da enzima na presença de um inibidor misto.

Tabela 1 - Efeitos de inibidores sobre os parâmetros da equação de Michaelis-Menten

Tipo de Inibição	V_m^{app}	K_M^{app}
Nenhuma	V_{max}	K_M
Competitiva	V_{max}	αK_M
Não-Competitiva	V_{max} / α'	K_M
Incompetitiva	V_{max} / α'	K_M / α'
Mista	V_{max} / α'	$\alpha K_M / \alpha'$

- *Inibição Irreversível:*

Neste processo, o inibidor liga-se ao sítio ativo da enzima de maneira irreversível, geralmente por formação de ligações covalentes, podendo até promover a destruição de grupos funcionais essenciais para a enzima. A inibição irreversível é progressiva, aumentando com o tempo, até atingir máxima inibição. O inibidor forma um complexo enzima-inibidor.

- **Constante de Inibição**

A afinidade entre a enzima e o inibidor está relacionada com a constante de inibição K_i . Um inibidor com afinidade elevada se liga mais facilmente com a enzima e, conseqüentemente, possui uma capacidade inibitória elevada. O K_i é diretamente comparável à constante de dissociação enzima substrato (K_M). Portanto, um valor alto de K_i indica baixa afinidade, e vice-versa. Para determinar K_i , utilizam-se as seguintes equações: ⁴⁶

$$K'_M = K_M \left(\frac{1+i}{K_i} \right) \quad \text{(Equação 11)}$$

$$V' = \frac{V}{\left(\frac{1+i}{K'_i} \right)} \quad \text{(Equação 12)}$$

As mudanças de K_M estão relacionadas com K_i e as mudanças em $V_{\max}$ estão relacionadas com K'_i . No caso de um inibidor misto, as constantes K_i e K'_i seriam diferentes umas das outras. Com um inibidor competitivo, a Equação 11 deve ser aplicada, pois há alteração apenas em K_M . Já para um inibidor não-competitivo, apenas a Equação 12 seria utilizada, pois $V_{\max}$ é alterado. ⁴⁶

1.4 – Estado da Arte

Como mencionado anteriormente, as enzimas estão envolvidas em métodos analíticos, que as utilizam adotando como recurso sua seletividade ou especificidade. Deste modo, tendo em vista o uso crescente desses biocatalisadores, deve-se alertar os riscos em atribuir essas características para os métodos baseados no uso indireto de enzimas, como aqueles baseados na inibição enzimática, no qual a ação catalítica da enzima é modificada pela presença de uma espécie específica do meio.⁴⁷

No caso dos biossensores que utilizam a AChE, o fenômeno de inibição pode ser causado por diferentes espécies, além dos pesticidas organofosforados e carbamatos, como cátions de metais, outras espécies inorgânicas e compostos orgânicos. Assim, a seletividade é, de certa forma, empobrecida.⁴⁷

Além disto, a inibição da AChE não fornece qualquer informação qualitativa ou quantitativa sobre analitos individuais, isto é, diferentes pesticidas inibidores da AChE não podem ser medidos de maneira seletiva.

Fazendo uma busca na literatura nesta área, os dados encontrados confirmam que os métodos de inibição enzimática, até agora, raramente são aplicados em amostras reais; geralmente as análises são realizadas em água deionizada.⁴⁷ Entretanto, esta falta de aplicações práticas também está relacionada com o caráter irreversível da adsorção de alguns inibidores no sítio ativo da enzima. Este é o comportamento geral dos pesticidas da classe dos organofosforados, que não são liberados espontaneamente do sítio ativo da acetilcolinesterase. Desta forma, um

biossensor construído com estas características deve ser utilizado apenas uma vez e descartado, posteriormente.

A falta de seletividade dos dispositivos que utilizam enzimas levou os pesquisadores a buscarem soluções para esse problema. Uma das maneiras para melhorar a seletividade de enzimas, para aplicação em biossensores, é o uso de várias enzimas co-imobilizadas no eletrodo e ainda utilizar tratamentos quimiométricos dos dados fornecidos por eles. Eletrodos quimicamente modificados também têm sido utilizados com esse objetivo, ou para aumentar a sensibilidade.⁴⁷

Outro fator que inviabiliza a aplicação de enzimas, de certa forma, em biossensores é sua desnaturação em determinadas condições. Fatores como pH, temperatura e força iônica devem ser controlados; implicando na dificuldade de armazenamento dos biodispositivos, por um tempo mais longo. Devido a estas limitações, várias estratégias têm sido propostas no sentido de substituir os materiais biológicos por materiais sintéticos que possuam o mesmo grau de reconhecimento molecular, ou seja, o mesmo grau de seletividade.

Uma alternativa muito interessante ao uso de enzimas está relacionada com a síntese de moléculas que apresentam centros de adsorção e/ou reação, capazes de catalisar a reação com o substrato da enzima, mesmo em velocidades menores que as das respectivas proteínas. Desta maneira, seria possível “imitar” o funcionamento de uma enzima, porém com moléculas muito mais simples e robustas, que sejam resistentes em condições não usuais para enzimas, como a utilização em meio não aquoso, além de faixas amplas de pH e temperatura.

Breslow (1972)⁴⁸ definiu a química biomimética como o ramo da química orgânica que tem como objetivo imitar as reações naturais e processos enzimáticos. Na tentativa de imitar alguns dos fatores envolvidos na catálise enzimática, ou seja, a formação de um complexo enzima-substrato que catalisa grupos polifuncionais por meio de grupos catalíticos estrategicamente posicionados; enfatizava-se o alcance da velocidade dos processos catalisados por enzimas. No entanto, este é apenas um dos aspectos em que reações enzimáticas naturais têm em vantagem sobre reações sintéticas em laboratório; e em alguns aspectos, é o fator menos interessante da química das enzimas. Em determinadas situações, a velocidade elevada não é tão importante, quanto à seletividade das enzimas.

Um tipo de reação que a natureza executa e impressiona os químicos orgânicos sintéticos é a transformação de um ácido esterásico (ácido graxo) em um ácido oléico, introduzindo uma ligação dupla no meio de uma cadeia de átomos de carbono homogênea em uma posição específica, sem a necessidade de ativação desses carbonos por um grupo específico. A Figura 15 mostra hidrogênios específicos envolvidos na conversão do ácido esterásico em ácido oléico pela ação de uma enzima apropriada, representada pelo “monstro”. Os fatores envolvidos nesse processo são vários. O primeiro é o sítio de ligação que é reconhecido e a enzima se liga no fim da cadeia. O segundo é a existência de um grupo altamente reativo que pode remover os hidrogênios inativados e que está localizado a uma distância bem definida do sítio de ligação. É fundamental que este grupo reativo seja incapaz de atacar outros hidrogênios. A figura mostra que o monstro não deve morder qualquer parte da molécula, mas sim os hidrogênios específicos. Além disso, uma enzima, que vai

funcionalizar certo substrato, deve ter sítios de ligação auxiliares para imobilizar a cadeia, que são representados pelos pés na Figura 18.

Figura 15: Representação excêntrica dos fatores envolvidos na oxidação enzimática seletiva.⁴⁸

Então, Breslow (1980)⁴⁹ baseou-se na geometria do complexo enzima-substrato, no qual um substrato específico “encaixa-se” na enzima e é atacado em posições específicas, para imitar tal geometria. Utilizando então, um complexo molécula mimética-substrato, no qual a molécula mimética realizaria um ataque em uma região específica do substrato.

As enzimas atraem seu substrato, imobilizando-o pela ação de dois ou mais grupos funcionais estrategicamente localizados que promovem a catálise, sendo este o mecanismo que resulta na seletividade frente ao substrato. A ligação com seu respectivo substrato pode acontecer por coordenação metálica, coordenação de ácido-

base de Lewis ou ligações de hidrogênio em solventes não-aquosos; ou ainda por coordenação metálica ou ácido-base de Lewis e interações hidrofóbicas em solventes aquosos.⁵⁰ Uma molécula mimética deve proporcionar um tipo de interação equivalente, para a imobilização do mesmo substrato.

Diversas moléculas miméticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de biossensores⁵¹⁻⁵⁸. Aplicando-as nestes dispositivos, é possível imobilizar uma quantidade consideravelmente maior de “sítios ativos” na mesma superfície eletródica, aumentando o número de moléculas de substrato que serão transformadas em produtos.

Santos *et al.* (2009) propuseram um sensor biomimético amperométrico para a detecção de compostos fenólicos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de manganês e histidina, para imitar as enzimas peroxidases. As metaloftalocianinas são estruturalmente simples, são comercialmente disponíveis e possuem processo de síntese simples, quando comparadas às enzimas. Essas moléculas possuem estabilidade térmica elevada e baixa solubilidade. Além disso, o centro metálico pode se coordenar com espécies nas posições axiais, permitindo melhorar ou iniciar reações biológicas importantes, devido à química redox envolvida. Essas vantagens fazem desses compostos promissores para o desenvolvimento de sensores biomiméticos eletroquímicos.⁵⁹

Sotomayor *et al.* (2008) desenvolveram um sensor biomimético para detectar paracetamol em diversas amostras. Utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com membrana de Nafion[®] dopado com o tetrapiridinoporfirazina de ferro (FeTPyPz) como um biomimético para a enzima P450. Esta enzima catalisa uma ampla

variedade de reações biológicas, incluindo hidroxilação de alcenos e produtos farmacêuticos. Estudos eletroquímicos e de seletividade demonstraram a capacidade da propriedade catalítica dessa molécula, como sendo similares as da enzima P450, na oxidação do paracetamol.⁶⁰

1.4.1 – Moléculas miméticas para acetilcolinesterase

Os trabalhos mais comuns encontrados na literatura, nos quais moléculas miméticas têm sido propostas para substituir a enzima acetilcolinesterase, estão relacionados com a aplicação na indústria farmacêutica. Esses trabalhos têm como objetivo substituir a AChE no organismo e transportar seu substrato (acetilcolina), entre outras moléculas de interesse para o tratamento de determinadas doenças, por exemplo.

Essas moléculas são sintetizadas com base nas interações denominadas *host-guest* (“*hóspede-hospedeiro*”) formando um complexo, que deve atender aos requisitos de carga, tamanho e forma compatíveis para que haja afinidade entre a molécula sintética e a molécula alvo, e seletividade.⁶¹ Os receptores sintéticos (miméticos) fornecem informações fundamentais para a compreensão do mecanismo de reconhecimento molecular. O reconhecimento em água envolve forças não-covalentes, como interações eletrostáticas e de van der Waals, além de efeitos hidrofóbicos.⁶²

Considerando como molécula alvo a acetilcolina, uma vez que ela entra na cavidade da enzima, ela é guiada até o sítio ativo. A amônia quaternária da acetilcolina não permite utilizar ligações convencionais de hidrogênio ou pontes salinas, já que este

íon apresenta carga positiva. As características desse substrato têm inspirado a síntese de receptores sintéticos (miméticos para a AChE) com carga negativa nas superfícies aromáticas da cavidade.⁶³

Os primeiros exemplos desses receptores sintéticos foram os ciclofanos com grupos polares, clusters metal-ligante, porfirinas, calixarenos, entre outros. Exemplos de moléculas miméticas baseadas nesse modelo de *host-guest* com seletividade de ligação e estabilidade cinética na água ainda são escassas e de síntese de difícil execução, mas algum sucesso tem sido alcançado em meio orgânico. Em geral, a profundidade destes receptores é pequena, eles cercam apenas uma pequena fração das moléculas-alvo.⁶³

Em geral, a profundidade destes receptores é pequena, eles cercam apenas uma pequena fração das moléculas-alvo.⁶³

Hof *et al.* (2003) também propuseram uma molécula mimética para a AChE, mas que não apresentou atividade catalítica, mas apenas estabilidade e afinidade do substrato em água (Figura 16A).⁶³

Biros *et al.* (2003) sintetizaram uma molécula mimética para a AChE, que forma complexos *host-guest* termodinamicamente e cineticamente estáveis em água; no qual propuseram uma espécie de “bolsão” para se assemelhar a cavidade do sítio ativo da enzima, com grupos negativos na superfície (Figura 16B). O receptor sintético é capaz de se ligar a importantes alvos biológicos, tais como a colina, entre outros. E pode funcionar em condições fisiológicas para aplicação farmacológica.⁶²

Figura 16: A) Molécula mimética da AChE proposta por *Hof et al.* (2003) que não apresenta atividade catalítica.⁶³ B) Molécula mimética proposta por *Biros et al.* (2003) para AChE que apresenta estabilidade em água.⁶²

No entanto, outro inconveniente é que mesmo quando forma, carga e tamanho são complementares, um substrato (hóspede) que interage fortemente com água ou tampão não abandonará sua solvatação para interagir com uma cavidade hidrofóbica da molécula mimética. Além disso, como já mencionado, outros receptores de acetilcolina em meio aquoso, apesar da elevada estabilidade cinética e termodinâmica não apresentam atividade catalítica para hidrólise deste substrato. No entanto, alterações na funcionalização da cavidade da espécie poderiam levar a um desempenho catalítico. Esses tipos de moléculas miméticas baseados na interação *host-guest* são caracterizados pela presença de cavidades, denominadas também como bolsos, tais espécies são de grande complexidade, o que não seria viável para a construção de biossensores que utilizam a AChE.

Mascini et al. (2008) selecionaram três diferentes oligopeptídeos (His-Glu-Pro-Ser, His-Gly-Ser-Ala, Glu-Pro-Ser-Ala) e testaram a afinidade deles para se ligar com pesticidas organofosforados e carbamatos. A escolha desses peptídeos foi baseada na configuração do sítio ativo da AChE e análises computacionais. Devido à afinidade entre os peptídeos e os pesticidas, eles foram aplicados em cartuchos para extração

em fase sólida, utilizados como ferramenta pré-analítica para isolar ou pré-concentrar esses analitos. Apenas um dos peptídeos biomiméticos apresentou comportamento adequado para ser utilizado como um sorbente para extração em fase sólida.⁶⁴

Recentemente, Bhattachayay *et al.* (2008) propuseram e sintetizaram uma molécula orgânica simples e pequena, o ácido 4-[(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico, que se comporta como um mimético para a AChE, por meio de várias etapas de reação.⁶⁵

Segundo estes autores, esta molécula mimética (Figura 17) foi capaz de se ligar com acetilcolina, através de interações de ligações de hidrogênio e interações cátion – π . Após a imobilização da enzima artificial na superfície do eletrodo, o biossensor para acetilcolina forneceu uma resposta potenciométrica, na qual variações da ordem de miliVolts de potencial foram o sinal analisado, o que não pode confirmar a eficiência da molécula mimética proposta para catalisar a hidrólise da ACh. Além disso, o uso do substrato ACh em biossensores amperométricos causa uma certa intriga, já que diversos artigos (como anteriormente mencionado) dizem que o produto de sua hidrólise, a colina, não é eletroativo, utilizando-se, geralmente, em seu lugar a ATCh, que tem como produto a tiocolina.⁶⁵

Figura 17: Comparação da estrutura da molécula mimética com o substrato acetilcolina.⁶⁵

Diante das dificuldades encontradas em desenvolver uma enzima artificial adequada para aplicação em biossensores para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos e das falhas da metodologia empregada por Bhattachayay *et al.*, é de grande interesse estudar o comportamento cinético da molécula mimética proposta por eles para avaliar seu desempenho catalítico na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh) visando a futura aplicação em biossensores para detecção de pesticidas. Mudanças na funcionalização da molécula poderiam levar à um aumento de seletividade entre as classes de pesticidas.

2 - OBJETIVOS

Estabelecer a potencialidade da molécula do *ácido 4-[(1E)etanohidrazonoil]benzóico* como um biomimético eficaz para a enzima acetilcolinesterase na hidrólise do cloreto de acetiltiocolina em eletrólitos tamponados em pH 7, identificando os produtos de reação, tiocolina e acetato. Comparar o comportamento cinético da molécula mimética com o da enzima acetilcolinesterase na catálise da hidrólise da acetiltiocolina.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Reagentes e Soluções

Para a preparação do tampão Britton-Robinson (BR) pH 7,0 com concentração $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, foram utilizados H_3CCOOH (Vetec), H_3PO_4 85% (Merck) e H_3BO_3 (Synth). Acetilcolinesterase tipo VI-S extraída de *Electrophorus electricus* com 2000U foi obtida da Sigma-Aldrich. Foram adicionados 5 mL de tampão BR pH 7,0 no frasco contendo 8,47 mg de sólido de enzima, obtendo-se uma solução estoque de 1,69 mg/mL. No entanto, alíquotas de 200 μL foram diluídas em 25 frascos para se obter soluções de 1 mL de AChE, com concentração de 0,34 mg/mL e 80U.

O ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e o cloreto de acetiltiocolina foram obtidos da Sigma-Aldrich. Foram preparadas soluções de $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DTNB e $15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de acetiltiocolina, em tampão BR pH 7,0.

O carbaril e o parathion foram obtidos da Fluka analytical. A solução estoque de carbaril de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 5 mg em 2mL de etanol e completando os 25 mL restantes com tampão BR. A solução de parathion foi preparada dissolvendo-o em etanol.

Os reagentes utilizados na síntese da molécula mimética foram o ácido 4-acetilbenzóico obtido da Sigma-Aldrich e solução de hidrazina 64-65%.

3.2 – Instrumentação

3.2.1 – Medidas espectrofotométricas

Todas as medidas espectrofotométricas no UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro JASCO, modelo V-630. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

3.2.2 – Instrumentação geral

Foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204 para pesagens.

Para ajustes e medidas de pH utilizou-se um pH-metro Qualxtron modelo 8010.

Os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos utilizando-se pastilhas de 1 mg de analito para cada 100 mg de KBr. Foram efetuadas para cada análise 16 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} ; com espectrofotômetro da marca Bomem, modelo MB-102.

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker/AC-200 para amostras (cerca de 15 mg) dissolvidas em solventes deuterados, em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. Água e metanol deuterados foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados como solventes para as análises de ressonância magnética nuclear (RMN). Os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) e as

constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades apresentadas como: s (singleto) e d (dublete). Os espectros foram tratados com o programa *ACD/NMR Processor Academic Edition 12.0*.

3.3 - Síntese da molécula biomimética (ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico)

A molécula mimética, ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico, foi sintetizada baseada na metodologia de Nenajdenko *et al.* (2004).⁶⁶ Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 200 mg (1,75 mmol) do ácido 4-acetilbenzóico e 0.4 mL de hidrazina 64-65% (5,25 mmol). Em seguida, foi adicionado 2 mL de etanol, quantidade mínima, até à homogeneização. O sistema ficou em refluxo por cerca de 3 horas.

Posteriormente, o etanol e a hidrazina que restaram foram evaporados até a obtenção de um “óleo” amarelado. Foi adicionado mais um pouco de etanol e a mistura foi levada ao congelador para que houvesse cristalização em aproximadamente 12 horas. O precipitado foi filtrado, lavado com hexano e seco em alto-vácuo. O rendimento da reação foi de cerca de 40%.

A molécula mimética foi caracterizada por RMN¹H em metanol e água deuterados. O espectro de RMN foi comparado com o do precursor (ácido 4-acetilbenzóico) em metanol deuterado. O ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico também foi caracterizado por espectro de FTIR e também comparado com o reagente precursor.

Figura 18: Esquema da síntese da molécula biomimética.

3.4 - Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase em solução

Para verificar o desempenho da molécula mimética na catálise da acetiltiocolina, avaliou-se a atividade da enzima em solução. A cinética de Michaelis-Menten foi determinada com a AChE em tampão BR pH 7,0. Esse estudo foi realizado pela técnica de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis), baseando-se no método proposto por Ellman *et al.* (1961)⁶⁷.

O acréscimo da AChE a uma solução de tampão contendo o substrato (cloreto de acetiltiocolina) e o agente complexante, o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico), (DTNB), foi realizado em cubeta de quartzo fixando-se o comprimento de onda em 412 nm.

Com a formação da tiocolina, pela ação enzimática, esta se complexou com o DTNB, formando um complexo de coloração amarela. A velocidade de formação do complexo depende da atividade da enzima e foi acompanhada pelo aumento na

intensidade de absorção de luz em 412 nm. A reação monitorada espectrofotometricamente é mostrada na Figura 19.

Figura 19: A) Reação de hidrólise da acetiltiocolina catalisada pela AChE. B) Reação entre o produto da catálise enzimática e o reagente de Ellman (DTNB), cuja formação do TNB^{2-} é monitorada espectrofotometricamente em 412 nm.

A tangente da curva de absorbância *versus* tempo fornece a velocidade da reação enzimática em s^{-1} , dividindo-se este valor pelo coeficiente de extinção molar do ânion TNB^{2-} ($14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a velocidade da reação é transformada em $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁶⁸ A curva de Michaelis-Menten foi graficada como velocidade *versus* a concentração do substrato (ATCh). Desta curva foi possível obter a constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima da reação (V_{max}). O cálculo do número de renovação (k_{cat}) da enzima também foi obtido a partir destes parâmetros cinéticos, pela Equação 9.

Foi avaliada a ação de inibidores, pesticidas organofosforados e carbamatos, na atividade da AChE. O método de Ellman também foi utilizado. Primeiramente, colocou-se na cubeta a enzima e uma concentração fixa de pesticida. O tempo de incubação foi

de 15 min para cada inibidor. Após a incubação, o DTNB foi adicionado e fez-se o branco. Adicionou-se então a ATCh e acompanhou-se a cinética de reação.

Um dos inibidores utilizados foi o carbaril e três curvas de Michaelis-Menten foram obtidas com concentrações de 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e 1×10^{-6} mol L⁻¹ desse pesticida. O parathion também foi utilizado nas concentrações de 1×10^{-6} , 5×10^{-4} e 1×10^{-3} mol L⁻¹.

A inibição da atividade da AChE pelas moléculas de pesticida foi avaliada pela comparação dos parâmetros cinéticos da enzima na ausência e presença dessas espécies. O processo de inibição enzimática foi determinado pela determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_M) na presença de inibidores.

3.5 - Avaliação da atividade da molécula mimética na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh)

3.5.1 – Método espectrofotométrico de Ellman

A avaliação da atividade da molécula biomimética [ácido (4-[1*E*]-etanohidrazonoil) benzóico] na catálise da hidrólise da acetiltiocolina foi feita de maneira análoga àquela descrita no item (3.4) para a enzima acetilcolinesterase, baseando-se no método de Ellman.

A adição da molécula a uma solução contendo a acetiltiocolina e o DTNB promoveu a hidrólise do substrato e a formação do complexo amarelo (TNB²⁻), que foi detectado em 412 nm por espectroscopia de absorção no UV-vis. O efeito cinético da concentração de molécula mimética também foi avaliado.

Além disso, verificou-se o efeito do catalisador na hidrólise da ATCh na ausência dessa espécie, para confirmar que não ocorria hidrólise espontânea do ATCh.

3.6 – Identificação dos produtos de reação da hidrólise da acetiltiocolina (ATCh) catalisada pela molécula mimética

Como pode ser observado no esquema da reação mostrado na Figura 19, a catálise enzimática da hidrólise da ATCh leva à formação de tiocolina e acetato em solução. Para afirmar que a molécula mimética executou este processo de forma similar, foi necessário identificar os produtos formados na reação promovida por esta espécie.

3.6.1 – Espectroscopia no Infravermelho

Foram obtidos os espectros no infravermelho do cloreto de acetiltiocolina, da mistura reacional e do acetato de sódio. Para fazer a pastilha de KBr com a mistura reacional, esta foi evaporada até se obter um sólido amarelo. O objetivo foi identificar as bandas características da tiocolina e do acetato.

3.7 – Análise dos resultados da cinética de reação

Um problema importante em cinética química é determinar como as velocidades dependem da concentração dos reagentes. É importante também conhecer como a

velocidade é afetada pelos produtos da reação ou por substâncias adicionadas ao sistema, como catalisadores e inibidores.

O método diferencial é um procedimento para determinar as velocidades de reação pela medida das tangentes das curvas de concentração pelo tempo. O procedimento é feito a partir de várias curvas com diferentes concentrações C de reagente, e se a reação tem ordem n em relação a um reagente específico, então:

$$v = - \frac{dc}{dt} = kc^n \quad (\text{Equação 13})$$

O processo de catálise homogênea da hidrólise da acetiltiocolina, pelo ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico foi investigado e o método diferencial foi aplicado a diferentes curvas de absorbância *versus* tempo, para diferentes concentrações de ATCh. As tangentes foram calculadas, fornecendo as respectivas velocidades. Desta forma, determinou-se a ordem de reação e a constante de velocidade (k) pelo gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln [ATCh]$.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização da molécula mimética (ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico)

O ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico) foi caracterizado por espectroscopia no Infravermelho e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons.

4.1.1 – Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

A molécula mimética foi obtida por meio de uma rota sintética que utilizou o ácido 4-acetilbenzóico como seu precursor. Para caracterizar a molécula sintetizada, espectros de RMN¹H em CD₃OD de ambas as espécies foram obtidos e comparados para verificar a pureza do produto. A Figura 20 se refere ao espectro do ácido 4-acetilbenzóico:

RMN¹H (200 MHz, CD₃OD): δ 6.60 (d, J = 8.6, 2H), 6.52 (d, J = 8.6, 2H), 1.11 (s, 3H, CH₃).

Figura 20: Espectro de RMN^1H do ácido 4-acetilbenzóico em CD_3OD .

Já a Figura 21 mostra o espectro do ácido (4-(1 *E*)-etanohidrazonoil) benzóico:

RMN^1H (200 MHz, CD_3OD): δ 6.33 (d, $J = 8.9$, 2H), δ 6.02 (d, $J = 8.6$, 2H), 0.58 (s, 3H, CH_3).

Figura 21: Espectro de RMN^1H do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) em CD_3OD .

Comparando-se os dois espectros foi possível verificar que a molécula foi sintetizada com êxito, já que foram observadas diferenças nos deslocamentos químicos característicos dos hidrogênios tanto do ácido 4-acetilbenzóico, como do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico. Como o precursor da molécula mimética possui um grupo mais eletronegativo próximo aos hidrogênios da metila (o oxigênio da carbonila da cetona), esses se encontram mais desblindados que os hidrogênios da metila da hidrazona. O mesmo efeito foi observado nos hidrogênios do anel aromático que são mais desblindados no espectro do ácido 4-acetilbenzóico.

4.1.2 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar a formação do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico, a partir do precursor ácido 4-acetilbenzóico foram obtidos os espectros no infravermelho de ambas as espécies. As bandas que as caracterizam encontram-se na Tabela 2.

Ao comparar os espectros no infravermelho (Figura 22), observou-se que o grupo característico do precursor é a carbonila de aril cetonas, que absorve fortemente entre 1700-1680 cm^{-1} . Esta banda não foi observada no espectro da molécula mimética.

A vibração de deformação axial da ligação N – H ocorre na região de 3550-3330 cm^{-1} . Foi observado no espectro do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico, uma banda em 3303 cm^{-1} referente a esta ligação, no entanto, há uma banda muito larga de 3400-2900 cm^{-1} que está relacionada tanto com a ligação N – H, como com a ligação O – H do grupo ácido carboxílico presente na molécula, além da ligação C – H do anel benzênico.

Além disso, há uma banda característica do grupo hidrazona (1645-1610 cm^{-1}) em 1628 cm^{-1} , essa banda tem intensidade de média a fraca e está presente na Figura 23, como uma ampliação do espectro original da molécula mimética.

Tabela 2 - Grupos característicos do precursor ácido 4-acetilbenzóico e do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico

Composto	Ligação	Absorção (cm ⁻¹)
Ácido 4-acetilbenzóico	C = O	1695
Molécula Mimética	N – H	3302
Molécula Mimética	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} = \text{N} - \text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	1628

Figura 22: Espectros no infravermelho do (•) ácido 4-acetilbenzóico e do (•) ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico; mostrando as bandas dos grupos característicos de cada molécula como mostrado na Tabela 2.

Figura 23: Ampliação da região do espectro no infravermelho da (•) molécula mimética para verificar a banda do grupo hidrazona em 1628 cm⁻¹.

4.1.3 – Estabilidade do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico

Foi avaliada a estabilidade da molécula mimética em solução, dissolvendo-se cerca de 10 mg do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico em aproximadamente 0,7 mL de água deuterada e deixando-se esta solução por uma semana armazenada na geladeira. Foi comparado o espectro da molécula mimética feito no mesmo dia com o da molécula mimética após uma semana estocada na geladeira. Os espectros de RMN¹H de ambas as condições são mostrado nas Figuras 24 e 25.

Ao analisar os espectros verificou-se que não houve qualquer alteração nos picos característicos da molécula mimética, de modo que no período considerado, o ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico permaneceu estável em solução.

RMN¹H (200 MHz, D₂O): δ 7,83 (d, J = 8.5, 2H), 7.57 (d, J = 8.5, 2H), 2.14 (s, 3H, CH₃).

Figura 24: Espectro de RMN¹H do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) em solução de D₂O.

RMN¹H (200 MHz, D₂O): δ 7.83 (d, J = 8.5, 2H), 7.57 (d, J = 8.5, 2H), 2.14 (s, 3H, CH₃).

Figura 25: Espectro de RMN¹H do ácido (4-(1E)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) após 1 semana em solução de D₂O armazenada na geladeira.

A estabilidade da molécula mimética também foi avaliada após três meses. Uma solução foi, então, preparada em tampão BR pH 7 e foi posteriormente, armazenada na geladeira. Notou-se que a solução que inicialmente era incolor, tornou-se amarelada. A solução foi liofilizada e obteve-se o espectro de RMN¹H em água deuterada mostrado na Figura 26. A partir da interpretação do espectro pôde-se verificar que houve degradação do ácido (4-(1E)-etanohidrazonoil) benzóico, que foi parcialmente transformado em seu precursor, o ácido 4-acetilbenzóico, já que foram observados dois picos referentes aos hidrogênios das metilas de ambas as espécies na região de 2,0-

2,5 ppm, além do multipeto entre 7,0-8,0 ppm. Os picos observados possuem baixa intensidade, pois o espectro foi obtido em água deuterada, e o ácido 4-acetilbenzóico não é completamente solúvel em água, a escala foi ampliada para melhor visualização dos picos.

Figura 26: Espectro de RMN^1H do ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico (molécula mimética) após 3 meses em solução de tampão BR pH 7 armazenada na geladeira.

4.2 – Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase em solução

4.2.1 – Otimização da concentração de acetilcolinesterase

A primeira etapa do estudo da atividade da AChE em solução consistiu em avaliar o comportamento desta enzima, variando-se sua concentração, para posteriormente adotar uma concentração para os demais estudos. Foram comparadas três concentrações de AChE, sendo elas 0,15, 0,3 e 1,5 U. A concentração inicial de substrato (ATCh) foi 5×10^{-6} mol L⁻¹ e o valor final foi diferente para cada concentração de enzima, pois quanto maior a concentração desta, maior a concentração de substrato necessária para alcançar a velocidade máxima.

As curvas de Michaelis-Menten para cada concentração de AChE estão representadas na Figura 27. Os parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_M foram determinados pelo ajuste não-linear da equação de Michaelis-Menten, pelo software Origin® 8.0 e encontram-se na Tabela 3.

Figura 27: Curvas de Michaelis-Menten para diferentes concentrações de enzima: (•) 0,15 U; (•) 0,3 U e (•) 1,5 U.

Ao variar a concentração de enzima deve-se notar que V_{max} deve ser proporcional ao aumento da concentração e K_M deve permanecer constante, uma vez que essa constante é característica para cada enzima. Desse modo, quando a concentração de AChE foi dobrada de 0,15 U para 0,3 U mol L⁻¹, V_{max} aumentou 2,4 vezes e K_M permaneceu inalterado, considerando os erros experimentais inerentes.

Entretanto, quando a concentração de AChE foi aumentada em dez vezes, de 0,15 U para 1,5 U, V_{max} aumentou cerca de 7 vezes e K_M praticamente dobrou de valor. Esse comportamento pode estar relacionado com o fato de que a concentração de

enzima está tão elevada que o processo catalítico não se comporta mais como o modelo de Michaelis-Menten.

A constante catalítica (k_{cat}) encontrada na literatura é 14000 s^{-1} ⁴³. As constantes calculadas são inferiores a esse valor, o que pode ser explicado da seguinte forma: para calcular k_{cat} é necessário ter os valores de V_{max} e da concentração da enzima em mol L^{-1} , o valor de concentração de enzima ativa é difícil de ser obtido, sendo assim o valor utilizado é aproximado. Além disso, a massa molar da enzima é, também, um valor aproximado (230-260 kDa) ⁶⁹; o que provavelmente afeta o valor de k_{cat} calculado. Além disso, a enzima pode ter perdido parte de sua atividade quando no processo de transporte até o laboratório quando foi comprada, já que a temperatura requerida para armazenagem desta enzima é de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos para concentrações diferentes de AChE obtidos a partir das curvas de Michaelis-Menten da Figura 27

[AChE] (mol L⁻¹)	V_{max} (mol L⁻¹ s⁻¹)	K_M (mol L⁻¹)	k_{cat} (s⁻¹)
5×10^{-9}	$2,99 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-4}$	598
1×10^{-8}	$7,21 \times 10^{-6}$	$1,47 \times 10^{-4}$	721
5×10^{-8}	$2,06 \times 10^{-5}$	$2,54 \times 10^{-4}$	410

4.2.2 – Efeito da concentração do DTNB

A influência da concentração de DTNB, no método de Ellman, para determinar a atividade da AChE foi avaliada. As proporções entre as concentrações de DTNB e ATCh ($[DTNB] / [ATCh]$) utilizadas foram 0,66 e 6,6. O intervalo de concentração de ATCh foi de 5×10^{-6} a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 28 refere-se aos experimentos cinéticos que mostram a influência da concentração de DTNB no curso da reação de hidrólise da ATCh. O gráfico de absorbância *versus* tempo permite afirmar que a velocidade de hidrólise é apenas levemente afetada pela concentração de DTNB, de modo que este efeito pode ser desprezado. Qualquer valor de concentração de DTNB, que esteja nesse intervalo, pode ser usado para determinações da atividade enzimática.

Segundo Komersová *et al.* (2007), concentrações de DTNB que fazem com que a proporção $[DTNB] / [ATCh]$ seja maior que dez, levam à diminuição da velocidade da reação de hidrólise, a uma menor produção de tiocolina e, conseqüentemente, diminuem a medida de atividade enzimática. A hidrólise da acetiltiocolina não segue a equação de Michaelis-Menten nestas condições, pois em proporções elevadas, o DTNB pode causar a inibição da enzima.⁷⁰

Figura 28: Efeito da concentração de DTNB na hidrólise da ATCh. (●) 5×10^{-6} mol L⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (●) 5×10^{-6} mol L⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (●) $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (●) $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (●) 5×10^{-5} mol L⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (●) 5×10^{-5} mol L⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (●) 1×10^{-4} mol L⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (●) 1×10^{-4} mol L⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB; (●) $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ATCh e 0,66 vezes de DTNB; (●) $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ATCh e 6,6 vezes de DTNB.

4.2.3 – Efeito do pH na hidrólise da acetiltiocolina

Para averiguar se a ATCh sofria hidrólise espontaneamente foram feitos dois estudos espectrofotométricos, um em pH 7 e outro em 8. O primeiro sistema consistiu em adicionar nas cubetas 1,2 mL de tampão BR pH 7,0 e 0,6 mL de DTNB de um estoque de 0,01 mol L⁻¹ para que fosse feito o branco. Posteriormente, 0,6 mL de ATCh

de um estoque de $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado como sendo o analito. Para então verificar a ocorrência de hidrólise espontânea dessa espécie foi medida a absorbância por quatro horas, fixando-se o comprimento de onda em 412 nm. Se houvesse reação, haveria formação de tiocolina que reagiria com o DTNB formando o composto que absorve em 412 nm que seria, portanto monitorado.

Como pode ser observado na Figura 29, houve aumento de absorbância até um valor de 0,20; o que leva a conclusão de que houve hidrólise espontânea em pH 7, mas em uma magnitude negligenciável no tempo analisado.

Figura 29: Espectro de UV-Vis acetiltiocolina em tampão BR (•) pH 7,0 e (•) pH 8,0; na presença de DTNB.

O segundo experimento consistiu em repetir as condições anteriores, porém utilizando tampão BR pH 8,0 e três horas de monitoramento. A partir do gráfico da Figura 29, observa-se que houve também hidrólise espontânea, mas em maior proporção que em pH 7, já que o valor de absorbância foi praticamente o dobro daquele obtido naquela condição, ou seja, cerca de 0,4. Assim, o meio básico facilitou a reação de hidrólise.

A partir desses resultados decidiu-se utilizar tampão BR pH 7,0 para realizar os demais experimentos para minimizar o efeito de hidrólise espontânea e preparar a solução de ATCh no momento em que fosse ser utilizada.

As fotos da Figura 30 ilustram o seguinte experimento: em cada cubeta foram adicionados 0,6 mL de tampão BR (pH 7 e 8); 0,6 mL de ATCh e 0,6 mL de DTNB. A Figura 30A mostra o experimento no início, no tempo zero. À primeira vista, a solução em pH 8 parece levemente mais amarelada que a em pH 7. A foto B foi tirada após três dias, pode-se perceber que a solução em pH 8 está muito mais amarela que a em pH 7, o que evidencia o processo de hidrólise espontânea em meio básico, não sendo indicado armazenar a solução de ATCh.

Figura 30: A) Fotos do experimento de hidrólise espontânea da ATCh na presença de DTNB em pHs 7 e 8, no tempo zero. B) Fotos do mesmo experimento após três dias. Todos feitos em tampão BR.

4.2.4 – Efeito do tempo de estocagem da AChE

A enzima AChE exige condições adequadas de estocagem e manipulação para que sua atividade seja mantida. A atividade da enzima AChE foi analisada no mês em que chegou ao laboratório e após quatro meses, estocada no freezer. As curvas de Michaelis-Menten são mostradas na Figura 31. Foram utilizadas as mesmas concentrações de enzima e o mesmo intervalo de concentração de substrato (ATCh). A velocidade máxima obtida para a enzima feita no início foi $7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e para a enzima estocada por quatro meses foi $5,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, houve uma diminuição de 18%.

Figura 31: Curvas de Michaelis-Menten feitas com 0,3 U de AChE, com concentração de ATCh de 5×10^{-6} a 1×10^{-3} mol L⁻¹ (•) feita no mesmo mês e (◼) feita após quatro meses.

4.3 – Efeito inibidor de pesticidas da classe dos carbamatos e organofosforados na atividade da AChE

Os pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase. Assim, o efeito inibidor de um representante de cada uma dessas classes foi analisado através da determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_M obtidos da curva de Michaelis-Menten.

A Figura 32 mostra o efeito do carbaril na atividade da AChE. Analisando-se a curva de Michaelis-Menten, pôde-se observar que a velocidade máxima diminuiu com o aumento da concentração deste carbamato. Os valores de $V_{\max}$ e K_M foram obtidos pelo ajuste não-linear dos dados experimentais, utilizando-se o software Origin[®] versão 8.0. Os valores destas constantes encontram-se na Tabela 4. Não foi utilizado nenhum método de linearização da curva de Michaelis-Menten, como o de Lineweaver-Burk, pois os valores assim estimados são pouco confiáveis, já que os pontos relativos a concentrações altas ficam comprimidos em uma região pequena, enfatizando os pontos relacionados a concentrações baixas. Assim, uma quantidade elevada de pontos experimentais é necessária para que haja maior precisão.^{44,71}

O valor de K_M encontrado para a enzima em solução está de acordo com o da literatura, quando o substrato é a acetilcolina ao invés da acetiltiocolina ($K_M = 9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹)⁴³. No entanto, há variações nos valores de K_M de acordo com o método utilizado para tal determinação, pois além do método espectrofotométrico, há também o método chamado pH-stat que consiste na titulação potenciométrica do ácido acético formado na reação enzimática; o tipo de substrato também leva à alterações nesses valores.⁷²

A avaliação desses parâmetros mostrou que a atividade da AChE foi reduzida com o aumento da concentração de carbaril, reduzindo $V_{\max}$ e mantendo K_M inalterado. Desse modo, é possível inferir que a inibição causada pelo carbaril está relacionada a um processo reversível não-competitivo, conforme discutido na Introdução. A magnitude da diminuição da atividade enzimática foi cerca de 31%, 56% e 75% com o aumento da concentração de carbaril.

Apenas o K_M relacionado à concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril é que variou; o que pode estar relacionado a erros experimentais. O tipo de processo de inibição determinado está em concordância com a literatura, como relatado por Gambi *et al.* (2007) e Norouzy *et al.* (2009).^{73,74}

O valor de k_{cat} também foi alterado já que este depende da velocidade máxima, como a velocidade máxima diminuiu este conseqüentemente, também diminuiu. Assim, quando a enzima foi inibida por um pesticida da classe dos carbamatos, sua atividade catalítica foi reduzida em cerca de 30%.

Figura 32: Curvas de Michaelis-Menten. (•) 0,3U de AChE em solução; (▼) $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril; (▲) $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril e (●) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de carbaril.

Tabela 4 - Efeito do carbaril nos parâmetros cinéticos da AChE

[carbaril] (mol L⁻¹)	V_{max} (mol L⁻¹ s⁻¹)	K_M (mol L⁻¹)	K_{cat} (s⁻¹)	K_i (mol L⁻¹)
0	7,22x10 ⁻⁶	1,47x10 ⁻⁴	722	-
1x10 ⁻⁷	4,95x10 ⁻⁶	1,14x10 ⁻⁴	495	6,88x10 ⁻⁸
5x10 ⁻⁷	4,01x10 ⁻⁶	1,47x10 ⁻⁴	401	2,78x10 ⁻⁷
1x10 ⁻⁶	1,80x10 ⁻⁶	5,23x10 ⁻⁵	523	2.49x10 ⁻⁷

O efeito inibitório do parathion também foi avaliado como mostra a Figura 33. A Tabela 5 mostra os parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_M para a enzima na ausência e na presença de parathion. Comparando-se as curvas de Michaelis-Menten para diferentes concentrações de inibidor, (1×10^{-6} , 1×10^{-4} e 1×10^{-3} mol L⁻¹), constatou-se que o parathion inibe a AChE de modo irreversível, que é característico dos pesticidas organofosforados, que ligam-se covalentemente ao sítio ativo da enzima. Esse comportamento apresenta diminuição de $V_{\max}$ com o aumento da concentração de inibidor e mantém o K_M constante.³⁸

A diminuição da velocidade máxima, considerando a concentração de inibidor de 1×10^{-6} mol L⁻¹, foi de 25%; e para a concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹ a redução foi de 44%. Para a concentração mais elevada (1×10^{-3} mol L⁻¹), a catálise enzimática não seguiu o modelo de Michaelis-Menten como pode ser observado na curva rosa da Figura 33. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de a concentração de inibidor estar tão elevada que a enzima foi praticamente 100% inativada, com a velocidade máxima tendendo a zero.

Figura 33: Curvas de Michaelis-Menten. (•) 0,3U de AChE em solução; (●) 1×10^{-6} mol L⁻¹ de parathion; (▲) 1×10^{-4} mol L⁻¹ de parathion e (▼) 1×10^{-3} mol L⁻¹ de parathion.

Tabela 5 - Efeito do parathion nos parâmetros cinéticos da AChE

[parathion] (mol L ⁻¹)	V _{max} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (mol L ⁻¹)
0	$7,22 \times 10^{-6}$	$1,47 \times 10^{-4}$
1×10^{-6}	$5,42 \times 10^{-6}$	$1,51 \times 10^{-4}$
1×10^{-4}	$4,06 \times 10^{-6}$	$9,2 \times 10^{-5}$
1×10^{-3}	$7,10 \times 10^{-7}$	$2,45 \times 10^{-5}$

4.3 - Avaliação da atividade da molécula biomimética na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh)

O ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico, após ser caracterizado, foi submetido a testes para verificar sua ação como um catalisador da hidrólise da ATCh. Os requisitos necessários para mimetizar a enzima AChE estão relacionados com o estudo da velocidade da catálise, com a identificação dos produtos formados na reação, com o mecanismo de reação e o modelo cinético envolvido.

O mecanismo especulativo desse processo é ilustrado na Figura 34. Primeiramente, o catalisador reage com o substrato formando um intermediário de reação. Posteriormente, há a liberação da tiocolina e o catalisador encontra-se acetilado. Finalmente, ocorre a etapa de hidrólise liberando o acetato e o catalisador inalterado quimicamente.

Figura 34: Mecanismo especulativo da hidrólise da ATCh catalisado pela molécula mimética para formação de acetato e tiocolina, restaurando o catalisador ao final do processo.

4.3.1 – Método espectrofotométrico de Ellman

Primeiramente, foi avaliado se a atividade da molécula mimética poderia ser detectada por este procedimento, como é feito com a enzima AChE. O método de Ellman tem como objetivo detectar o produto da reação enzimática, a tiocolina, de modo indireto; assim, se a molécula mimética catalisasse a hidrólise da ATCh ela poderia ser aplicada como um biomimético para a enzima.

Para realizar os testes iniciais, adotou-se a concentração de catalisador de $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, avaliando-se assim a ação catalisadora para diferentes concentrações de substrato. Os primeiros experimentos realizados com a molécula mimética foram feitos em tampão BR pH 8.

A Figura 35 representa as curvas de detecção do ânion TNB^{2-} que absorve em 412 nm para diferentes concentrações de substrato, mostrando que a molécula mimética funcionou como um catalisador para a hidrólise da ATCh, havendo formação de tiocolina que foi detectada indiretamente pela formação da espécie cromófora.

No entanto, a reação ocorre mais lentamente, quando comparada com o processo enzimático, o que é esperado já que as espécies miméticas não possuem os requisitos de especificidade de uma enzima. Todavia, a molécula proposta atendeu a alguns dos critérios requeridos para mimetizar a AChE, apresentando afinidade para reagir com seu substrato.

Figura 35: Experimento cinético para avaliar o efeito catalítico de $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da molécula mimética, variando-se a concentração de ATCh: (•) $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (•) $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Para ilustrar a catálise que a molécula mimética realiza na hidrólise da ATCh, fotografias foram tiradas após uma hora, dos seguintes ensaios (Figura 36):

A) Cubeta 1: tampão BR pH 7; [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$;

Cubeta 2: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$;

Cubeta 3: tampão BR pH 7; [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5}$.

B) Cubeta 1: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$;

Cubeta 2: [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 36: Fotografias do experimento espectrofotométrico relacionado à formação do TNB^{2-} após 1 hora. A) 1: [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 2: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 3: tampão BR pH 7; [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $9,7 \times 10^{-5}$. B) 1: tampão BR pH 7; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 2: [molécula mimética] = $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [ATCh] = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e [DTNB] = $6,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.2 – Otimização da concentração de molécula mimética

Todos os estudos relacionados ao comportamento cinético da molécula mimética foram feitos em pH 7, afim de evitar os efeitos de hidrólise espontânea da ATCh em meio básico.

O intervalo de concentração de catalisador foi de 1×10^{-3} a $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de ATCh foi mantida constante em $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Pela análise das curvas da Figura 37, pôde-se verificar que a concentração de $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de molécula

mimética levou a uma velocidade de reação maior que as demais; sendo este o valor escolhido para os demais ensaios.

Figura 37: Experimento cinético para avaliar a influência da concentração de catalisador na velocidade da reação de hidrólise da $[ATCh] = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. (●) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (●) $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (●) $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (●) $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram as concentrações de molécula mimética.

A Tabela 6 mostra os valores de velocidade relacionados com a hidrólise da ATCh, quando a concentração de catalisador foi variada. A velocidade de reação foi calculada como a tangente de cada curva, no intervalo de tempo zero a mil segundos. A análise destes resultados mostrou que a velocidade de reação é diretamente

proporcional à concentração do catalisador. A velocidade de reações catalisadas é, algumas vezes, diretamente proporcional à concentração de catalisador:

$$v = F[C] \quad (\text{Equação 14})$$

onde $[C]$ é a concentração de catalisador e F está relacionado com a concentração de substrato e outros fatores.⁷⁵ Esta equação implica que a reação não ocorre em extensão mensurável na ausência de catalisador. Como visto na seção 4.2.3, a reação de hidrólise da ATCh ocorre em extensão desprezível na ausência da molécula em pH 7.

Tabela 6 - Velocidade da reação catalisada pela molécula mimética e a relação com sua concentração

Concentração (mol L ⁻¹)	Velocidade (s ⁻¹)
1x10 ⁻³	5,73x10 ⁻⁴
2x10 ⁻³	1,16x10 ⁻³
4x10 ⁻³	1,53x10 ⁻³
6x10 ⁻³	3,55x10 ⁻³

Apesar da concentração elevada de catalisador definida para ser aplicada nos demais experimentos, não há nenhuma definição sobre a concentração ótima de catalisador ou sobre indicações que este deva atuar em concentrações muito baixas.⁷⁵

4.4 – Avaliação dos produtos de reação da hidrólise da acetiltiocolina (ATCh) catalisada pela molécula mimética

Foi necessário identificar os produtos formados na hidrólise da ATCh para garantir que a molécula mimética esteja realmente imitando o comportamento enzimático; o que implica em detectar o acetato e a tiocolina formados.

Além disso, é importante verificar se o catalisador estava sendo restaurado após a reação, sendo este um requisito para defini-lo como tal, pois um catalisador é definido como uma substância que muda a velocidade de uma reação química, mas que não sofre qualquer alteração química em sua estrutura molecular resultante da reação.⁷⁶

Deste modo, alguns testes foram realizados para identificar a formação de acetato e de tiocolina; além do método de Ellman que identificou a formação de tiocolina.

4.4.1 – Espectrometria no Infravermelho (FTIR)

Para verificar os produtos formados na hidrólise da ATCh catalisada pela molécula mimética, foram obtidos espectros no Infravermelho da ATCh e da reação entre a molécula mimética e a ATCh com estequiometria 1:1.

A mistura reacional contendo o catalisador e o substrato foi evaporada, obtendo-se um sólido amarelo que foi então utilizado no preparo da pastilha de KBr para a obtenção do espectro.

Comparando-se os espectros foi possível detectar bandas características dos produtos esperados da reação, ou seja, a tiocolina e o acetato. Assim, o espectro do acetato de sódio foi obtido para ser comparado com o aquele referente à mistura reacional.

Analisando-se os espectros da Figura 38, é observada uma banda em 2548 cm^{-1} característica da absorção de deformação axial da ligação S–H ($2600\text{-}2540\text{ cm}^{-1}$). Esta banda tem intensidade fraca e poucos grupos apresentam absorção nessa região, sendo útil para a identificação de compostos orgânicos que contém este tipo de ligação. A identificação desta banda constatou a formação da tiocolina como produto da hidrólise.⁷⁷

A partir da comparação entre os espectros da ATCh e o da mistura reacional, observou-se que não há nenhum pico entre $2600\text{-}2540\text{ cm}^{-1}$. Além disso, a ATCh possui em sua estrutura o grupo funcional $\text{R} - \text{CH}_2 - \text{S} -$, cuja banda de deformação axial de $\text{C} - \text{S}$ ocorre na região de $660\text{-}630\text{ cm}^{-1}$,⁷⁸ foi então verificado que havia um pico de intensidade média em 630 cm^{-1} e comparando com o espectro da mistura reacional, esse pico deixou de existir, o que evidenciou a transformação total da ATCh em tiocolina. A Figura 39 mostra a ampliação dessa região para facilitar a visualização do desaparecimento do pico em 630 cm^{-1} após a reação entre a ATCh e a molécula mimética.

O outro produto, o acetato, tem duas bandas características uma entre $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ intensa proveniente da deformação axial assimétrica. A outra, mais fraca, é observada em torno de 1400 cm^{-1} e provém da deformação axial simétrica.⁷⁷

A partir do espectro é possível identificar uma banda em 1609 cm^{-1} que pode estar relacionada à formação do acetato, já que foi observado que no espectro do acetato de sódio havia bandas em 1639 e 1555 cm^{-1} . No entanto, esse dado não pode ser conclusivo, já que outros grupos absorvem neste intervalo, podendo interferir na análise.

As bandas mencionadas estão presentes na Tabela 7.

Figura 38: Espectros no infravermelho para verificar os produtos de reação da hidrólise da acetiltiocolina, catalisada pela molécula mimética. (•) ATCh; (•) mistura reacional (proporção 1:1 de molécula mimética e ATCh) e (•) acetato de sódio.

Figura 39: Ampliação da região do espectro no infravermelho da (•) ATCh e (•) mistura reacional para verificar o desaparecimento da banda em 630 cm^{-1} após a reação.

Tabela 7 - Bandas no infravermelho características da acetiltiocolina e dos produtos de reação da hidrólise da ATCh

Composto	Ligação	Absorção (cm^{-1})
Tiocolina	S – H	2548
Acetato	C = O	1609
Acetiltiocolina	R – CH ₂ – S –	630

4.5 – Mecanismo catalítico

As reações catalisadas ocorrem em uma variedade ampla de mecanismos. No entanto, há um padrão que se aplica a várias reações que possuem um único substrato que são catalisadas por superfícies, enzimas, ácidos, bases, entre outras moléculas.

O esquema dessas reações é:

C representa o catalisador e S o substrato; X e Y são intermediários, o primeiro sofre uma segunda reação com a espécie W para dar o produto final P e regenerar o catalisador. W pode ser uma molécula de solvente ou de soluto. O esquema mostra apenas as reações cineticamente significantes; a espécie Y não sofre qualquer outro processo que altere o comportamento cinético. Para simplificar o tratamento, assume-se que a segunda reação não ocorre na direção reversa.

As Equações 15 e 16 podem ser aplicadas ao sistema que considera a hidrólise da ATCh catalisada pela molécula mimética. O catalisador é o ácido (4-(1E)-etanohidrazonoil) benzóico, o substrato é ATCh, X é o catalisador acetilado e Y a

tiocolina, W é a água e P é o acetato. O processo descrito acima pode ser ilustrado da seguinte forma (Figura 40):

Figura 40: Esquema da reação de catálise homogênea da hidrólise da ATCh.

Há dois casos limitantes que envolvem catálise homogênea:

- 1) Intermediário de Arrhenius: a velocidade com que o intermediário X sofre a reação da Equação 16 deve ser suficientemente mais lenta que a reação da Equação 15, que está em equilíbrio: a condição exata para isso é $k_2[X][W] \ll k_{-1}[X][Y]$.

Este tipo de comportamento é característico de reações que envolvem um único substrato que é catalisado por superfícies ou enzimas. A equação de velocidade para as reações enzimáticas, que seguem o modelo mecanístico de Michaelis-Menten, apresenta tais condições de contorno.

2) Intermediário de van't Hoff: Se a condição $k_2 [W] \gg k_{-1}[Y]$ se aplica, a concentração de X é pequena e o tratamento do estado estacionário é aplicável. A equação do estado estacionário é:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[C][S] - k_{-1}[X][Y] - k_2[X][X] = 0 \quad (\text{Equação 17})$$

A substituição de $[C]_0 - [X]$ por $[C]$ e de $[S]_0 - [X]$ por $[S]$ leva a:

$$[X] = \frac{k_1[C][S]}{k_1([C]_0 + [S]_0) + k_{-1}[Y] + k_2[W]} \quad (\text{Equação 18})$$

A velocidade é portanto:

$$v = \frac{k_1 k_2 [C]_0 [S]_0}{k_1([C]_0 + [S]_0) + k_{-1}[Y] + k_2[W]} \quad (\text{Equação 19})$$

Esta equação indica que em concentrações baixas tanto do catalisador como do substrato, a velocidade é proporcional tanto a $[C]_0$ como $[S]_0$; e para concentrações mais altas de ambos, a velocidade se torna independente da concentração.

Um problema importante em cinética química é determinar como a velocidade depende das concentrações das substâncias envolvidas na reação. Além disso, conhecer como a velocidade é afetada pelos produtos da reação ou por substâncias adicionadas ao sistema, como os catalisadores ou inibidores.

O método diferencial é um procedimento para determinar as velocidades de reação pela medida das tangentes das curvas de concentração pelo tempo. O procedimento é feito a partir de várias curvas com diferentes concentrações C de reagente, e se a reação tem ordem n em relação a um reagente específico, então:

$$v = - \frac{dc}{dt} = kc^n \quad (\text{Equação 13})$$

O gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$ fornece uma reta de tangente n e o intercepto quando $\ln c = 0$ é então, $\ln k$. Se o gráfico obtido não é uma reta, a velocidade não pode ser representada pela Equação 13, pois a reação não tem ordem relacionada ao reagente analisado.

Para determinar a ordem de reação da hidrólise da ATCh, catalisada pelo ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil) benzóico, várias curvas de absorbância *versus* tempo para diferentes concentrações de ATCh foram obtidas, como mostrada na Figura 41. As tangentes foram calculadas e os valores de velocidade obtidos em s^{-1} .

Figura 41: Curvas de absorbância *versus* tempo para diferentes concentrações de substrato (ATCh) e concentração fixa de substrato em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Concentrações de ATCh foram (•) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (•) $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Para determinar a ordem de reação e a constante de velocidade foram utilizados os valores de velocidade de formação do produto (tiocolina) que não estavam relacionados com concentrações elevadas de substrato, pois a velocidade passa a não depender da concentração. Os valores encontram-se na Tabela 8:

Tabela 8 - Valores de velocidade de formação do produto de reação

Concentração de ATCh (mol L ⁻¹)	Velocidade formação do produto (s ⁻¹)
1x10 ⁻⁴	1,149x10 ⁻⁴
2x10 ⁻⁴	1,837x10 ⁻⁴
4x10 ⁻⁴	4,039x10 ⁻⁴
6x10 ⁻⁴	5,079x10 ⁻⁴
8x10 ⁻⁴	7,290x10 ⁻⁴
1x10 ⁻³	0,00105

A Figura 42 mostra o gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$, que forneceu a ordem de reação em relação à concentração (n_c), sendo esta reação de primeira ordem em relação ao substrato. O valor de constante de velocidade encontrado foi de 0,623 s⁻¹ à temperatura ambiente, como a etapa limitante da reação é a desacetilação da molécula mimética, a constante de velocidade calculada foi k_2 .

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de um reagente particular é definido como o tempo requerido para que a concentração deste diminua à metade de seu valor inicial. Para reações de ordem um, a equação do $t_{1/2}$ é:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Equação 20})$$

A constante de velocidade (k) calculada para a reação estudada foi $0,623 \text{ s}^{-1}$; sendo assim, o valor de $t_{1/2}$ é $1,1 \text{ s}$. O tempo de meia vida calculado mostra que a reação é rápida.

Figura 42: Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$. A concentração de molécula mimética foi mantida constante ($6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Diversas publicações sobre moléculas miméticas empregadas ou não na área de biossensores aplicam o modelo cinético de Michaelis-Menten aos seus sistemas.⁷⁹⁻⁸² No entanto, este modelo cinético é baseado em diversas condições de contorno^{43,75}, seria então inadequado ajustar dados experimentais referentes à velocidade de reações catalisadas por catalisadores artificiais, como é o caso das moléculas

biomiméticas à equação de Michaelis-Menten e calcular os parâmetros cinéticos $V_{\max}$, K_M e k_{cat} .

O significado da constante de Michaelis (K_M) depende de aspectos específicos do mecanismo de reação, como as velocidades relativas e o número de etapas individuais. Para reações de duas etapas: $K_M = (k_2 + k_{-1}) / k_1$. Quando k_2 se refere à etapa limitante da reação, $k_2 \ll k_{-1}$ e K_M é reduzido a k_{-1} / k_1 , que é definido como constante de dissociação do complexo ES. Essas condições atribuem a K_M o significado de medida da afinidade da enzima com seu substrato, no complexo ES.⁸³

Algumas vezes, $k_2 \gg k_{-1}$ e então K_M se torna k_2 / k_1 . Em outros casos, k_2 e k_{-1} são comparáveis e K_M permanece uma função mais complexa dependente das três constantes. A equação de Michaelis-Menten e as características do comportamento de saturação da enzima ainda são aplicáveis, mas K_M não pode ser considerado uma medida de afinidade entre a enzima e o seu substrato. Além disso, são comuns os casos em que a reação acontece em várias etapas depois da formação de ES, K_M então se torna uma função muito complexa de várias constantes de velocidade.⁸³

Além disso, não há significado físico quando se fala sobre afinidade catalisador e substrato já que, ambas as moléculas possuem apenas um sítio nucleofílico e outro eletrofílico, o que está longe da complexidade de um sítio ativo enzimático. Do ponto de vista químico, há apenas uma reação nucleofílica envolvida na maioria dos casos, o que diferencia as reações catalisadas por enzimas é que elas ocorrem dentro de um “bolso” chamado sítio ativo. A superfície do sítio ativo é forrada de resíduos de aminoácidos que possuem grupos que se ligam ao substrato e catalisam a transformação química. Os substratos se ligam ao sítio ativo da enzima através de

ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações covalentes ou a combinação de todas essas para formar o complexo enzima-substrato. Os resíduos de aminoácidos atuam, então, como doadores ou aceptores de prótons ou outros grupos para facilitar a reação. Em outras palavras, o sítio ativo modifica o mecanismo de reação para mudar a energia de ativação da reação. O produto é geralmente instável no sítio ativo devido o impedimento estérico, que o força a ser liberado para regenerar a enzima. Tais características não são aplicadas às moléculas miméticas.

A equação de Michaelis-Menten foi aplicada à reação catalisada pela molécula mimética para comparar a constante de velocidade calculada por este modelo (k_{cat}) com aquela calculada pelo método diferencial. A curva de Michaelis-Menten obtida para os dados experimentais referentes à molécula mimética é mostrada na Figura 43.

Os parâmetros cinéticos obtidos para a curva de Michaelis-Menten para a molécula mimética encontram-se na Tabela 9. Os valores de V_{max} e K_M foram obtidos pelo ajuste não-linear da equação de Michaelis-Menten, pelo software Origin8.0®; já o valor de k_{cat} foi calculado pela Equação 10, sendo V_{max} dividido pela concentração de molécula mimética ($6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). O valor calculado de constante de velocidade pelo modelo de Michaelis-Menten foi cerca de 13000 vezes menor que a calculada pelo método diferencial, que foi $0,623 \text{ s}^{-1}$; o que mostrou que o modelo cinético enzimático acarreta erros significativos na determinação de constantes e na atribuição de significado aos parâmetros determinados para moléculas artificiais.

Os dados experimentais mostram que há um momento em que a velocidade passa a não depender mais da concentração de substrato, o que está em concordância com o tratamento do estado estacionário aplicado aos intermediários de van't Hoff.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos determinados para a molécula mimética

Concentração de molécula mimética (mol L ⁻¹)	V _{max} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (mol L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)
6x10 ⁻³	2,82x10 ⁻⁷	1,37x10 ⁻³	4,78x10 ⁻⁵

Figura 43: Curva de Michaelis-Menten aplicada aos dados experimentais obtidos para a molécula mimética, na catálise do substrato ATCh.

5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi utilizada uma rota sintética simples, com apenas uma etapa de síntese, para a produção de uma molécula orgânica que mimetizasse a hidrólise da acetiltiocolina. O rendimento da reação foi de 40-50 %. A molécula mimética produzida foi capaz de executar um ataque nucleofílico à molécula alvo, em um mecanismo completamente diferente ao da catálise enzimática; promovendo então, a hidrólise do análogo ao substrato da acetilcolinesterase, a acetiltiocolina. Assim, o ácido (4-(1*E*)-etanohidrazonoil)benzóico mostrou-se eficiente na mimetização da atividade catalítica da enzima acetilcolinesterase. E diferentes métodos analíticos foram capazes de identificar, e até mesmo quantificar, os produtos de reação, a tiocolina e o acetato.

O modelo cinético de Michaelis-Menten aplicado aos dados experimentais obtidos com a molécula artificial mostrou que este não pode ser utilizado para o catalisador artificial, uma vez que a constante de velocidade calculada foi diferente daquela calculada pelo método diferencial. Com esses resultados, ficou evidente que o modelo cinético enzimático deve ser aplicado apenas em sistemas enzimáticos, uma vez que condições de contorno devem ser obedecidas, para evitar erros associados às constantes obtidas, incluindo erros relacionados à atribuição de significado físico às constantes, como é o caso do K_M .

Esta molécula pode agora ser testada para a inibição da sua atividade catalítica por pesticidas e, se positivo, utilizada no desenvolvimento de sensores miméticos descartáveis para o monitoramento destes poluentes ambientais, uma vez que as

enzimas oferecem limitações ao uso, já que possuem custo elevado e condições delicadas para manuseio (pH, força iônica e temperatura).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZHANG, J. L.; QIAO, C. L.; LAN, W. S. Purification and some characteristics of recombinant insecticide-resistant mosquito carboxylesterase B1 expressed in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 648-653, 2005.
2. PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests - Environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural & Environmental Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17-29, 1995.
3. ESKENAZI, B.; BRADMAN, A.; CASTORINA, R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 409-419, 1999.
4. ESKENAZI, B.; ROSAS, L. G.; MARKS, A. R.; BRADMAN, A.; HARLEY, K.; HOLLAND, N.; JOHNSON, C.; FENSTER, L.; BARR, D. B. Pesticide toxicity and the developing brain. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102, n. 2, p. 228-236, 2008.
5. TORRES, C. M.; PICO, Y.; MANES, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1-2, p. 301-331, 1996.
6. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)** Brasília: ANVISA, 2010.
7. GROSSER, Z. A.; RYAN, J. F.; DONG, M. W. Environmental chromatographic methods and regulations in the United States of America. **Journal of Chromatography A**, v. 642, n. 1-2, p. 75-87, 1993.
8. FERGUSON, B. S.; KELSEY, D. E.; FAN, T. S.; BUSHWAY, R. J. Pesticide testing by enzyme immunoassay at trace levels in environmental and agricultural samples. **The Science of The Total Environment**, v. 132, n. 2-3, p. 415-428, 1993.
9. GARCIA-REYES, J. F.; HERNANDO, M. D.; FERRER, C.; MOLINA-DIAZ, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and tandem mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 19, p. 7308-7323, 2007.
10. CACHO, C.; TURIÉL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; PEREZ-CONDE, C.; CAMARA, C. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 4, p. 491-496, 2003.

11. GILBERT-LOPEZ, B.; GARCIA-REYES, J. F.; MOLINA-DIAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 109-128, 2009.
12. HERCEGOVA, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 54-73, 2007.
13. AHMED, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 649-661, 2001.
14. SHARIF, Z.; MAN, Y. B. C.; HAMID, N. S. A.; KEAT, C. C. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1-2, p. 254-261, 2006.
15. CAETANO, J.; MACHADO, S. A. S. Determination of carbaryl in tomato "in natura" using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 129, n. 1, p. 40-46, 2008.
16. DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Electrochemical detection of the herbicide paraquat in natural water and citric fruit juices using microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, n. 1, p. 85-91, 2005.
17. SKLADAL, P.; MASCINI, M. Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanine-modified composite electrodes and immobilized cholinesterases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 5, p. 335-343, 1992.
18. ZAMFIR, L.-G.; ROTARIU, L.; BALA, C. A novel, sensitive, reusable and low potential acetylcholinesterase biosensor for chlorpyrifos based on 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/multiwalled carbon nanotubes gel. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3692-3695, 2011.
19. YUE, X.; DAI, Z. Carbon nanotube-based cholinesterase biosensors for the detection of pesticides in: SERRA, P. A. (Ed.). **New perspectives in biosensors technology and applications**. Rijeka: InTech, 2010. cap. 19, p. 458.
20. ZHANG, Y. D.; MUENCH, S. B.; SCHULZE, H.; PERZ, R.; YANG, B. L.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T. Disposable biosensor test for organophosphate and carbamate insecticides in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 5110-5115, 2005.

21. TURNER, A. P. F. Current trends in biosensor research and development. **Sensors and Actuators**, v. 17, n. 3-4, p. 433-450, 1989.
22. THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
23. MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 1791-1799, 2008.
24. MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237-256, 2002.
25. BASSI, A. S.; TANG, D. Q.; LEE, E.; ZHU, J. X.; BERGOUGNOU, M. A. Biosensors in environmental and bioprocess monitoring and control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 9-22, 1996.
26. LIU, S.; YUAN, L.; YUE, X.; ZHENG, Z.; TANG, Z. Recent advances in nanosensors for organophosphate pesticide detection. **Advanced Powder Technology**, v. 19, n. 5, p. 419-441, 2008.
27. IVANOV, A. N.; EVTUGYN, G. A.; GYURCSANYI, R. E.; TOTH, K.; BUDNIKOV, H. C. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, n. 1, p. 55-65, 2000.
28. ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.
29. SHULGA, O.; KIRCHHOFF, J. R. An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 5, p. 935-940, 2007.
30. CHEN, H.; ZUO, X.; SU, S.; TANG, Z.; WU, A.; SONG, S.; ZHANG, D.; FAN, C. An electrochemical sensor for pesticide assays based on carbon nanotube-enhanced acetylcholinesterase activity. **Analyst**, v. 133, n. 9, p. 1182-1186, 2008.
31. NUNES, G. S.; BARCELO, D.; GRABARIC, B. S.; DIAZ-CRUZ, J. M.; RIBEIRO, M. L. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 399, n. 1-2, p. 37-49, 1999.
32. SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

33. DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 10-22, 2010.
34. SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 3-10, 2008.
35. SZEGLETES, T.; MALLENDER, W. D.; THOMAS, P. J.; ROSENBERRY, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 122-133, 1999.
36. SANTOS, V. M. R. D.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, p. 159-170, 2007.
37. VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.
38. WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. Toronto: John Willey, 2000. 348 p.
39. ANTOKHIN, A. M.; GAINULLINA, E. T.; TARANCHENKO, V. F.; RYZHIKOV, S. B.; YAVAEVA, D. K. Cholinesterases: structure of the active site and mechanism of the effect of cholinergic receptor blockers on the rate of interaction with ligands. **Russian Chemical Reviews**, v. 79, n. 8, p. 713-727, 2010.
40. FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245-254, 1990.
41. KHAYYAMI, M.; PÉREZ PITA, M. T.; PEÑA GARCIA, N.; JOHANSSON, G.; DANIELSSON, B.; LARSSON, P.-O. Development of an amperometric biosensor based on acetylcholine esterase covalently bound to a new support material. **Talanta**, v. 45, n. 3, p. 557-563, 1998.
42. ANDREESCU, S.; MARTY, J.-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2006.
43. VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 1596 p.

44. DOWD, J. E.; RIGGS, D. S. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 2, p. 863-869, 1965.
45. KEMMER, G.; KELLER, S. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 267-281, 2010.
46. BURLINGHAM, B. T.; WIDLANSKI, T. S. An intuitive look at the relationship of K_i and IC₅₀: A more general use for the Dixon plot. **Journal of Chemical Education**, v. 80, n. 2, p. 214-218, 2003.
47. DE CASTRO, M. D. L.; HERRERA, M. C. Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: questionable analytical devices. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 18, n. 2-3, p. 279-294, 2003.
48. BRESLOW, R. Centenary lecture: biomimetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 1, n. 4, p. 553-580, 1972.
49. BRESLOW, R. Biomimetic control of chemical selectivity. **Accounts of Chemical Research**, v. 13, n. 6, p. 170-177, 1980.
50. BRESLOW, R. Biomimetic chemistry and artificial enzymes- catalysis by design. **Accounts of Chemical Research**, v. 28, n. 3, p. 146-153, 1995.
51. SOTOMAYOR, M. D. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a Nafion (R) membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 536, n. 1-2, p. 71-81, 2002.
52. DAMOS, F. S.; SOTOMAYOR, M. D. T.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, S.; TANAKA, A. A. Iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: An amperometric sensor for phenolic compound determinations. **Analyst**, v. 128, n. 3, p. 255-259, 2003.
53. OLIVEIRA, M. C. Q.; LANZA, M. R. V.; JARA, J. L. P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Online monitoring of electrochemical degradation of paracetamol through a biomimetic sensor. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2011, p. 1-11, 2011.
54. SARDARLY, N.; NAGIEV, T. Physicochemical peculiarities of iron porphyrin-containing electrodes in catalase- and peroxidase-type biomimetic sensors. **Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry**, v. 83, n. 8, p. 1400-1404, 2009.

55. FRANZOI, A. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on MnIIIMnII complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 221-226, 2009.
56. MOBIN, S. M.; SANGHAVI, B. J.; SRIVASTAVA, A. K.; MATHUR, P.; LAHIRI, G. K. Biomimetic Sensor for Certain Phenols Employing a Copper(II) Complex. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 14, p. 5983-5992, 2010.
57. VIAL, L.; DUMY, P. Artificial enzyme-based biosensors. **New Journal of Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 939-946, 2009.
58. GAO, L.; ZHUANG, J.; NIE, L.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; GU, N.; WANG, T.; FENG, J.; YANG, D.; PERRETT, S.; YAN, X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 9, p. 577-583, 2007.
59. SANTOS, W. D. J. R.; SOUSA, A. L.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DAMOS, F. S.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A. Manganese phthalocyanine as a biomimetic electrocatalyst for phenols in the development of an amperometric sensor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1180-1187, 2009.
60. SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SIGOLI, A.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrrolineporphyrin as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 734-743, 2008.
61. BALLESTER, P.; SHIVANYUK, A.; FAR, A. R.; REBEK, J. A synthetic receptor for choline and carnitine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 47, p. 14014-14016, 2002.
62. BIROS, S. M.; ULLRICH, E. C.; HOF, F.; TREMBLEAU, L.; REBEK, J. Kinetically stable complexes in water: The role of hydration and hydrophobicity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 9, p. 2870-2876, 2004.
63. HOF, F.; TREMBLEAU, L.; ULLRICH, E. C.; REBEK, J. Acetylcholine recognition by a deep, biomimetic pocket. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 42, n. 27, p. 3150-3153, 2003.
64. MASCINI, M.; SERGI, M.; MONTI, D.; DEL CARLO, M.; COMPAGNONE, D. Oligopeptides as mimic of acetylcholinesterase: from the rational design to the application in solid-phase extraction for pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9150-9156, 2008.
65. BHATTACHAYAY, D.; PAL, P.; BANERJEE, S.; SANYAL, S. K.; TURNER, A. P. F.; SARKAR, P. Electrochemical acetylcholine chloride biosensor using an acetylcholine esterase biomimic. **Analytical Letters**, v. 41, n. 8, p. 1387-1397, 2008.

66. NENAJDENKO, V. G.; LENKOVA, O. N.; SHASTIN, A. V.; BALENKOVA, E. S. New synthetic approach to alpha-chlorocinnamates: First example of synthesis of functionally substituted alkenes using catalytic olefination reaction. **Synthesis**, n. 4, p. 573-577, 2004.
67. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.
68. RIDDLES, P. W.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Ellman's reagent - 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - Re-Examination. **Analytical Biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 75-81, 1979.
69. LEUZINGER, W.; GOLDBERG, M.; CAUVIN, E. Molecular properties of acetylcholinesterase. **Journal of Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 217-225, 1969.
70. KOMERSOVA, A.; KOMERS, K.; CEGAN, A. New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, v. 62, n. 1-2, p. 150-154, 2007.
71. SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Elsevier Science, 2002. 721 p.
72. FROEDE, H. C.; WILSON, I. B. Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 17, p. 11010-11013, 1984.
73. GAMBI, N.; PASTERIS, A.; FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 678-685, 2007.
74. NOROUZY, A.; QUJEQ, D.; HABIBI-REZAEI, M. The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 98, n. 2, p. 391-401, 2009.
75. LAIDLER, K. J. **Chemical kinetics**. New York: Harper & Row, 1987. 531 p.
76. PANCHENKOV, G. M.; LEBEDEV, V. P. **Chemical kinetics and catalysis**. Moscou: Mir, 1976. 645 p.
77. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

78. SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies**. West Sussex: John Wiley, 2001. 347 p.
79. BRESLOW, R. Biomimetic chemistry: biology as an inspiration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 1337-1342, 2009.
80. ZEN, J. M.; KUMAR, A. S. A mimicking enzyme analogue for chemical sensors. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 10, p. 772-780, 2001.
81. CHEN, X.; ZHAO, T.; ZOU, J. A novel mimetic peroxidase catalyst by using magnetite-containing silica nanoparticles as carriers. **Microchimica Acta**, v. 164, n. 1-2, p. 93-99, 2009.
82. BONI, A. C.; WONG, A.; FIREMAN DUTRA, R. A.; TABOADA SOTOMAYOR, M. D. P. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 2067-2073, 2011.
83. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2005. 1100 p.