UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Livia Flório Sgobbi

Desenvolvimento de um biossensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento

São Carlos

2016

Livia Flório Sgobbi

Desenvolvimento de um biossensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Livia Flório Sgobbi*
Data: *25/04/2016*

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

Sgobbi, Livia Flório

Desenvolvimento de um biossensor descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento. / Livia Flório Sgobbi. — São Carlos, 2016.
120 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antonio Spinola Machado

1. Biomimético. 2. Biossensor. 3. Acetilcolinesterase. 4. Pesticida. 5. Eletrodo impresso. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

*Aos meus pais, Ariovaldo e Kátia, por me
ensinarem desde cedo que o estudo é o nosso bem
maior.*

*Aos meus tios André e Anete por acreditarem
sempre em mim.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ariovaldo e Kátia, por estarem sempre ao meu lado durante todo esse período, me incentivando e confiando em mim, mesmo durante os momentos mais difíceis. Devo tudo a vocês e não sei mensurar o quanto. A gratidão e o amor são infinitos!

Ao meu irmão Hugo que me ensina sempre que a partir das diferenças é possível ver o mundo com outros olhos.

Aos meus tios Anete e André que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditei, me fazendo ser mais otimista e positiva.

Ao Rodrigo que com todo amor e cumplicidade me ajudou a trilhar pelos caminhos da ciência, me mostrando que escolhi a carreira certa, apesar dos obstáculos. Você me mostrou como ter paixão pelo que faço.

Ao Prof. Dr. Sergio A. Spinola Machado devo tudo aquilo que aprendi e a profissional que me tornei. Foram 9 anos de aprendizado e incentivo, me mostrando que sou capaz, me ensinando a ser perseverante e a não desanimar. Espero um dia retribuir por tudo aquilo que fez por mim. Meu sincero agradecimento.

Aos amigos João Tiengo e Marcelo Calegaro que tornaram esse trabalho possível. A amizade e respeito que tenho por vocês são imensos.

Aos amigos Dr. Bruno Manzolli e Dra. Claudia Razzino, que além de toda amizade e apoio fundamentais durante esse período, foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Com a ajuda de um amigo, tudo é possível.

Aos amigos que a química me deu, Natalia Ashino, Rachel, Thiago, Valeria e Virgínia vocês todos fizeram parte dessa jornada e foram muito importantes. Eu sei que são amigos para a vida toda.

Aos amigos Andrea, Danilo e William que não tem ideia de como foram importantes para mim. Devo muito a vocês!

Ao Prof. Dr Antonio C. B. Burtoloso do Grupo de Síntese Orgânica por todo auxílio em relação à química orgânica, por me ajudar a compreender um pouco mais desse mundo novo para mim.

Ao Prof. Dr. Juarez L. F. da Silva e a Dra. Polina Tereshchuk do Grupo de Teoria Quântica de Nanomateriais, que complementaram de forma importante este trabalho através dos cálculos teóricos e de muita discussão.

Ao Prof. Dr. Arben Merkoçi e todos os membros do Nanoelectronics and Biosensors Group, do Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (Barcelona, Espanha), que me acolheram durante o período de doutorado sanduíche e com quem pude aprender muito.

Aos amigos do GMEME, antigos e atuais, Dyovani, Tiaguinho, Tony, Milena, Fernanda, Sara, Paulo, Thiago, Diego, Codorna, Vanessa, Naiza, Erica, Anderson, Jaque, Camila e Pollyana, vocês fizeram esses anos muito mais alegres e cheios de histórias memoráveis.

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida e todo suporte financeiro (processo nº 2012/08750-6), o que tornou possível a execução deste projeto, juntamente com a BEPE (2013/20701-3) que proporcionou a experiência incrível de realizar o doutorado no exterior em um laboratório renomado.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo por oferecer toda a infraestrutura necessária para a execução do presente trabalho. À Central de Análises Químicas (CAQI), à biblioteca Prof. Johanés Rüdiger Lechat e ao Serviço de Pós-Graduação que contam com profissionais excelentes cujo auxílio foi imprescindível durante todo o meu doutorado.

Obrigada!

“We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.” —Marie Curie

RESUMO

A enzima acetilcolinesterase (AChE) tem sido amplamente aplicada no desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas. No entanto, a aplicação de tais dispositivos é limitada devido à falta de robustez, que está associada com a baixa estabilidade enzimática, além de seu alto custo. Uma alternativa às enzimas é a utilização de moléculas sintéticas que mimetizem o comportamento enzimático, com menor custo e maior estabilidade; tais moléculas são denominadas moléculas biomiméticas. Neste trabalho são apresentados três potenciais catalisadores: o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico, o iodeto de pralidoxima (2-PAM) e o polímero polihidroxicamicalcanoato (PHA); com grupos funcionais alfa nucleófilos hidrazona, oxima e ácido hidroxâmico, respectivamente. Tais moléculas foram avaliadas baseando-se em dois critérios para classificação de biomiméticos da AChE: 1) catálise da hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATCh) e 2) interação com pesticida organofosforado. O método espectrofotométrico de Ellman revelou que o polímero PHA foi a molécula mais eficiente, uma vez que a constante de velocidade de segunda ordem obtida foi de $13867 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 5 vezes superior a da 2-PAM e 232 vezes a da hidrazona. Posteriormente, todas as moléculas foram avaliadas por método espectrofotométrico em relação à interação com o organofosforado paraoxon. Apenas o PHA apresentou interação nas condições estudadas. Cálculos teóricos mostraram como ocorre a aproximação entre o PHA e ATCh, e com o paraoxon. Diante dos resultados obtidos, o PHA foi a molécula biomimética escolhida para aplicação no sensor eletroquímico para detecção de organofosforados. Primeiramente, o PHA foi imobilizado na superfície de um eletrodo impresso descartável a partir da formação de uma blenda com o polímero polietileno glicol metil éter, evitando sua solubilização. A oxidação da tiocolina formada a partir da catálise do ATCh realizada pelo PHA imobilizado foi verificada em 0,46 V vs Ag/AgCl, por voltametria de pulso diferencial. A equação obtida a partir da curva de calibração referente ao intervalo de concentração de paraoxon de 1,0 a $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foi $I(\%) = [4,8 \times 10^6 C (\text{mol L}^{-1}) + 0,8169] \times 100$ ($R^2 = 0,99969$), com limite de detecção de $3,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Amostras de água de abastecimento foram analisadas, com concentrações adicionadas de paraoxon de 3,0; 6,0 e $8,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com recuperação de 115%; 106% e 94,5%, respectivamente. Os resultados apresentados mostraram que foi possível desenvolver um sensor eletroquímico biomimético para detecção de pesticida paraoxon.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase enzyme (AChE) has been widely applied in biosensor development for pesticide detection. However, the application of those biosensors is limited due to their lack of robustness associated with low enzymatic stability and AChE high cost. An alternative to enzymes, it is the use of synthetic molecules which mimic enzymatic behavior, besides its low cost and superior stability, those are classified as biomimetic molecules. In this work is presented three potential catalysts: [4-(1*E*)ethanehydrazonoyl]benzoic acid, pralidoxime iodide (2-PAM), and polyhydroxamicalkalnoate polymer (PHA) with alpha nucleophile functional groups, such as hydrazone, oxime, and hydroxamic acid, respectively. The aforementioned molecules were evaluated based on two criteria for classification as AChE biomimetic: 1) catalysis of acetylthiocholine substrate (ATCh) hydrolysis and 2) interaction with organophosphorus pesticide. Spectrophotometrical Ellman's method revealed that PHA polymer was the most efficient one, since its second order rate constant was $13867 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, which was 5 times superior than 2-PAM one and 232 times higher than hydrazone. Then, each molecule was analyzed through spectrophotometric method to verify the interaction with paraoxon organophosphorus pesticide. Only the PHA exhibited such interaction in the studied conditions. Theoretical calculations showed how the approach between PHA and ATCh, and also with paraoxon occurred. Regarding the obtained results, PHA was the chosen biomimetic molecule to be applied in the electrochemical sensor for organophosphorus detection. First of all, PHA was immobilized on the surface of disposable screen printed electrode through blend formation with polyethylene glycol methyl ether (mpEG), avoiding PHA dissolution. The oxidation of thiocholine generated towards ATCh catalysis performed by immobilized PHA was verified at 0.46 V vs Ag/AgCl by differential pulse voltammetry. The linear equation obtained through calibration curve for paraoxon concentration range of 1.0 to 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was $I(\%) = [4.8 \times 10^6 C (\text{mol L}^{-1}) + 0.8169] \times 100$ ($R^2 = 0.99969$), with limit of detection of $3.63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Water supply samples were analyzed considering the added paraoxon concentrations of 3.0; 6.0 e 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, recovering 115%; 106% and 94.5%, respectively. The presented results showed that a biomimetic electrochemical sensor was successfully developed for detection of paraoxon organophosphorus pesticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral dos pesticidas OPs.....	2
Figura 2 - Principais grupos químicos com uso irregular detectados em amostras insatisfatórias.....	3
Figura 3- Esquema de um biossensor baseado nas diferentes categorias de analito, elemento de biorreconhecimento e transdutor.....	5
Figura 4 - Esquema da reação de hidrólise de OP catalisada pela OPH. R1 é um grupo alcóxi e R2 é um grupo alcóxi ou fenil e Z é um grupo fenóxi, tiol, cianeto ou fluoreto.	9
Figura 5 - Reações de hidrólise dos substratos enzimáticos acetilcolina e butirilcolina, catalisadas pelas enzimas AChE e BuChE, respectivamente.	10
Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da ACh catalisado pela AChE.	11
Figura 7 - Mecanismo clássico da inibição da AChE por OPs.....	12
Figura 8 - Fórmula estrutural do cloreto de acetiltiocolina (ATCh).....	13
Figura 9 - Esquema de um biossensor amperométrico monoenzimático baseado na enzima AChE para detecção de pesticidas OPs e CBs.....	14
Figura 10 - Diversas moléculas artificiais utilizadas como modelos miméticos para enzimas.	16
Figura 11 - A) Molécula mimética da AChE proposta por <i>Hof et al.</i> (2003) que não apresenta atividade catalítica. ⁵³ B) Molécula mimética proposta por <i>Biros et al</i> (2003) para AChE que apresenta estabilidade em água. ⁵²	19
Figura 12 - Comparação da estrutura da molécula mimética com o substrato acetilcolina.....	20
Figura 13 - Estruturas de compostos que apresentam efeito alfa.	21
Figura 14 - Processo de inibição e reativação da AChE. R ₁ : grupo alquila, O-alquila ou amida; R ₂ : grupo O-alquila ou amida; e X: grupo de saída.....	23
Figura 15 - Estruturas de aldoximas piridínicas pertencentes à classe das oximas.....	24
Figura 16 - Esquema do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA) reagindo com o organofosforado paraoxon.....	25
Figura 17 - Esquema da síntese da molécula biomimética ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.	30
Figura 18 - Esquema da síntese A) ciclopropil metil hidrazona e B) 3-metil-2-butanona-hidrazona a partir de cetonas.	31
Figura 19 - Reação de hidrólise da acetiltiocolina catalisada pela AChE, seguida da reação entre o produto da catálise enzimática e o reagente de Ellman (DTNB), cuja formação do TNB ²⁻ é monitorada espectrofotometricamente em 412 nm.	33

Figura 20 - Eletrodo impresso descartável de carbono, cujo ER é o eletrodo de pseudo referência de Ag/AgCl, ET é o eletrodo de trabalho, e EA é o eletrodo auxiliar.....	36
Figura 21-Espectros de FTIR da ciclopropil metil cetona (•) e da ciclopropil metil hidrazona (•).	41
Figura 22 - Espectros de FTIR da 3-metil-2-butanona (•) e da 3-metil-2-butanona-hidrazona (•).	41
Figura 23 - Espectro de massas do ciplopropil metil hidrazona.....	42
Figura 24 - Espectro de massas da 3-metil-2-butanona-hidrazona.....	42
Figura 25 - Espectro de RMN ^1H da 3-metil-2-butanona-hidrazona em CDCl_3	43
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C da 3-metil-2-butanona-hidrazona em CDCl_3	44
Figura 27 - Mecanismo especulativo da hidrólise da ATCh catalisado pela molécula mimética para formação de acetato e tiocolina, restaurando o catalisador ao final do processo.	45
Figura 28 - A) Efeito da concentração de catalisador (ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico) (•) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (•) $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (•) $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0. Parâmetros: [ATCh] e [DTNB] = $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. B) Fotografia relacionada à formação do TNB^{2-} após 1 hora. 1: Hidrazona, ATCh e DTNB; 2: ATCh e DTNB; 3: Hidrazona e DTNB.	46
Figura 29 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-4}$, b) $2,0 \times 10^{-4}$, c) $4,0 \times 10^{-4}$, d) 6×10^{-4} , e) $8,0 \times 10^{-4}$, f) $1,0 \times 10^{-3}$ e g) $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [\text{ATCh}]$	48
Figura 30 - Comparação do comportamento catalítico das hidrazonas em relação à enzima AChE (•), nas mesmas condições experimentais: ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico (•), ciclopropil metil hidrazona (•) e 3-metil-2-butanona-hidrazona (•).	49
Figura 31 - Configurações obtidas a partir dos dados de simulação computacional entre a ATCh e A) ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico, B) ciclopropil metil hidrazona e C) 3-metil-2-butanona-hidrazona.	50
Figura 32 - Mecanismo especulativo da reação entre o organosfosforado paraoxon e a hidrazona ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.	51
Figura 33 - A) Espectros de absorção de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do paraoxon (•) e de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico (•) em tampão pH 7,0. B) Efeito da interação entre o paraoxon ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com diversas concentrações de hidrazona: 1×10^{-4} (•), 2×10^{-4} (•), 3×10^{-4} (•) e $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (•) em pH 7,0 após uma hora e espectro de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de <i>p</i> -nitrofenol (•).	52
Figura 34 - Efeito da interação entre paraoxon ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com 1×10^{-4} (•), 2×10^{-4} (•), $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (•) do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico em pH 8,0 após uma hora.	53

Figura 35 - A) Monitoramento da hidrólise espontânea de 5×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon em pH 11,0 por 6,0 h. B) Espectros de absorção referentes à reação entre de 3×10^{-3} mol L ⁻¹ de ácido [4-(1 <i>E</i>)etanohidrazonoil]benzóico e de paraoxon em pH 11,0 por 6,0 h. ...	54
Figura 36 - A) Efeito da concentração de 2-PAM a) $7,0 \times 10^{-4}$, b) $1,0 \times 10^{-3}$, c) $1,5 \times 10^{-3}$, d) $2,0 \times 10^{-3}$, e) $3,0 \times 10^{-3}$, f) $4,0 \times 10^{-3}$, g) $5,0 \times 10^{-3}$, h) $6,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ mol L ⁻¹ , mantendo a concentração de ATCh e DTNB fixa em 5×10^{-4} mol L ⁻¹ , em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [2\text{-PAM}]$	55
Figura 37 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , mantendo-se constante a concentração de 2-PAM em 6×10^{-3} mol L ⁻¹ , em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$	57
Figura 38 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$ e h) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; mantendo-se a concentração de ácido [4-(1 <i>E</i>)etanohidrazonoil]benzóico fixa em 6×10^{-3} mol L ⁻¹ , em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$	58
Figura 39 - A) Efeito da interação entre 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de 2-PAM e 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de paraoxon monitorada por 3 h em tampão MES pH 8,5. B) Efeito da interação entre 5×10^{-4} mol L ⁻¹ de 2-PAM e 5×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon, na presença de CTAB 5×10^{-4} mol L ⁻¹ monitorada por 3 h em tampão fosfato pH 9,0.	59
Figura 40 - A) Espectros de RMN de ¹ H da A) PAA e do B) PHA em D ₂ O.	61
Figura 41 - Espectros de RMN de ¹³ C da A) PAA e do B) PHA em D ₂ O.	62
Figura 42 - A) Curvas de titulação da PAA e do PHA. B) Gráfico da primeira derivada da curva de titulação do PHA.	63
Figura 43 - Espectros de absorção referentes à reação entre 0,013 mol L ⁻¹ de PHA e 1×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon monitorada a cada 10 min por 24 h em tampão Tris A) pH 8,0 e B) pH 9,0.	65
Figura 44 - A) Monitoramento da reação entre 0,013 mol L ⁻¹ de PHA e 1×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon por 2 h em tampão Borax pH 10,0. B) Fotografia referente à reação do PHA e paraoxon. A cubeta da esquerda representa a reação no tempo zero; e a da direita, a reação após duas horas.	66
Figura 45 - Efeito da interação entre (—) 0,013 mol L ⁻¹ de PAA e 1×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon; (—) 0,013 mol L ⁻¹ de PHA e 1×10^{-5} mol L ⁻¹ de paraoxon e da (—) hidrólise espontânea de 1×10^{-5} mol L ⁻¹ paraoxon após 2 h em tampão borato pH 10,0.	67
Figura 46 - Monitoramento da catálise da hidrólise de 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de acetiltiocolina por 0,013 mol L ⁻¹ de polímero PHA em tampão Tris pH 8,0 monitorado por 90 min. Espectros obtidos a cada 10 min.	68
Figura 47 - A) Efeito da concentração do polímero PHA a) $6,0 \times 10^{-4}$, b) $7,0 \times 10^{-4}$, c) $1,0 \times 10^{-3}$, d) $1,5 \times 10^{-3}$, e) $2,0 \times 10^{-3}$, f) $3,0 \times 10^{-3}$, g) $4,0 \times 10^{-3}$, h) $5,0 \times 10^{-3}$, i) $6,0 \times 10^{-3}$, j) $7,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ ; mantendo-se a concentração de ATCh fixa em 5×10^{-4} mol L ⁻¹ em pH 7,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [PHA]$	69

Figura 48 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ e i) $6,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; mantendo-se a concentração fixa de PHA de 6×10^{-3} mol L ⁻¹ em tampão Tris pH 7,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$	70
Figura 49 - A) Efeito da concentração do polímero PHA a) $6,0 \times 10^{-4}$, b) $7,0 \times 10^{-4}$, c) $1,0 \times 10^{-3}$, d) $1,5 \times 10^{-3}$, e) $2,0 \times 10^{-3}$, f) $3,0 \times 10^{-3}$, g) $4,0 \times 10^{-3}$, h) $5,0 \times 10^{-3}$, i) $6,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ ; mantendo-se a concentração de ATCh fixa em $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [PHA]$	71
Figura 50 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , mantendo-se a concentração fixa de PHA de 6×10^{-3} mol L ⁻¹ em tampão Tris pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$	73
Figura 51 - Estruturas moleculares obtidas por cálculos computacionais A) acetiltiocolina e B) paraoxon.....	74
Figura 52 - Configurações moleculares do PHA obtidas a partir de cálculos teóricos com ordem decrescente de energia de A para D, sendo D a mais estável.....	75
Figura 53 - Resultados dos cálculos teóricos relacionados à interação entre o PHA de maior e menor energia com a ATCh. As figuras estão dispostas em ordem decrescente de energia sendo A a mais energética e J a de menor energia (mais estável).....	78
Figura 54 - Resultados dos cálculos teóricos relacionados à interação entre o PHA de maior e menor energia com o paraoxon. As figuras estão dispostas em ordem decrescente de energia sendo A a mais energética e I a de menor energia (mais estável).	81
Figura 55 - A) Ligação hidrogênio entre os grupos funcionais amida e éter da PAA e do PEG em água, respectivamente. B) Esquema da interação entre PAA, PEG em água. .	84
Figura 56 - Micrografias obtidas por MEV-FEG com diferentes magnitudes de ampliação A) polímero PHA 2% w/v 400x, B) polímero PHA 2% w/v 800x, C) polímero mPEG 2% w/v 400x, D) polímero mPEG 2% w/v 800x, E) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 400x, F) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 800x, G) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 2000x, e H) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 3200x.	85
Figura 57 - Espectros de RMN de ¹ H do PHA, mPEG e da blenda mPEG/PHA em D ₂ O.	87
Figura 58 - Espectros de RMN de ¹³ C do PHA, mPEG e da blenda mPEG/PHA em D ₂ O.	88
Figura 59 - Micrografias obtidas por MEV-FEG da superfície do eletrodo SPE não modificado e do SPE modificado com diferentes magnitudes de ampliação. A) SPE 200x, B) SPE 400x, C) SPE/PHA 200x, D) SPE/PHA 800 x, E) SPE/mPEG 200 x, F) SPE/mPEG 800 x, G) SPE/ mPEG/PHA 200 x, e H) SPE/mPEG/PHA 800 x.....	90

Figura 60 - Em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5,0 mmol L ⁻¹ do par redox [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} foram obtidos os A) Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo sem modificação SPE e ao eletrodo SPE/mPEG/PHA, a 50 mV s ⁻¹ . B) Diagramas de Nyquist para o eletrodo SPE não-modificado e o SPE/mPEG/PHA, realizados em regime OCP, com faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV de amplitude. Inserção: Circuito de Randles utilizado como modelo.....	92
Figura 61 - Fotografias relacionadas ao eletrodo impresso SPE modificado com mPEG/PHA: A) superfície contendo 50 µL de eletrólito suporte e B) conector utilizado para acoplamento ao potenciostato.....	93
Figura 62 - Voltamogramas de pulso diferencial de 4,0 mmol L ⁻¹ de ATCh em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 8,0 após 0 min (linha pontilhada) e 20 min (linha sólida) de incubação com o substrato para o eletrodo não modificado SPE (vermelho) e o eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA (azul).....	94
Figura 63 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em (a) tampão BR 0,1 mmol L ⁻¹ pH 8,0 em diferentes tempos (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 20 min, (e) 30 min e (f) 40 min para diferentes concentrações de ATCh: A) 1,0 ; B) 2,0 ; C) 4,0; D) 5,0; E) 6,0; F) 8,0; e G) 10,0 mmol L ⁻¹	96
Figura 64 - A) Cronoamperogramas relacionados com o aumento da concentração de ATCh no intervalo de 1,0 a 10,0 mmol L ⁻¹ em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 8,0; potencial aplicado de 0,5 V por 60 s. B) Curva analítica relacionada ao aumento da corrente com o aumento da concentração de ATCh empregando o eletrodo SPE/mPEG/PHA.	98
Figura 65 - A) Resposta cronoamperométrica do eletrodo SPE/mPEG/PHA polarizado em 0,5 V em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 8,0 contendo 8,0 mmol L ⁻¹ de ATCh (curva preta), e após a incubação com diferentes concentrações de paraoxon, 1,0 a 10,0 µmol L ⁻¹ . Inserção: Ampliação da região entre 35 e 70 s. B) Curva de calibração relacionada à diminuição da corrente com o aumento da concentração de o paraoxon	99
Figura 66 - Resposta amperométrica de recuperação das amostras de água de abastecimento fortificadas com concentrações conhecidas de paraoxon (1) 3,0 µmol L ⁻¹ , (2) 6,0 µmol L ⁻¹ e (3) 8,0 µmol L ⁻¹ em 8,0 mmol L ⁻¹ de ATCh em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 8,0.....	101
Figura A1 - Espectros no infravermelho do ácido 4-acetilbenzóico (•) e do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil] benzóico (•).	116
Figura A2 - Ampliação da região do espectro no infravermelho do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico (•) para verificar a banda do grupo hidrazona em 1628 cm ⁻¹	117
Figura A3 - Espectro de RMN ¹ H do ácido 4-acetilbenzóico em CDCl ₃	118
Figura A4 - Espectro de RMN ¹ H do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico em CDCl ₃	119
Figura A5 - Espectro de RMN ¹³ C do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico em D ₂ O.	120

Figura A6 - Espectro de massas do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico. 120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1 <i>E</i>)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com sua concentração em pH 7,0	47
Tabela 2 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1 <i>E</i>)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com a concentração de ATCh em pH 7,0.....	48
Tabela 3 - Velocidade da reação catalisada por 2-PAM e a relação com sua concentração em pH 8,0	56
Tabela 4 - Velocidade da reação catalisada por 2-PAM e a relação com a concentração de ATCh em pH 8,0.....	57
Tabela 5 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1 <i>E</i>)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com a concentração de ATCh em pH8,0.....	58
Tabela 6 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração em pH 7,0	69
Tabela 7 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com a concentração de ATCh em pH 7,0	70
Tabela 8 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração em pH 8,0	72
Tabela 9 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração de ATCh pH 8,0	73
Tabela 10 - Valores de energia obtidos para as diferentes estruturas conformacionais do polímero PHA mostrados na Figura 52	76
Tabela 11 - Valores de energia em ordem decrescente obtidas para as diferentes configurações relacionadas com a aproximação do PHA com a ATCh.....	79
Tabela 12 - Valores de energia obtidas para as diferentes configurações relacionadas com a aproximação do PHA com o paraxon	82
Tabela 13 – Dados obtidos a partir dos diagramas de Nyquist da Figura 60B	93
Tabela 14 – Comparação entre os parâmetros analíticos do eletrodo SPE/mPEG/PHA e outros descritos na literatura.....	98
Tabela A1 - Grupos característicos do precursor ácido 4-acetilbenzóico e do ácido [4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil]benzóico	116

LISTA DE ABREVIACÕES

2-PAM:	iodeto de pralidoxima
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterase
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCh:	Acetiltiocolina
BuChE:	Butirilcolinesterase
CBs:	Carbamatos
ChE:	Colinesterase
CPE:	Capacitância da dupla camada
CTAB:	Brometo de cetiltrimetilamônio
DFT-PBE:	Teoria do funcional da densidade utilizando a aproximação do gradiente generalizado, formulado por Perdew, Burke, Ernzerhof
DTNB:	5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
EA:	Eletrodo auxiliar
EDCs:	Disruptores endócrinos
EIE:	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E _p :	Potencial de pico
ER:	Eletrodo de referência
ET:	Eletrodo de trabalho
FeTPyPz:	Tetrapiridinoporfirazina de ferro
FTIR:	Infravermelho com transformada de Fourier
GC-MS:	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC-MS:	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
HRMS (ESI):	Espectrometria de massas
LMR:	Limites Máximos de Resíduos
LOD:	Limite de detecção
MEV-FEG:	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo
M _n :	Massa molar numérica média
mPEG:	Polietileno glicol metil éter
M _w :	Massa molar ponderal média
OCP:	Potencial de circuito aberto
OPAA:	Hidrolase ácida organofosforada

OPH: Hidrolase organofosforada

OPs: Organofosforados

PAA: Poliacrilamida

PARA: Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PET: Polietileno tereftalato

PH: Paration-hidrolase

PHA: polihidroxamicalcanoato

POPs: Poluentes orgânicos persistentes

QqTOF: Híbrido quadrupolo/tempo de voo

RMN: Ressonância magnética nuclear

R_s : Resistência da solução

R_{tc} : Resistência à transferência de carga

SPE: Eletrodo impresso descartável

Tampão BR: Tampão Britton-Robinson

Tampão MES: Tampão Ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfônico),

Tampão Tris: Tampão Tris(hidroximetil)aminometano

TCh: Tiocolina

VPD: Voltametria de Pulso Diferencial

Z_w : Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos	1
1.2 Biossensores	4
1.2.1 Biossensores Eletroquímicos	5
1.2.2 Transdutores eletroquímicos	7
1.3 Biossensores enzimáticos para detecção de OPs e CBs	8
1.3.1 Biossensores enzimáticos baseados na detecção direta de OPs	8
1.3.2 Biossensores baseados na inibição enzimática para detecção indireta de pesticidas OPs e CBs	9
1.4 Limitações dos biossensores baseados em inibição enzimática	14
1.5 Química dos compostos biomiméticos	15
1.5.1 Sensores eletroquímicos miméticos	17
1.5.2 Moléculas miméticas para AChE	18
1.5.3 Hidroxilamina, hidroxamato e oximato como α -nucleófilos em desfosforilação	21
2 Objetivos	26
3 Metodologia experimental	27
3.1 Reagentes e soluções	27
3.2 Instrumentação	28
3.2.1 Medidas espectrofotométricas	28
3.2.2 Instrumentação geral	28
3.3 Síntese do ácido [4-(1E)-etanohidrazonoil]benzóico	29
3.4 Síntese do ciclopropil metil hidrazona e do 3-metil-2-butanona hidrazona	30
3.5 Síntese do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA)	31
3.6 Caracterização do PHA	31
3.7 Avaliação da atividade biomimética das moléculas sintéticas na catálise da hidrólise da acetilticolina (ATCh)	32
3.7.1 Cinética de reação	33
3.8 Modelagem Computacional	34
3.9 Avaliação da interação entre as moléculas biomimética e o paraoxon	34
3.10 Cálculos teóricos	34
3.11 Fabricação dos eletrodos impressos descartáveis de carbono (SPE)	35
3.12 Modificação dos eletrodos SPEs com a molécula biomimética escolhida	36
3.13 Desempenho eletroquímico do sensor biomimético SPE/mPEG/PHA	38
3.14 Medidas eletroquímicas com o pesticida paraoxon	38
4 Resultados e Discussão	40

4.1 Caracterização das hidrazonas	40
4.2 Avaliação do comportamento biomimético do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh).....	44
4.2.1 Análise do desempenho biomimético pelo método espectrofotométrico de Ellman..	45
4.3 Mecanismo catalítico.....	47
4.4 Comparação entre as hidrazonas.....	49
4.5 Interação de molécula mimética genérica com pesticidas organofosforados e carbamatos	51
4.5.1 Ensaios espectrofotométricos para verificação da interação de pesticida organofosforado com o ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.....	51
4.6 Avaliação do comportamento mimético do iodeto de pralidoxima (2-PAM): Análise cinética da hidrólise da acetiltiocolina.....	54
4.7 Estudo espectrofotométrico da interação entre 2-PAM e paraoxon.....	59
4.8 Síntese e caracterização do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA): Nova abordagem de molécula biomimética para AChE.....	60
4.9 Avaliação cinética relacionada ao polímero polihidroxamicalcanoato (PHA) na hidrólise da acetiltiocolina.....	64
4.10 Cálculos Teóricos	73
4.10.1 Cálculos teóricos relacionados com a interação entre o polímero PHA e a ATCh ..	76
4.10.2 Cálculos teóricos relacionados com a interação entre o polímero PHA e o paraoxon	79
4.11 Imobilização da molécula biomimética na superfície do eletrodo impresso descartável (SPE)	83
4.12 Caracterização do eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA pelas técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica	91
4.13 Desempenho eletroquímico do sensor biomimético SPE/mPEG/PHA	93
4.14 Aplicação do eletrodo SPE/mPEG/PHA na detecção do pesticida organofosforado paraoxon por método amperométrico	99
4.15 Ensaios de recuperação.....	100
5 Conclusões.....	102
6 Perspectivas	104
Referências	105
Apêndice A.....	115
A.1. Caracterização do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico	115
A.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	115
A.1.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	117
A.1.3 Espectrometria de massas (HRMS (ESI))	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos

Nos últimos anos, a crescente sensibilização para o risco associado ao uso intensivo de agrotóxicos tem resultado em uma atitude muito mais crítica em relação à sua aplicação. No entanto, os pesticidas continuarão a desempenhar um papel importante no combate às doenças de plantas e no manejo de pragas, visando garantir a produtividade agrícola.¹ Os pesticidas são frequentemente muito persistentes no ambiente, geralmente com um tempo de meia vida de décadas, além de serem transportados por longas distâncias por fatores como a chuva e o vento, ocasionando a contaminação de solos e sistemas aquáticos. Por isso, para minimizar os riscos ao meio ambiente, seu uso deve ser otimizado e monitorado, considerando a segurança para os produtores e os consumidores, bem como o impacto ambiental.

Os pesticidas têm sido classificados em diferentes categorias, considerando o tipo de alvo (inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc) e sua classe química (organoclorados, carbamatos, piretróides, etc.). Durante os anos 1960 e 1970, muitos países baniram ou restringiram o uso dos organoclorados, como o DDT, devido ao seu efeito bioacumulativo na cadeia alimentar e sua longa persistência no ambiente (3-20 anos).² Com isso, houve a necessidade de desenvolver novos compostos eficazes no controle de pragas, como os organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs), que foram introduzidos por não apresentarem efeito bioacumulativo e por serem biodegradáveis.³ Na presente tese, serão enfatizados apenas os OPs.

Os OPs foram desenvolvidos na década de 1940 com objetivo de serem utilizados como armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial. Os OPs são, essencialmente, compostos derivados de ésteres de ácido fosfórico. Todos os OPs possuem um átomo de fósforo com uma ligação fosforil (P=O) ou tiofosfonil (P=S).⁴ A Figura 1 representa a estrutura geral dos pesticidas OPs. O grupo L é denominado grupo de saída (*leaving group*), que é o mais reativo e o mais variável dentre os tipos de OPs. O termo grupo de saída vem do fato de que o substituinte é deslocado quando o OP sofre um ataque nucleofílico, além de ser o grupo mais susceptível à hidrólise. R₁ e R₂ são os grupos menos reativos; e geralmente são grupos alcóxi, ou ainda alquil, aril, etc. O grupo X pode ser tanto oxigênio, como enxofre.

Figura 1 - Estrutura geral dos pesticidas OPs.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de SANTOS, V. M. R. D., 2007, p. 164.⁵

Os inseticidas OPs quando armazenados em condições adequadas são estáveis. No entanto, quando expostos ao calor, luz e/ou água podem ser decompostos. As principais reações envolvendo o átomo de fósforo são a hidrólise e oxidação. Algumas considerações gerais podem ser feitas em relação à hidrólise: 1) compostos contendo P=O hidrolisam mais rapidamente do que aqueles contendo P=S; 2) a clivagem ocorre entre o átomo de fósforo e o grupo de saída; 3) a velocidade de hidrólise diminui com o aumento do tamanho dos substituintes alquil.⁶

A toxicidade aguda dos inseticidas OPs é maior que a dos organoclorados, entretanto os OPs são menos persistentes no meio ambiente, ou seja, sofrem degradação mais rápida e, conseqüentemente, é necessário um número maior de aplicações, nas lavouras, para se obter a mesma eficácia que a dos organoclorados. Os inseticidas malation, paration e clorpirifós são alguns exemplos de compostos organofosforados.⁵

O uso crescente de agrotóxicos no setor agrícola e a decorrente presença de resíduos acima dos níveis permitidos nos alimentos tem provocado apreensão no domínio da saúde pública, o que demanda a implementação de normas de controle em relação à utilização de tais compostos.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criado para avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins. Deste modo, o programa verifica se os alimentos apresentam os níveis de acordo com Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos para cada agrotóxico.

De acordo com o relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012 vinculados ao PARA, 75% dos resultados das amostras monitoradas foram considerados satisfatórios, sendo que em 33% não foram encontrados resíduos e 42% apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR.⁷ Das amostras analisadas, 25% dos resultados foram considerados

insatisfatórios devido à presença de produtos não autorizados; ou autorizados, mas em concentrações acima do LMR.

A Figura 2 exibe o número de amostras insatisfatórias devido à presença de inseticida de alta toxicidade do grupo dos organofosforados e um número significativo associado à detecção de fungicida, como os ditiocarbamatos (tiram, propinebe, etc) e os benzimidazóis, especificamente o carbendazim, que pertence ao grupo dos CBs.

Os dados apresentados acima enfatizam a importância do controle e monitoramento dos níveis de pesticidas nos alimentos, bem como na água; considerando que a exposição ao consumo indevido de agrotóxicos pode resultar em intoxicações agudas ou crônicas. Como observado, o maior número de amostras insatisfatórias é relacionado à presença de pesticidas OPs, de alta toxicidade.

Os métodos analíticos padrão utilizados pela ANVISA consistem, basicamente, em técnicas cromatográficas ou procedimentos cromatográficos acoplados ao espectrômetro de massas (GC-MS ou HPLC-MS). Tais métodos convencionais são sensíveis e precisos; todavia, apresentam custo elevado, geralmente envolvem diversas etapas de pré-tratamento da amostra, não possibilitam detecção *in situ* e em tempo real, além de requererem mão de obra treinada para operação e utilizarem grandes quantidades de solventes orgânicos.⁸ Estas características inconvenientes acabam minimizando o número de análises possíveis, aumentando o custo e expandindo o tempo necessário para os resultados e diminuindo consideravelmente a quantidade de amostras que podem ser monitoradas.

Figura 2 - Principais grupos químicos com uso irregular detectados em amostras insatisfatórias.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014, p. 22.⁷

Uma alternativa promissora às técnicas tradicionais são os biossensores eletroquímicos que oferecem a possibilidade de análise de campo e em tempo real, resposta rápida, baixo custo, manipulação simplificada, além de eliminar o consumo de solventes orgânicos.⁹

1.2 Biossensores

De acordo com a IUPAC, um sensor químico é definido como um dispositivo que transforma informação química em sinal analítico. São constituídos, basicamente, por dois componentes principais conectados: um sistema de reconhecimento químico e um transdutor físico-químico. Os biossensores, especificamente, são sensores químicos que utilizam um sistema de reconhecimento baseado em um processo biológico, que traduz a informação do domínio bioquímico em um sinal químico ou físico mensurável. A função principal do sistema de reconhecimento é fornecer ao sensor um grau de seletividade elevado para que o analito seja identificado e quantificado, mesmo dentro de amostras com matrizes complexas.¹⁰

Os componentes biológicos mais usuais em biossensores são apresentados na Figura 3, que esquematiza os componentes de um biossensor típico: a) biorreceptores (enzima, DNA, aptâmero, anticorpo, etc) que interagem especificamente com o analito, tais como metais pesados, poluentes orgânicos persistentes (POPs), interferentes endócrinos (EDCs), e vírus; b) uma interface cujo evento biológico específico ocorre, originando um sinal que captado por um c) elemento transdutor, é convertido a um sinal eletrônico e depois, amplificado por um circuito de detectores, posteriormente enviado para processamento em um d) software de computador para ser convertido em uma resposta significativa.

Figura 3- Esquema de um biossensor baseado nas diferentes categorias de analito, elemento de biorreconhecimento e transdutor.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de LONG, F., 2013, p. 13929.¹¹

1.2.1 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos integrados capazes de fornecer um sinal eletroanalítico (corrente, potencial ou carga elétrica), quantitativo ou semi-quantitativo, utilizando um elemento biológico de reconhecimento que está em contato direto com o elemento de transdução.¹⁰

Os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em duas classes considerando o processo de reconhecimento biológico, ou seja, dispositivos biocatalíticos e sensores de afinidade.¹² Os biossensores biocatalíticos incorporam enzimas, células, tecidos que reconhecem o alvo, reagem e produzem espécies eletroativas. Destacam-se os enzimáticos, utilizados na detecção de glicose,¹³ lactato,¹⁴ pesticidas,¹⁵ etc. Os sensores de afinidade baseiam-se em sinais obtidos da interação entre o analito e o componente biológico, tais como anticorpos, ácido nucléico, etc.

Os biossensores são tema de um dos campos interdisciplinares de maior atividade de pesquisa em Química Analítica. A utilização de biossensores eletroquímicos pode eliminar, reduzir ou ainda simplificar o pré-tratamento da amostra. O desempenho de tal sensor é geralmente avaliado baseando-se em sua sensibilidade, limite de detecção (LOD), intervalo linear, reprodutibilidade, seletividade e resposta em relação aos interferentes. Há ainda outros parâmetros que são frequentemente incluídos para fins comparativos relacionados à resposta do sensor, como tempo de resposta após

a adição do analito, estabilidade operacional e de armazenamento, e portabilidade. Diversas aplicações, como as clínicas, ambientais, em alimentos, etc.; se baseiam na capacidade do sensor em executar análises em tempo real.

Para desenvolver um biossensor eficaz e robusto para manipulação pelo público não especialista é necessário satisfazer alguns requisitos:¹⁶

1. O elemento biológico deve ser altamente específico para os fins analíticos, ser estável para armazenamento e exibir pequena variação entre as medidas.
2. A reação deve ser independente de parâmetros como pH, agitação e temperatura; eliminando a etapa de pré-tratamento da amostra.
3. A resposta deve ser precisa, reprodutível e linear em relação ao intervalo de concentração de interesse, sem necessidade de diluição ou pré-concentração.
4. O biossensor deve fornecer meios para análise em tempo real.
5. O dispositivo completo deve ser barato, portátil e capaz de ser manipulado por operadores não qualificados.

1.2.1.1 Sensores biocatalíticos

Diversos tipos de elementos de biorreconhecimento têm sido utilizados em dispositivos de biossensoriamento. Os biossensores eletroquímicos têm empregado, majoritariamente, as enzimas em virtude de sua atividade biocatalítica elevada e sua especificidade. As enzimas aumentam significativamente a velocidade de determinada reação. Em virtude da sua estrutura conformacional complexa, as enzimas possuem excelente especificidade em relação ao seu substrato, podendo identificar substâncias individuais em matrizes complexas, como urina e sangue; eliminando a necessidade da etapa de pré-tratamento. Vários analitos bioquímicos de interesse não podem ser detectados por sensores enzimáticos, devido à falta de enzimas seletivas disponíveis, o que torna os biossensores de afinidade um método alternativo.

1.2.1.2 Biossensores de afinidade

Os biossensores de afinidade utilizam biomoléculas seletivas, tais como anticorpos e oligonucleotídeos, que se ligam fortemente ao analito alvo para produzir um sinal elétrico mensurável. O reconhecimento nos sensores de afinidade é determinado pela forma e tamanho complementares do sítio de ligação do analito de

interesse. A afinidade e especificidade da biomolécula em relação ao seu ligante é o que torna o sensor sensível e seletivo.

1.2.2 Transdutores eletroquímicos

A maioria dos biossensores tem sido desenvolvido utilizando transdutores eletroquímicos, devido ao baixo custo, sensibilidade elevada, portabilidade e simplicidade associados. Estes se baseiam no fato de que durante um processo de bio-interação, espécies eletroativas são consumidas ou geradas resultando em um sinal eletroquímico que é medido por um detector eletroquímico. Tipicamente, a reação sob investigação deve: a) gerar uma corrente mensurável (biossensores amperométricos); b) um potencial ou acúmulo de carga (biossensores potenciométricos); c) alterar as propriedades condutoras do meio entre os eletrodos (biossensores condutimétricos).¹⁷

Biossensores amperométricos são baseados na medida de corrente resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas relacionadas com as reações bioquímicas, enquanto um potencial constante é mantido no eletrodo de trabalho em relação ao de referência. A corrente resultante é diretamente correlacionada com a concentração da espécie eletroativa no meio.^{10; 12} Os biossensores amperométricos podem ser separados em três principais grupos:^{18; 19}

- a) Primeira geração: sensores baseados na medida da concentração de substratos naturais ou produtos da reação enzimática (H_2O_2 , NADH); ou no monitoramento do consumo do cofator, como o oxigênio. No curso da reação, alguns produtos são gerados e a concentração de substrato diminui, o que pode ser medida diretamente. As desvantagens desse sistema consistem no valor elevado de potencial aplicado, o que o torna sensível à interferência de outros componentes da matriz.
- b) Segunda geração: sensores que utilizam mediadores como carreadores de elétrons do sítio ativo da enzima para o eletrodo. Exemplos de carregadores de elétrons são o azul da Prússia e o ferroceno. O uso de mediadores torna possível a diminuição do potencial aplicado.
- c) Terceira geração: sensores que utilizam transferência eletrônica direta entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo. A transferência eletrônica é associada com, ou ocorre durante, a transformação catalítica do substrato em produto. A enzima redox (oxirredutase) atua como um eletrocatalisador,

facilitando a transferência eletrônica entre o eletrodo e o substrato, sem a necessidade de mediador.

Biossensores potenciométricos: medem o acúmulo de potencial de carga no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, quando corrente nula ou não significativa flui entre eles. Em outras palavras, a potenciometria fornece informação sobre a atividade iônica na reação eletroquímica, cujo potencial medido é proporcional ao logaritmo da concentração do analito.

Biossensores condutimétricos: monitoram as mudanças na condutividade elétrica de uma solução ou meio, quando a composição da solução/meio se altera no curso da reação química.

1.3 Biossensores enzimáticos para detecção de OPs e CBs

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos enzimáticos, para determinação de pesticidas OPs e CBs tem sido uma área de pesquisa ativa em resposta à demanda por técnicas de baixo custo seletivas, simples, rápidas, que permitam análise em tempo real e *in situ*; e que possam ser manipuladas por pessoas não treinadas. O aumento do consumo de pesticidas aplicado em diversos setores tem motivado o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos àqueles tradicionais utilizados em tal análise, como HPLC-MS, GC-MS, etc.

1.3.1 Biossensores enzimáticos baseados na detecção direta de OPs

Várias enzimas diferentes têm sido utilizadas na fabricação de biossensores eletroquímicos para detecção seletiva e direta de OPs, tais como a hidrolase organofosforada (fosfo-triesterase) (OPH), hidrolase ácida organofosforada (OPAA) e paration-hidrolase (PH).

A OPH foi descoberta em alguns tipos de bactérias do solo, como *Pseudomonas diminuta* e *Flavobacterium spp.* Tal enzima é altamente seletiva, sendo capaz de hidrolisar um grande número de OPs, tais como paration, paraoxon, fenitroton, etc. A OPH catalisa a hidrólise de compostos OPs liberando dois prótons, como resultado da clivagem das ligações P-O, P-F, P-S e P-CN (Figura 4).²⁰ A reação pode ser monitorada eletroquimicamente pela detecção dos prótons liberados; e espectrofotometricamente, pelo monitoramento de um produto cromóforo, como *p*-nitrofenol. Diante disso, o

analito pode ser diretamente determinado de acordo com a taxa de formação de produto que é diretamente proporcional à concentração do analito.²⁰ No entanto, tal enzima não está disponível comercialmente, e sua purificação demanda alto custo, além de seu curto tempo de meia vida; o que inviabiliza sua aplicação em tais dispositivos. As mesmas desvantagens estão associadas com as outras enzimas, OPAA e PH.

Figura 4 - Esquema da reação de hidrólise de OP catalisada pela OPH. R1 é um grupo alcóxi e R2 é um grupo alcóxi ou fenil e Z é um grupo fenóxi, tiol, cianeto ou fluoreto.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de MULCHANDANI, A., 2001, p. 226.²⁰

1.3.2 Biossensores baseados na inibição enzimática para detecção indireta de pesticidas OPs e CBs

Os biossensores que utilizam enzimas colinesterases (ChEs) surgiram como um método simples e rápido para a detecção de pesticidas e estão entre os mais empregados na literatura.^{21; 22; 23; 24; 25} A facilidade de obtenção das enzimas colinesterases comercialmente é um grande atrativo para a construção destes arranjos de sensores.

As ChEs são importantes enzimas presentes nos vertebrados e nos insetos, responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central, controlando impulsos e transmissões de estímulos nervosos.⁸ Dois tipos de ChEs têm sido utilizados na fabricação de biossensores: acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)(AChE) e butirilcolinesterases (EC 3.1.1.8)(BuChE).

A AChE hidrolisa preferencialmente acetil-ésteres, como a acetilcolina (ACh) (Figura 5). Já a BuChE, que possui estrutura molecular similar a AChE, hidrolisa a butirilcolina (Figura 5), assim como a ACh, porém com menor eficiência que a AChE.⁸

Figura 5 - Reações de hidrólise dos substratos enzimáticos acetilcolina e butirilcolina, catalisadas pelas enzimas AChE e BuChE, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Além do substrato natural ACh, a AChE pode hidrolisar análogos, como a acetiltiocolina (ATCh), butiriltiocolina, propioniltiocolina, α -naftil acetato, entre outros. Tais substratos sintéticos têm sido muito utilizados em diferentes configurações de biossensores, como a ATCh no caso dos amperométricos.

As enzimas ChEs agem como um elemento de biorreconhecimento sensível à presença dos pesticidas OPs e CBs, que são os principais inibidores de sua atividade enzimática. Portanto, a detecção enzimática destes pesticidas é baseada na inibição da atividade das enzimas ChEs. No entanto, outros compostos também podem inibi-las, como metais pesados, fluoreto, nicotina.²⁶ Apesar da falta de seletividade, os biossensores baseados nas enzimas ChEs despertam muito interesse, devido à resposta rápida, simplicidade, portabilidade, possibilidade de análise *in situ* e em tempo real, além da necessidade mínima de tratamento de amostra.

O monitoramento da concentração de analito é baseado no 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 um tempo de incubação pré-determinado e a porcentagem de inibição da atividade enzimática está quantitativamente relacionada com a concentração do agente inibidor.²⁷

Dentro da classe dos OPs existem os inibidores diretos (moléculas que possuem o grupo funcional =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 paration, malation, clorpirifós; que se tornam mais tóxicos quando sofrem o processo de dessulfuração oxidativa, ou seja, a troca do enxofre pelo

oxigênio, que resulta na formação dos oxons. Por exemplo, o paration transforma-se em paraoxon.²⁸

Na ausência de pesticidas, o mecanismo de hidrólise catalisado pela AChE depende da adição de um resíduo de serina à carbonila do substrato ACh (Figura 6).

Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da ACh catalisado pela AChE.

Sítio ativo da AChE

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de SANTOS, V. M. R. D., 2007, p. 166.⁵

Os OPs, geralmente, inibem a AChE irreversivelmente, já que ocorre uma ligação covalente no sítio ativo da enzima (Figura 7). O resíduo de serina é prontamente fosforilado. Ao contrário da enzima acetilada, a fosforilada reage lentamente com a água, o que permite a desalquilação do substituinte alcoxila 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.^{5; 29}

Figura 7 - Mecanismo clássico da inibição da AChE por OPs.

Sítio ativo da AChE

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de SANTOS, V. M. R. D., 2007, p. 166.⁵

1.3.2.1 Biossensores amperométricos baseados na inibição da AChE

Como descrito anteriormente, vários tipos de biossensores baseados na inibição da AChE têm sido desenvolvidos para a detecção de pesticidas OPs e CBs. O método de detecção mais empregado é o amperométrico, que é baseado em duas estratégias: (i) o uso do substrato natural ACh com uma segunda enzima, a colina oxidase, sendo a detecção baseada no peróxido gerado ou no oxigênio consumido, e (II) uso do pseudosubstrato, acetiltiocolina (ATCh), cuja detecção é baseada na oxidação do produto eletroativo tiocolina (TCh).³⁰ O substrato natural ACh não pode ser utilizado sozinho, pois não gera um produto eletroativo, por este motivo é substituído pela ATCh, que contém um enxofre no lugar do oxigênio da ACh (Figura 8).

Figura 8 - Fórmula estrutural do cloreto de acetiltiocolina (ATCh).

Fonte: Autoria própria.

Como os biossensores devem ser dispositivos analíticos simples e de baixo custo, o monoenzimático é preferível em relação ao bienzimático (como o que utiliza a colina oxidase). A Figura 9 esquematiza o funcionamento do biossensor amperométrico monoenzimático que utiliza apenas a AChE, representada em laranja. O pseudosubstrato ATCh interage com a AChE, produzindo TCh, que é oxidada na superfície do eletrodo. A reação de oxidação gera um dímero e dois elétrons. A corrente elétrica monitorada está relacionada com a atividade enzimática. A próxima etapa consiste na inibição da atividade da AChE pela presença de pesticidas, a partir do tempo de incubação pré-determinado. Agora, a atividade enzimática foi parcialmente inibida, já que houve a formação do complexo enzima-inibidor. Na última etapa, a determinação da atividade residual é realizada. A mesma concentração de ATCh é adicionada ao sistema e a corrente elétrica é novamente monitorada; observando-se uma diminuição em sua magnitude. A porcentagem de diminuição da corrente está relacionada com a concentração de inibidor, ou seja, de pesticidas OPs e CBs.

Figura 9 - Esquema de um biossensor amperométrico monoenzimático baseado na enzima AChE para detecção de pesticidas OPs e CBs.

Fonte: Autoria própria.

1.4 Limitações dos biossensores baseados em inibição enzimática

Os métodos enzimáticos, particularmente aqueles baseados em processos de inibição da atividade da enzima, têm sido criticados por Luque de Castro e Herrera (2003)³¹ que chamam os sistemas de biossensoriamento relacionados à detecção de pesticidas de “dispositivos analíticos questionáveis”. As críticas consistem na falta de seletividade de tais biossensores, já que a atividade enzimática pode ser inibida por uma ampla variedade de espécies, como metais pesados e compostos orgânicos e inorgânicos, diferentes do analito alvo. Eles acreditam que este argumento é corroborado pelo número considerável de publicações que envolvem a determinação da espécie de interesse, principalmente pesticidas, em água deionizada, enquanto que aqueles correspondentes às aplicações em amostras reais são reduzidos.

Os métodos baseados na inibição enzimática possuem algumas desvantagens e podem levar a falsos positivos que estão associados ao armazenamento e manipulação da enzima, que pode ter sua atividade reduzida. Além disso, muitos pesticidas inibem irreversivelmente uma enzima, como a AChE e, portanto, a etapa de regeneração do sensor é necessária, o que aumenta o tempo da análise. A etapa de regeneração envolve o uso de reagentes específicos que são utilizados no caso de envenenamento por pesticidas, como a pralidoxima e a obidoxima.^{32; 33} Outro fator que inviabiliza a

utilização dos biossensores que utilizam as colinesterases é o custo elevado dessas enzimas.

Uma alternativa aos biossensores enzimáticos é a substituição da enzima por moléculas artificiais que mimetizem o funcionamento das enzimas nas reações desempenhadas por elas. As moléculas biomiméticas permitem o melhoramento das propriedades enzimáticas, tornando possíveis aplicações que não seriam possíveis com o composto natural. Tal possibilidade pode diminuir os custos associados, além de eliminar restrições de aplicação, como temperatura e pH.

1.5 Química dos compostos biomiméticos

As enzimas são catalisadores muito eficientes que funcionam em condições amenas, normalmente em pH próximo de 7,0 e temperatura próxima a ambiente ou do corpo humano. O uso industrial de enzimas é generalizado e crescente, bem como as aplicações médicas que têm se tornado extremamente importantes, que incluem os testes de diagnóstico.

Apesar das inúmeras qualidades, os materiais biológicos apresentam certas desvantagens quando fora de seus organismos de origem, o que pode levar à desnaturação, inviabilizando sua aplicação.³⁴ Além disso, apresentam custo elevado, difícil obtenção relacionada ao processo de extração e purificação, condições limitadas de manipulação, como pH, temperatura e uso de solventes orgânicos. No entanto, é sem dúvida a baixa estabilidade de tais componentes que motiva a busca por materiais alternativos, que possam desempenhar o papel das espécies biológicas de modo eficaz permitindo aplicação em diversos campos, como em sensores.³⁵

Uma alternativa muito interessante ao uso de enzimas está relacionada com a síntese de enzimas artificiais, ou seja, 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.

A área da química orgânica que tem como objetivo imitar reações naturais e processos enzimáticos foi denominada “química biomimética” por Ronald Breslow (1972).^{36; 37} A química biomimética engloba uma ampla gama de tópicos, que incluem a

síntese e estudo de enzimas artificiais, auto-organização de moléculas pequenas de modo similar à organização em sistemas biológicos, etc. A catálise biomimética se refere à catálise química que imita certas características de sistemas enzimáticos.³⁸ Moléculas como macrociclos orgânicos e polímeros criam um ambiente supramolecular que difere do ambiente exterior (*bulk*), assim como fazem as enzimas. Tais moléculas sintéticas incluem polímeros, ciclodextrinas, ciclofanos, calixarenos, cucurbituril, macrociclos com centros metálicos, etc (Figura 10).

Figura 10 - Diversas moléculas artificiais utilizadas como modelos miméticos para enzimas.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de DONG, Z., 2012, p. 7892.³⁹

O desenvolvimento de enzimas artificiais é baseado nas várias características que facilitam a catálise, como (1) afinidade entre enzima-substrato e a (2) aceleração da velocidade de reação significativa em relação a não catalisada.³⁸

A afinidade de ligação enzima-substrato resulta do sítio ativo otimizado da enzima, que é complementar à forma e distribuição de carga do substrato alvo. Tais interações complementares devem estar presentes nas moléculas miméticas para que o substrato possa interagir com a enzima artificial. A aceleração da velocidade da reação catalisada por moléculas sintéticas nem sempre é tão elevada quanto àquela promovida por enzimas, já que obter a mesma especificidade que a enzimática é um desafio.

Breslow (1972)³⁶ 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. Estudos foram realizados utilizando ciclodextrinas, que apresentam a interessante propriedade de serem solúveis em água, mas possuem ainda uma cavidade hidrofóbica. A avaliação do efeito mimético da α -ciclodextrina foi realizada baseando-se na reação de cloração do anisol. Os resultados indicaram que o

anisol se torna mais reativo dentro da cavidade da ciclodextrina em comparação à parte exterior. No entanto, o ponto mais interessante constatado foi que a α -ciclodextrina catalisou a cloração do anisol de forma mais seletiva que a enzima clorinase. Os resultados evidenciaram o fato de que moléculas mais simples podem desempenhar papéis similares ao das enzimas.

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.⁴⁰ Uma molécula mimética deve proporcionar um tipo de interação equivalente, para a imobilização do mesmo substrato.

1.5.1 Sensores eletroquímicos miméticos

Diversas moléculas miméticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. 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.

A maioria desses sensores aplica complexos metálicos ou macromoléculas orgânicas que mimetizam, principalmente, o comportamento das peroxidases/catalases^{41; 42; 43; 44; 45} e da tirosinase.^{46; 47; 48} No entanto, algumas outras enzimas também inspiraram o desenvolvimento de sensores miméticos, são elas a nitroredutase,⁴⁹ e citocromo P450.⁵⁰

Franzoi *et al.* (2009)⁴² utilizaram o complexo dinuclear $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ldtb})(\mu\text{-OAc})_2]\text{BPh}_4$ como um biomimético da enzima manganês peroxidase. A habilidade de o complexo sintético mimetizar o sítio ativo da manganês-peroxidase catalisando a reação entre a rutina e o peróxido de hidrogênio na superfície do eletrodo modificado foi observada.

O complexo metálico dimérico $[\text{Cu}(\mu_2\text{-hep})(\text{hep-H})]_2 \cdot 2\text{PF}_6$ contendo um ligante bidentado ($\text{hep-H} = 2\text{-(2-hidroxietil)piridina}$) foi sintetizado por Mobin *et al.* (2010)⁴⁷

com objetivo de mimetizar a enzima tirosinase que contém cobre em seu sítio ativo. A detecção de diversos compostos fenólicos, como fenol, resorcinol, hidroquinona e catecol foi realizada com sucesso empregando-se o sensor biomimético proposto.

Sotomayor *et al.* (2008)⁵⁰ sintetizaram o complexo metálico tetrapiridinoporfirazina de ferro (FeTPyPz) para mimetizar o comportamento da enzima citocromo P450. O sensor biomimético foi construído modificando-se a superfície de um eletrodo de carbono vítreo com uma alíquota de uma mistura contendo Nafion[®] e o FeTPyPz. A enzima citocromo P450 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.

1.5.2 Moléculas miméticas para AChE

Os trabalhos mais comuns encontrados na literatura, nos quais moléculas miméticas têm sido propostas para substituir a enzima AChE, 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 hóspede-hospedeiro (*host-guest*) 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, além de seletividade.⁵¹ Os receptores artificiais 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.⁵²

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 miméticos para a AChE com carga negativa nas superfícies aromáticas da cavidade.⁵³

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 hóspede-hospedeiro 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.⁵³

Hof *et al.* (2003)⁵³ propuseram uma molécula mimética para a AChE que não apresentou atividade catalítica, mas apenas estabilidade e afinidade pelo substrato em água (Figura 11A).

Biros *et al.* (2003)⁵² sintetizaram uma molécula mimética para a AChE, que forma complexos hóspede-hospedeiro termodinamicamente e cineticamente estáveis em água. Tal molécula possui uma espécie de “bolsão” para se assemelhar à cavidade do sítio ativo da enzima, com grupos negativos na superfície (Figura 11B). O receptor sintético é capaz de se ligar a importantes alvos biológicos, tais como a colina, entre outros; além de funcionar em condições fisiológicas para aplicação farmacológica.

Figura 11 - A) Molécula mimética da AChE proposta por Hof *et al.* (2003) que não apresenta atividade catalítica.⁵³ B) Molécula mimética proposta por Biros *et al.* (2003) para AChE que apresenta estabilidade em água.⁵²

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de HOF, F., 2003, p.3260⁵³ e BIROS, S. M., 2004, p. 2872.⁵²

No entanto, outro inconveniente é que mesmo quando forma, carga e tamanho são complementares, um substrato que interage fortemente com água ou tampão não abandonará sua solvatação para interagir com a 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 apresentaram atividade catalítica para hidrólise deste substrato. No entanto, alterações na funcionalização da cavidade da espécie poderiam levar a um desempenho catalítico.

Mascini *et al.* (2008)⁵⁴ 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; considerando que a tríade catalítica do sítio ativo da AChE é formada por glutamato, histidina e serina. 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, o His-Glu-Pro-Ser.

Recentemente, Bhattachayay *et al.* (2008)⁵⁵ 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.⁵⁵ Segundo estes autores, esta molécula mimética (Figura 12) foi capaz de interagir com a acetilcolina, através de interações de ligações de hidrogênio e interações cátion – π . Após a imobilização da enzima artificial na superfície do eletrodo, o sensor para acetilcolina forneceu uma resposta potenciométrica, em que o sinal analisado estava relacionado a variações da ordem de milivolts de potencial, o que não pode confirmar a eficiência da molécula mimética proposta para catalisar a hidrólise da ACh.

Figura 12 - Comparação da estrutura da molécula mimética com o substrato acetilcolina.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de BHATTACHAYAY, D., 2008, p. 1392.⁵⁵

Diante das dificuldades encontradas em desenvolver uma enzima artificial adequada para aplicação em biossensores para detecção de pesticidas organofosforados

e carbamatos; além das falhas relacionadas ao procedimento experimental empregado por Bhattachayay *et al.* (2008)⁵⁵, é de grande interesse estudar o comportamento cinético da molécula mimética proposta por eles para avaliar seu desempenho catalítico na hidrólise da ATCh visando à aplicação em sensores amperométricos para detecção de pesticidas.

1.5.3 Hidroxilamina, hidroxamato e oximato como α -nucleófilos em desfosforilação

Hidroxilaminas, oximas e ácidos hidroxâmicos têm encontrado grande utilidade em diversas áreas da química, especialmente em reações de substituição em centros carbônicos, sulfúricos e fosfóricos. Os centros de C, S e P atuam como sítios eletrofílicos, enquanto que hidroxilamina, oxima e ácido hidroxâmico ou suas bases conjugadas servem como nucleófilos, devido aos centros de oxigênio ou nitrogênio com alta densidade eletrônica.⁵⁶

Tais compostos contêm características estruturais semelhantes, cujos átomos de N ou O adjacentes ao nucleófilo, contêm um ou mais pares de elétrons não ligados. Esta é a característica estrutural que os classifica como α -nucleófilos, quando atuam em uma substituição nucleofílica. Deste modo, o efeito alfa pode ser definido como “o aumento da reatividade de nucleófilos que têm um par de elétrons não compartilhado no átomo adjacente ao centro nucleofílico”.⁵⁷ A Figura 13 ilustra as estruturas típicas dos membros deste grupo de compostos.

Figura 13 - Estruturas de compostos que apresentam efeito alfa.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de BUNCEL, E. 2009, p. 2.⁵⁶

Diversos estudos sobre alfa nucleófilos têm sido realizados, porém a explicação de tal fenômeno ainda não é totalmente clara. No entanto, alguns fatores podem

influenciar sua reatividade, tais como 1) desestabilização do estado fundamental, 2) estabilização do estado de transição, 3) estabilização termodinâmica do produto da reação e 4) efeito do solvente.⁵⁸

Diante de suas propriedades, tais moléculas e suas respectivas bases conjugadas podem ser utilizadas como antídotos na desintoxicação por pesticidas organofosforados e organosulfurados.^{56; 59}

A intoxicação por OPs leva à formação de conjugados de fósforo ligados covalentemente ao resíduo de serina no sítio ativo, o que interfere no mecanismo catalítico da AChE. Esses compostos impedem a hidrólise da acetilcolina, obstruindo a transmissão colinérgica. Após a inibição da AChE por um OP (Figura 14), podem acontecer dois processos: o envelhecimento ou a reativação espontânea da enzima, processo que pode ser acelerado em várias ordens de grandeza pela adição de um nucleófilo forte como uma oxima. No entanto, sem a presença de oximas, a reação de reativação em relação à maioria dos complexos AChE-OP ocorre a uma taxa insignificante, o que torna a reação de envelhecimento majoritária.

A reativação da AChE baseia-se na desfosforilação da serina. Esse é o principal mecanismo de ação das oximas. Se a oxima possui nitrogênio ligado ao anel aromático ocorre, durante o processo de reativação, a atração da região com carga positiva da oxima pelo sítio aniônico da AChE, permitindo, assim, que a parte ativa da oxima se posicione sobre o sítio fosforilado da AChE e promova o ataque nucleofílico (Figura 14).

É importante destacar que a eficiência dessa reação de reativação depende de fatores como as estruturas químicas do OP e do reativador (oxima).

Figura 14 - Processo de inibição e reativação da AChE. R₁: grupo alquila, O-alquila ou amida; R₂: grupo O-alquila ou amida; e X: grupo de saída

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de GONÇALVES, A. D. S., 2006, p. 969.⁶⁰

Estudos têm mostrado que os pesticidas paration e paraoxon, que pertencem à classe dos organofosforados, podem ser removidos do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase por meio de reações nucleofílicas com oximatos.⁶¹ Na busca por antídotos para tais inibidores da AChE; oximatos, assim como hidroxilaminas e hidroxamatos têm se tornado essenciais, já que são 100 ou mais vezes reativos sob condições amenas do que bases comuns, como hidróxidos. Estruturas mais comumente estudadas de oximas, incluem as aldoximas piridínicas (Figura 15). O grupo piridínico confere vantagens de solubilidade, bem como diminuição de seu pK_a, levando à uma maior reatividade em condições brandas.⁵⁶ Aldoximas piridínicas vêm sendo testadas como reativadores da AChE fosforilada, sendo a pralidoxima (2-PAM) (Figura 15) uma das mais utilizadas na desintoxicação por organofosforados.⁶² Além disso, Skrinjaric-Spoljar *et al* (1992)⁶³ realizaram um estudo referente à reação entre a ATCh e a 2-PAM, além de outras oximas, mostrando que todas reagiram com ATCh, com constantes de velocidade semelhantes.

Figura 15 - Estruturas de aldoximas piridínicas pertencentes à classe das oximas.

Fonte: Autoria própria.

Considerando os fatos apresentados, as reações de desfosforilação são fundamentais, exigindo a busca por estratégias eficientes, uma vez que os triésteres de fosfato (OPs) são moléculas estáveis.

Mello *et al.* (2011)⁶⁴ avaliaram o desempenho de um polímero com grupos hidroxamatos e carboxílicos, o polihidroxamicalcanoato (PHA) (Figura 16) nas reações de hidrólise dos ésteres: ácido 1-acetoxi-2-naftóico, ácido 2-acetoxi-1-naftóico, ácido 3-acetoxi-2-naftóico, bis(2,4-dinitrofenil) fosfato e dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (similares ao paraoxon), e *p*-nitrofenil acetato, *n*-butirato e noctanoato. De fato, o PHA foi muito eficiente, uma vez que catalisou a reação de hidrólise de todos os ésteres estudados. A Figura 16 mostra como seria a interação entre o PHA e o paraoxon, cujas duas setas (vermelha e preta) mostram as duas rotas reacionais possíveis, sendo a do grupo hidroxamato mais provável, pois é um nucleófilo mais forte.

Portanto, a avaliação do 2-PAM e do polímero PHA como possíveis miméticos para a AChE é interessante para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que interações com organofosforados já foram anteriormente descritas na literatura em solução aquosa.

Figura 16 - Esquema do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA) reagindo com o organofosforado paraoxon.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de MELLO, R. S., 2011, p. 15116.⁶⁴

Diante do que foi discutido nos parágrafos acima, torna-se evidente que alguns α -nucleófilos contidos em moléculas especiais podem se tornar uma alternativa plausível para agirem como miméticos da enzima acetilcolinesterase, promovendo a hidrólise do éster acetilcolina. Além disto, sua interação com OPs e carbamatos pode induzir a uma inibição da sua capacidade de hidrólise. Assim, eles poderiam ser utilizados, com grandes vantagens relacionadas com o preço e estabilidade, em biossensores amperométricos para pesticidas, em substituição à enzima.

Na busca por dispositivos rápidos, portáteis e descartáveis, tais moléculas se constituirão em um item estratégico e, assim, devem ser estudadas em detalhes, nesta função.

2 Objetivos

Diante das desvantagens apresentadas pelos sistemas de biossensoriamento que utilizam a enzima AChE, os objetivos do presente trabalho compreendem a obtenção de moléculas sintéticas que se comportem como enzimas artificiais mimetizando o comportamento da AChE e sua posterior aplicação em sistemas de biossensoriamento eletroquímico.

O objetivo geral pode ser dividido nos seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar o comportamento biomimético do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico, pertencente à classe das hidrazonas, na hidrólise da ATCh, bem como a interação com pesticidas organofosforados por métodos espectrofotométricos.
- b) Comparar a atividade biomimético do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico em relação aos tipos distintos de hidrazonas, a partir de análise cinética e computacional.
- c) Avaliar o comportamento mimético da molécula comercial iodeto de pralidoxima, pertencente à classe das oximas, diante da hidrólise da ATCh pelo método colorimétrico de Ellman.
- d) Sintetizar o polímero PHA, da classe dos ácidos hidroxâmicos; e caracterizá-lo por RMN ^1H e ^{13}C e por titulação potenciométrica.
- e) Avaliar o comportamento biomimético do polímero PHA em relação à catálise da ATCh a partir do método espectrofotométrico de Ellman e comparar seu desempenho com as demais moléculas biomiméticas propostas.
- f) Elucidar o comportamento de enzima artificial do polímero PHA por cálculos teóricos a partir da interação com o substrato acetiltiocolina e com um representante da classe dos organofosforados, o paraoxon.
- g) Verificar a interação do polímero PHA com o pesticida paraoxon por meio de métodos espectrofotométricos.
- h) Imobilizar o polímero PHA na superfície de eletrodos impressos descartáveis.
- i) Avaliar o desempenho do sensor biomimético proposto por técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial, na catálise da acetiltiocolina e na interação com o pesticida paraoxon.
- j) Analisar amostras de água de abastecimento fortificadas com concentrações conhecidas de paraoxon.

3 Metodologia experimental

3.1 Reagentes e soluções

Acetilcolinesterase tipo VI-S extraída de *Electrophorus electricus* com 2000U foi adquirida da Sigma-Aldrich. Os estoques de enzima foram preparados adicionando-se 5,0 mL de tampão fosfato pH 7,0 no frasco contendo 8,47 mg de sólido de enzima, obtendo-se uma solução estoque de $1,69 \text{ mg mL}^{-1}$. No entanto, alíquotas de 200 μL foram diluídas em 25 frascos para obter soluções de 1 mL de AChE, com concentração de $0,34 \text{ mg mL}^{-1}$ e 80U.

O ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e o cloreto de acetiltiocolina foram obtidos da Sigma-Aldrich e preparadas soluções de $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ de DTNB e de cloreto de acetiltiocolina (ATCh) em tampão BR pH 7,0 ou 8,0.

O paraoxon foi obtido da Fluka Analytical e a solução estoque de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em etanol.

Os reagentes utilizados na síntese da molécula mimética foram o ácido 4-acetilbenzóico e solução de hidrazina 64-65% ambos obtidos da Sigma-Aldrich; assim como a ciclopropil metil cetona e o 3-metil-2-butanona cetona e o iodeto de pralidoxima (2-PAM).

A poliacrilamida (PAA) (M_w 1500 g mol^{-1}) utilizada na síntese do polihidroxicarboxilato (PHA) foi obtida da Scientific Polymer e o cloridrato de hidroxilamina, da Merck. O polietileno glicol metil éter (mPEG) (M_n 5000 g mol^{-1}) foi obtido da Sigma-Aldrich.

O ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfônico para preparar o tampão MES e o tris(hidroximetil)aminometano para preparar o tampão Tris, assim como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram comprados da Sigma-Aldrich. O tetraborato de sódio anidro para preparar o tampão Borax foi obtido da Nuclear.

O hidróxido de sódio utilizado no ajuste do pH dos tampões foi obtido da Merck.

Água deionizada com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ foi obtida do sistema de ultrapurificação Nanopure (Barnstead Inc.) e utilizada no preparo de todas as soluções.

3.2 Instrumentação

3.2.1 Medidas espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas na região do ultravioleta e UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro JASCO de feixe duplo, modelo V-630. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.2 Instrumentação geral

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204. 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 ressonância magnética de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro 200 ou 500 MHz. Para os espectros de RMN ^1H , os deslocamentos (δ) são referenciados a partir do TMS (0,00 ppm), ou por prótons residuais de CD_3OD (3,31 e 4,87 ppm) ou de D_2O (4,45 ppm). As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro em 50 ou 125 MHz. Para os espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos químicos (δ) foram dados a partir CDCl_3 (77,0 ppm) ou CD_3OD (49,0 ppm). Água, metanol e clorofórmio deuterados foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados como solventes para as análises de ressonância magnética nuclear (RMN). As multiplicidades apresentadas como: s (singleto) e d (dubleto). Os espectros foram tratados com o programa *ACD/NMR Processor Academic Edition 12.0*. Espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massas (HRMS (ESI)) híbrido quadrupolo/tempo de voo (QqTOF), modelo Microtof-QII (Bruke Daltonics). As análises foram feitas com o instrumento operando com a interface de “*electrospray*” (no modo de detecção íon positivo).

A análise morfológica do material utilizado para modificar a superfície dos eletrodos contendo a molécula mimética escolhida foi realizada por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG), efetuada no Laboratório de Caracterização Estrutural DeMa/Ufscar, São Carlos. Deste modo, o microscópio Philips XL-30 FEG com feixe de 5,0 ou 10,0 kV na ponta do canhão foi utilizado.

Os experimentos eletroquímicos de cronoamperometria, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram realizados em um potenciostato/galvanostato PGSTAT/30 Autolab[®] (Eco Chemie), utilizando o *software* GPES 4.9. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram executadas em potenciostato/galvanostato PGSTAT/30 Autolab[®] (Eco Chemie) a partir do *software* FRA. Os espectros no plano complexo foram analisados empregando o *software* Electrochemistry-ZView2.

3.3 Síntese do ácido [4-(1E)-etanohidrazonoil]benzóico

A síntese da molécula biomimética, ácido [4-(1E)-etanohidrazonoil]benzóico, foi baseada no método de Nenajdenko *et al.* (2004)^{65; 66}, sua caracterização descrita anteriormente por Sgobbi (2012)⁶⁷ e mostrada no Apêndice A. Em um frasco de fundo redondo de 25 mL foram adicionados ácido 4-acetilbenzóico (285 mg, 1,75 mmol) e 1,75 mL de etanol absoluto e 0,26 mL (5,25 mmol) de hidrazina monohidratada 98 %. A solução foi agitada sob refluxo por 3h e então resfriada até 25 °C. Evaporou-se até a obtenção de um óleo viscoso amarelo que foi recristalizado depois seco em alto-vácuo, observando-se a formação de um sólido amarelado. Uma amostra analítica de [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico foi obtida após recristalização em etanol anidro. O rendimento foi de 79%. O esquema da síntese é ilustrado na Figura 17. O produto foi caracterizado por FTIR, RMN ¹H e ¹³C e por espectrometria de massas.

Ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico: RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD) δ 7.94 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 7.64 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 2.18 (s, 3H); RMN ¹³C (50 MHz, D₂O) δ 181.6, 169.8, 165.1, 157.6, 155.3, 154.5, 41.4; Ponto de fusão: 101-103 °C; HRMS (ESI) calcd para C₉H₁₁N₂O₂ [M+H]⁺: 179.0821 g mol⁻¹, encontrada: 179.0828 g mol⁻¹; ν_{max} (disco KBr) 3302, 1628 cm⁻¹. Ácido 4-acetilbenzóico: RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD) δ 8,14 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 8.07 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 2.65 (s, 3H); ν_{max} (disco KBr) 1695 cm⁻¹.

Figura 17 - Esquema da síntese da molécula biomimética ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Síntese do ciclopropil metil hidrazona e do 3-metil-2-butanona hidrazona

Dois tipos de hidrazonas contendo substituintes distintos foram sintetizados para fins comparativos. O ciclopropil metil hidrazona foi sintetizado seguindo o procedimento proposto por Wommack *et al.* (2009).⁶⁸ Em um reator de aço inoxidável de 20 mL equipado com uma barra de agitação magnética foram adicionados o ciclopropil metil cetona (0.80 mL, 8.4 mmol) e a hidrazina monohidratada (5 mL, 103 mmol). Depois de vedar o reator, a mistura homogênea foi agitada e aquecida a 100 °C por 10h. Posteriormente, a mistura foi resfriada até a temperatura ambiente e o produto extraído com CHCl_3 (3 x 25 mL). O produto extraído foi seco com sulfato de sódio, filtrado e concentrado sob pressão reduzida fornecendo 785 mg (8 mmol, 95%) de um óleo claro. O rendimento obtido foi de 95,2%. O mesmo procedimento foi usado para a síntese do 3-metil-2-butanona hidrazona, cujo rendimento obtido foi de 92%. Os esquemas das sínteses são mostrados nas Figuras 18 A e B. Ambos os compostos foram caracterizados por FTIR, RMN ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massas. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a ciclopropil metil hidrazona não foram incluídos pois foram descritos por Wommack *et al.*⁶⁸

a) *Ciclopropil metil hidrazona* ⁶⁸: ν_{max} (Pastilha de silício) 3346, 1610 cm^{-1} ; *Ciclopropil metil cetona*: ν_{max} (Pastilha de silício) 1700 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd para $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 99.0922 g mol^{-1} , encontrada: 99.0912 g mol^{-1} . b) *3-metil-2-butanona hidrazona*: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1.03 (2d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 1.04 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 2.43 (sept, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.82 (br s, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 11.1, 19.8, 36.7, 156.5; ν_{max} (Pastilha de silício) 3340, 1610 cm^{-1} ; *3-metil-2-butanona*: ν_{max} (Pastilha de silício) 1715 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd para $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 101.1079 g mol^{-1} e encontrada: 101.1065 g mol^{-1} .

Figura 18 - Esquema da síntese A) ciclopropil metil hidrazona e B) 3-metil-2-butanona-hidrazona a partir de cetonas.

Fonte: Autoria própria.

3.5 Síntese do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA)

O polímero PHA contendo grupos ácidos hidroxâmico e carboxílico foi preparado de acordo com a rota sintética proposta por Mello *et al.* (2011).⁶⁴ 5,0 g (3.0 mol) de poliacrilamida ($M_w = 1500\text{ g mol}^{-1}$) foram dissolvidos em 20 mL de água. Posteriormente, 5,2 g (75 mmol) de cloridrato de hidroxilamina foram dissolvidos em 25 mL de água e adicionados à solução de polímero. Depois de 2h de reação sob agitação, adicionou-se NaOH (75 mmol) à mistura reacional que permaneceu sob agitação por 48h a 25 °C. Então, HCl concentrado foi adicionado à mistura até pH próximo de 1,0; seguido pela adição de metanol que levou à formação de um precipitado branco. A mistura foi mantida no congelador por 24 h, e o precipitado filtrado e lavado várias vezes com metanol. Depois de seco, o sólido rosado obtido foi macerado, o rendimento foi de cerca de 70%. O polímero foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C , e por titulação potenciométrica.

3.6 Caracterização do PHA

O precursor poliacrilamida (PAA) e o produto PHA foram caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C . As amostras foram preparadas pesando-se cerca de 15 mg de amostra de cada um e dissolvendo-as em água deuterada (0,7 mL).

Titulação potenciométrica foi realizada para determinar os valores de pK_a de ambos os compostos e verificar se a síntese foi realizada eficazmente. Para isso, uma

solução aquosa contendo 30 mL de PAA 0,013 mol L⁻¹ (0,585 g) foi acidificada com 2 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ até que o pH ficasse em torno de 2,5. Uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ foi preparada para preencher uma bureta de 25 mL. O mesmo procedimento foi realizado para o PHA. Método da primeira derivada foi utilizado para determinação dos valores de pK_a.

3.7 Avaliação da atividade biomimética das moléculas sintéticas na catálise da hidrólise da acetiltiocolina (ATCh)

O método espectrofotométrico proposto por Ellman *et al.* (1961)⁶⁹ é o método padrão para determinação da atividade da enzima AChE. Deste modo, tal procedimento foi utilizado para verificar o comportamento biomimético das moléculas sintéticas propostas, ácido [4-(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico, iodeto de pralidoxima (2-PAM) e o polímero polihidroxamicalcanoato (PHA).

O método colorimétrico de Ellman consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. O substrato, cloreto de acetiltiocolina (ATCh) é hidrolizado pela enzima AChE, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o reagente de Ellman, o DTNB, para produzir o ânion de coloração amarela 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB²⁻) (Figura 19). A absorbância é lida em 412 nm.

A velocidade de formação da espécie cromófora depende da atividade da enzima, e conseqüentemente, também depende da atividade das moléculas artificiais. A tangente da curva de absorbância *versus* tempo forneceu a velocidade da reação enzimática em s⁻¹.⁷⁰

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

Fonte: Autoria própria.

A adição de uma concentração fixa do composto sintético a uma solução contendo a ATCh (variação da concentração) e o DTNB (variação da concentração) deve promover a hidrólise do substrato e a formação do complexo amarelo (TNB^{2-}), monitorado em 412 nm por espectroscopia de absorção no UV-vis. O efeito cinético da concentração de molécula mimética também foi avaliado utilizando este procedimento. Diversas condições reacionais foram utilizadas.

3.7.1 Cinética de reação

Os dados obtidos a partir do método de Ellman foram utilizados para analisar o desempenho cinético das moléculas biomiméticas a partir do método diferencial. O método diferencial é utilizado na determinação da velocidade 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:

$$v = - \frac{dc}{dt} = kc^n \quad (\text{Equação 1})$$

$$\ln v = \ln k + n \ln c \quad (\text{Equação 2})$$

O processo de catálise homogênea da hidrólise da ATCh pelo ácido [4-(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico, 2-PAM e PHA foi investigado e o método diferencial foi

aplicado a diferentes curvas de absorvância *versus* tempo, para diferentes concentrações de ATCh. As tangentes foram calculadas, fornecendo as respectivas velocidades relacionadas à formação de tiocolina. Desta forma, determinou-se a ordem de reação e a constante de velocidade (k) pelo gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln [ATCh]$.

3.8 Modelagem Computacional

Para provar a interação entre a molécula mimética e o substrato enzimático (ATCh), estudos computacionais de docagem foram realizados. Para esses cálculos, a estrutura tridimensional das moléculas biomiméticas e da ATCh foram geradas a partir de um *software* comercial (*MarvinSketch 5.9.4, 2012*) definindo-se o melhor arranjo 3D. As três hidrazonas foram docadas com a ATCh utilizando o Algoritmo Genético Lamarchiano fornecido pelo *software AutoDock 4.0*.⁷¹ As estruturas das hidrazonas foram mantidas como um corpo rígido para avaliar possíveis sítios de interação sem bias. Os mapas de rede representando as estruturas das hidrazonas foram calculados utilizando a opção AutoGrid. Caixas cúbicas foram construídas ao redor das hidrazonas com um número variável de pontos *ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico* (10x4x8), *3-metil-2-butanona-hidrazona* (10x8x6) e *ciclopropil metil hidrazona* (14x8x6). Um espaçamento de 0,7 Å entre os pontos de rede foi usado, localizando o centro da estrutura da hidrazona ao centro da caixa cúbica. As docagens foram realizadas pelo menos 10 vezes.

3.9 Avaliação da interação entre as moléculas biomimética e o paraoxon

A avaliação da reatividade das moléculas miméticas frente ao organofosforado paraoxon foi realizada diferentes condições reacionais, como pHs e estequiometrias. A interação do pesticida com a molécula biomimética baseou-se no monitoramento da liberação de *p*-nitrofenol em 400 nm.

3.10 Cálculos teóricos

A cooperação com o Grupo de Teoria Quântica de Nanomateriais dirigido pelo Prof. Dr. Juarez Lopes Ferreira da Silva do Instituto de Química de São Carlos,

possibilitou a execução de cálculos teóricos utilizados para verificar o comportamento mimético do polímero PHA, ou seja, como o substrato cloreto de acetiltiocolina se aproxima do PHA; assim como o pesticida paraoxon.

Para o estudo das estruturas moleculares, cloreto de acetiltiocolina (ATCh), paraoxon e do polímero PHA; assim como da interação dos sistemas ATCh e paraoxon com PHA foi utilizado a teoria do funcional da densidade (DFT) utilizando a aproximação do gradiente generalizado, formulado por Perdew, Burke, Ernzerhof (PBE),⁷² o qual são amplamente utilizados no estudo de sistemas moleculares e sólidos. Para obter a resolução das equações de Kohn-Sham foram utilizadas funções matemáticas numéricas centradas nos átomos, assim como implementado no código desenvolvido no Instituto Fritz-Haber da Sociedade Max-Planck (FHI-aims).⁷³ Todos os cálculos foram realizados utilizando funções bases desenvolvidas e fornecidas pelo grupo no Instituto Fritz-Haber.

O estudo da interação entre ATCh e paraoxon com PHA foi realizado a partir de um conjunto de etapas: (1) Estudo das estruturas moleculares ATCh e paraoxon, utilizando como ponto de partida estruturas reportadas na literatura, como o cloreto de acetilcolina⁷⁴ (análogo ao ATCh) e paraoxon nos seus respectivos estados de carga. (2) Um dos principais desafios foi a construção da estrutura do polímero visto que não foi possível encontrar estruturas atômicas na literatura. Portanto, primeiramente foi construída a estrutura de um polímero ideal sem a presença dos grupos funcionais ácido carboxílico, ácido hidroxâmico e grupos acrilamida, sendo posteriormente otimizada. Subsequentemente, átomos de H foram substituídos pelos tais grupos funcionais mencionados. Várias configurações relacionadas a diferentes conformações estruturais foram construídas e otimizadas utilizando DFT-PBE. Ao final deste processo um conjunto hierárquico de estruturas ordenadas pelo valor da energia de cada estrutura foi obtido. Para o estudo da interação entre as moléculas selecionadas e o polímero, foi inicialmente construído um conjunto limitado de configurações utilizando o programa *Avogadro* (*software* livre), que foram otimizadas através da minimização das forças atômicas.

3.11 Fabricação dos eletrodos impressos descartáveis de carbono (SPE)

Os SPEs consistem em um dispositivo descartável único contendo os eletrodos de trabalho (carbono), auxiliar (carbono) e de pseudo referência (Ag/AgCl) impressos

em um substrato inerte. Os SPEs foram produzidos no laboratório do Professor Dr. Arben Merkoçi, líder do Bioelectronics & Biosensors Group, pertencente ao Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (Espanha), durante o período de doutorado sanduíche, baseando-se no procedimento empregado por Aragay *et al.* (2011).⁷⁵ A máquina de impressão em tela utilizada foi o modelo DEK 248, da IBE SMT Equipment (EUA); além de três telas de fotolitografia. Três tintas distintas foram obtidas do Gwent Group (Reino Unido): tinta de carbono (C2030519P4) para o eletrodo de trabalho, auxiliar e contato elétrico, tinta de Ag/AgCl (C61003P7) para o de pseudo referência, e por fim, uma pasta dielétrica azul (D2071120P1) para isolar a área do eletrodo de trabalho e cobrir a conexão elétrica do contanto com a solução. O processo de fabricação é baseado em três etapas principais: 1) A tinta de carbono é impressa sobre um substrato de polietileno teraftalato (PET) previamente limpo. Posteriormente, a folha de PET impressa é levada ao forno para cura a 60 °C por cerca de 20 min. 2) O eletrodo de pseudo referência é impresso com a tinta de Ag/AgCl de modo que a tinta seja depositada na posição correta (Figura 20). Na sequência é novamente levada ao forno para cura com os mesmos parâmetros anteriores. 3) A última etapa consiste no isolamento do contato elétrico e da demarcação da área do eletrodo de trabalho com uma tinta isolante, também sendo necessário processo de cura.

Figura 20 - Eletrodo impresso descartável de carbono, cujo ER é o eletrodo de pseudo referência de Ag/AgCl, ET é o eletrodo de trabalho, e EA é o eletrodo auxiliar.

Fonte: Autoria própria.

3.12 Modificação dos eletrodos SPEs com a molécula biomimética escolhida

A superfície dos SPEs foi submetida ao procedimento de pré-tratamento anterior à imobilização da molécula biomimética escolhida, que consistiu na limpeza eletroquímica, uma vez que o polimento mecânico não pode ser aplicado para tal sistema. Deste modo, a etapa de limpeza eletroquímica foi realizada empregando-se primeiramente a técnica de cronoamperometria, polarizando o eletrodo em -2,0 V por 30s em 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄, seguido de enxague com água deionizada. Subsequentemente, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica em um intervalo de potencial de 0,0 a 1,0 V (*versus* Ag/AgCl) em 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄; variando-se a velocidade de varredura: 100 ciclos a 1000 mV s⁻¹, 50 ciclos a 500 mV s⁻¹, 25 ciclos a 250 mV s⁻¹ e por fim, 10 ciclos a 100 mV s⁻¹.

Após a etapa de pré-tratamento da superfície do SPE, prosseguiu-se com a imobilização da molécula biomimética. O polímero PHA foi escolhido devido à interação tanto com a ATCh, como com o organofosforado paraoxon. Diversas rotas de imobilização foram analisadas, no entanto, aquela que mais foi adequada consistiu em utilizar o polímero polietileno glicol metil éter (mPEG).

Baseando-se no procedimento proposto por Swamy (2007)⁷⁶, preparou-se uma solução aquosa contendo 2% m/v de mPEG/PHA na proporção de 50% de cada polímero, para que houvesse a formação de uma blenda polimérica, possibilitando a imobilização do PHA na superfície do SPE. A formação da blenda foi caracterizada pelas técnicas de MEV-FEG e RMN de ¹H e ¹³C, comparando a mistura mPEG/PHA com os polímero PEG e PHA individuais. O eletrodo SPE foi modificado com a blenda mPEG/PHA transferindo-se 5 µL de tal solução para a superfície pré-tratada do eletrodo de trabalho de carbono (3 mm). Posteriormente, o solvente foi evaporado por 24 h em temperatura ambiente.

O eletrodo modificado (SPE/mPEG/PHA) foi caracterizado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica em solução contendo 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em 0,1 mol L⁻¹ de KCl. Para fins comparativos, o eletrodo sem modificação SPE também foi caracterizado pelos mesmos métodos, nas mesmas condições. Os experimentos de EIE foram realizados em regime de potencial de circuito aberto (OCP), em uma faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, aplicando-se uma onda senoidal de 10 mV de amplitude. A voltametria cíclica foi realizada em um intervalo de potencial de -0,7 a 1,1 V a 50 mV s⁻¹.

3.13 Desempenho eletroquímico do sensor biomimético SPE/mPEG/PHA

Após a modificação da superfície eletródica, 50 μL de 0,1 mol L^{-1} de tampão BR pH 8,0 foi gotejado sobre a superfície do SPE/mPEG/PHA e então, submetido a varreduras cíclicas sucessivas de 0,0 a 1,0 V a 50 mV s^{-1} até a estabilização do perfil voltamétrico. Posteriormente, a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) foi utilizada com os seguintes parâmetros: tempo de modulação de 0,05 s, intervalo de tempo de 0,1 s, incremento de potencial de 1,0 mV e amplitude de 50 mV, e intervalo de potencial de 0,0 a 1,0 V.

As soluções de ATCh foram preparadas em tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 8,0 no momento em que foram utilizadas e não foram armazenadas. A concentração de ATCh foi variada no intervalo de 1,0 a 10,0 mmol L^{-1} e a detecção do produto TCh gerado foi detectada após 20 min de tempo de incubação. A curva de calibração foi obtida a partir da técnica de cronoamperometria polarizando o eletrodo em 0,5 V por 60 segundos, obtendo-se o valor de corrente em 60 s.

O limite de detecção foi calculado considerando três vezes o desvio padrão de dez medidas de corrente por tempo na solução de tampão BR pH 8,0 sem ATCh, dividido pelo coeficiente angular da curva analítica, pela equação abaixo:

$$LOD = \frac{3S_B}{b} \quad (\text{Equação 3})$$

em que S_B é o desvio padrão da solução do branco e b é a tangente da curva analítica.

3.14 Medidas eletroquímicas com o pesticida paraoxon

A interação do pesticida paraoxon com a molécula biomimética escolhida, o PHA, imobilizada na superfície do eletrodo foi monitorada de modo similar àquele em biossensores baseados na inibição enzimática. A concentração de ATCh foi mantida fixa em 8,0 mmol L^{-1} e o intervalo de concentração de paraoxon foi de 1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Primeiramente, 50 μL de solução de 8,0 mmol L^{-1} de ATCh preparada em tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 8,0 foi gotejada sobre a superfície do eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA e após 20 min, aplicou-se 0,5 V por 60 s. O cronoamperograma obtido foi utilizado para comparar os valores de corrente obtidos após a interação com o pesticida em diversas concentrações. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada. Posteriormente, prosseguiu-se com as medidas utilizando as diversas

soluções de paraoxon preparadas em tampão Borax 0,1 mol L⁻¹ pH 10,0. Uma alíquota de 50 µL de cada concentração de pesticida foi adicionada sob a superfície do SPE/mPEG/PHA e o tempo de incubação foi de 20 min. Após o tempo de incubação, obteve-se o cronoamperograma com os mesmos parâmetros anteriores em 8,0 mmol L⁻¹ de ATCh, e a diminuição de corrente foi comparada àquela obtida na ausência de pesticida, a partir da porcentagem de diminuição da corrente inicial pela seguinte equação:

$$\%I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \quad (\text{Equação 4})$$

em que I₀ é a corrente na ausência de pesticida e I₁ é a corrente após a interação com o pesticida. O LOD foi calculado pela equação 3, em que o desvio padrão aqui utilizado foi a da medida de 10 brancos da solução de 8,0 mmol L⁻¹ de ATCh. Após cada medida, o eletrodo foi lavado com água deionizada, e sucessivas voltametrias cíclicas realizadas em tampão BR pH 8,0 até a estabilização do perfil voltamétrico.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das hidrazonas

O ácido [4-(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico, da classe das hidrazonas, foi caracterizado anteriormente, como mostrado por Sgobbi *et al.* (2012)⁶⁷. Os resultados obtidos por FTIR, RMN ¹H e ¹³C e espectrometria de massas estão no Apêndice A.

As demais hidrazonas, ciclopropil metil hidrazona e 3-metil-2-butanona hidrazona, também foram caracterizadas pelas mesmas técnicas citadas, FTIR, RMN ¹H e ¹³C e espectrometria de massas.

Hidrazonas contendo diferentes substituintes foram sintetizadas para verificar o efeito biomimético estrutural de tais moléculas. O principal interesse foi buscar evidências que mostrassem que outros grupos além do grupo –NH₂ fossem fundamentais para tal reação. A ideia inicial era a de que este grupo realiza ataque nucleofílico ao carbono da carbonila da ATCh de modo similar ao grupo –OH presente na serina do sítio ativo enzimático. Três hidrazonas com grupos distintos foram sintetizadas como descrito na seção 3.3 e 3.4.

Ciclopropil metil hidrazona e o precursor ciclopropil metil cetona foram caracterizados por FTIR, que evidenciou o desaparecimento da banda em 1710 cm⁻¹ referente à C=O da cetona do precursor, além do aparecimento de uma banda intensa em 3346 cm⁻¹ relacionada ao grupo N-H da hidrazona (Figura 21). A 3-metil-2-butanona hidrazona foi caracterizada pela presença da banda em 3360 cm⁻¹ (N-H) e o desaparecimento da banda em 1715 cm⁻¹ (C=O) do precursor (Figura 22).

Figura 21-Espectros de FTIR da ciclopropil metil cetona (•) e da ciclopropil metil hidrazona (•).

Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Espectros de FTIR da 3-metil-2-butanona (•) e da 3-metil-2-butanona-hidrazona (•).

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, ambas as hidrazonas foram também caracterizadas por espectrometria de massas para confirmar as massas teóricas. A Figura 23 mostra o espectro referente à ciclopropil metil hidrazona, na qual foi obtida massa de 99,0912 g

mol^{-1} , sendo a calculada $99,0922 \text{ g mol}^{-1}$. Já a Figura 24 mostra o espectro da 3-metil-2-butanona-hidrazona cuja massa calculada foi $101,1079 \text{ g mol}^{-1}$ e a obtida $101,1065 \text{ g mol}^{-1}$. Os resultados obtidos evidenciaram que a síntese foi realizada com sucesso.

Figura 23 - Espectro de massas do ciplopropil metil hidrazona.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24 - Espectro de massas da 3-metil-2-butanona-hidrazona.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, a 3-metil-2-butanona hidrazona também foi caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C como mostram as Figuras 25 e 26, confirmando a estrutura do composto e sua pureza. A caracterização por RMN da cilopropil metil hidrazona está presente na publicação de Wommack *et al.* (2009).⁷⁷ O espectro de RMN ^1H mostrou um duplo dubleto em 1.03 referente aos seis hidrogênios das metilas A; um singleto em 1.69 referente aos hidrogênios em C; um hepteto em 2.43 referente ao hidrogênio em B e um singleto largo em 4.82 do grupo NH_2 . No caso do espectro de RMN ^{13}C há quatro singletos com deslocamento químico de: 11.1 (carbono 1); 19.8 (carbono 2), 36.7 (carbono 3); e 156.5 (carbonos 4).

Figura 25 - Espectro de RMN ^1H da 3-metil-2-butanona-hidrazona em CDCl_3 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C da 3-metil-2-butanona-hidrazona em CDCl_3 .

Fonte: Autoria própria.

4.2 Avaliação do comportamento biomimético do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh)

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

O mecanismo especulativo desse processo foi proposto por Sgobbi *et al.* (2013)⁷⁸ e é ilustrado na Figura 27. Primeiramente, o nitrogênio do grupo hidrazona ataca nucleofilicamente a carbonila da ATCh, formando um intermediário. Posteriormente, há a liberação da tiocolina e o catalisador encontra-se acetilado. Na última etapa, ocorre a hidrólise que libera o acetato e o catalisador é regenerado.

Figura 27 - Mecanismo especulativo da hidrólise da ATCh catalisado pela molécula mimética para formação de acetato e tiocolina, restaurando o catalisador ao final do processo.

Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Análise do desempenho biomimético pelo método espectrofotométrico de Ellman

O método colorimétrico de Ellman é utilizado para determinação da atividade enzimática da AChE, a partir da detecção do produto da reação enzimática, a tiocolina, de modo indireto. Assim, se a molécula mimética catalisa a hidrólise da ATCh em tiocolina e acetato, ela poderia ser aplicada como um biomimético para a enzima.

Diante disso, o desempenho da molécula biomimética sintética ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico foi verificado por tal método.

Para realizar os testes iniciais, adotou-se a concentração de catalisador de 4×10^{-3} 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 fosfato pH 7,0.

A Figura 28 representa as curvas de detecção do ânion TNB²⁻ que absorve em 412 nm para diferentes concentrações de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico, mostrando que a molécula mimética catalisou a hidrólise da ATCh, em tiocolina que foi detectada indiretamente pela formação da espécie cromófora.

O intervalo de concentração de catalisador foi de 1×10^{-3} a 6×10^{-3} mol L⁻¹ e a concentração de ATCh foi mantida constante em 2×10^{-3} mol L⁻¹, considerando tanto várias estequiometrias em relação ao substrato ATCh e o catalisador. Pela análise das curvas da Figura 28, pôde-se verificar que a concentração de 6×10^{-3} mol L⁻¹ de molécula

mimética levou a uma velocidade de reação superior em relação às demais; sendo este o valor escolhido para os demais ensaios.

Figura 28 - A) Efeito da concentração de catalisador (ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico) (•) 1×10^{-3} mol L⁻¹; (•) 2×10^{-3} mol L⁻¹; (•) 4×10^{-3} mol L⁻¹ e (•) 6×10^{-3} mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,0. Parâmetros: [ATCh] e [DTNB] = 2×10^{-3} mol L⁻¹. B) Fotografia relacionada à formação do TNB²⁻ após 1 hora. 1: Hidrazona, ATCh e DTNB; 2: ATCh e DTNB; 3: Hidrazona e DTNB.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 1 mostra os valores de velocidade relacionados com a hidrólise da ATCh, quando a concentração de catalisador foi variada (Figura 28). 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:

$$v = F[C] \quad (\text{Equação 5})$$

onde [C] é a concentração de catalisador e F está relacionado com a concentração de substrato e outros fatores.⁷⁹ Esta equação implica que a reação não ocorre em extensão mensurável na ausência de catalisador.

Tabela 1 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com sua concentração em pH 7,0

<i>Concentração /mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
1x10 ⁻³	5,73x10 ⁻⁴
2x10 ⁻³	1,16x10 ⁻³
4x10 ⁻³	1,53x10 ⁻³
6x10 ⁻³	3,55x10 ⁻³

Fonte: Autoria própria.

4.3 Mecanismo catalítico

Em cinética química é muito importante determinar como a velocidade (v) depende das concentrações (c) das substâncias envolvidas na reação. O método diferencial foi aplicado para determinar as velocidades de reação pela medida das tangentes das curvas de absorbância pelo tempo.

O gráfico de $\ln v$ versus $\ln c$ fornece uma reta de tangente n , que é a ordem de reação; e o intercepto quando $\ln c = 0$, ou seja, $\ln k$, onde k é a constante de velocidade. Para determinar a ordem de reação e a constante de velocidade da hidrólise da ATCh, catalisada pelo ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico, várias curvas de absorbância versus tempo foram obtidas implementando-se a condição de pseudo primeira ordem.

A condição de pseudo primeira ordem é aplicada para simplificar o tratamento cinético de uma reação de segunda ordem. Para isso, um dos reagentes é mantido em excesso, assumindo que sua concentração é mantida constante durante a reação. Deste modo, a cinética de reação é tratada como primeira ordem e depois convertida para segunda ordem.

Assim, a concentração do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico foi alta o suficiente (6×10^{-3} mol L⁻¹) para ser considerada constante durante a reação, como estabelecido nas condições cinéticas de pseudo primeira ordem. O intervalo de concentração de ATCh foi de 1×10^{-4} a $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,0. As curvas de absorbância versus tempo foram obtidas fixando-se o comprimento de onda em 412 nm (Figura 29A). As tangentes foram calculadas e os valores de velocidade obtidos em s⁻¹ (Tabela 2). A Figura 29B mostra o gráfico de $\ln v$ versus $\ln c$, que forneceu a ordem de reação em relação à concentração (n), sendo esta reação de

primeira ordem em relação ao substrato. O valor de constante de velocidade encontrado foi de $1,02 \text{ s}^{-1}$ à temperatura ambiente, referente à etapa limitante da reação, ou seja, a desacetilação da molécula mimética. No entanto, como a velocidade da reação de hidrólise da ATCh depende da concentração tanto de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico, como de ATCh; a constante de velocidade de pseudo primeira ordem tem que ser dividida pela concentração da molécula mimética ($6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) que foi mantida constante para ser transformada em constante de velocidade de segunda ordem, sendo essa igual a $170 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$.

Figura 29 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-4}$, b) $2,0 \times 10^{-4}$, c) $4,0 \times 10^{-4}$, d) 6×10^{-4} , e) $8,0 \times 10^{-4}$, f) $1,0 \times 10^{-3}$ e g) $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com a concentração de ATCh em pH 7,0

<i>Concentração de ATCh / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade formação do produto / s⁻¹</i>
1×10^{-4}	$1,24 \times 10^{-4}$
2×10^{-4}	$1,94 \times 10^{-4}$
4×10^{-4}	$4,36 \times 10^{-4}$
6×10^{-4}	$5,39 \times 10^{-4}$
8×10^{-4}	$7,93 \times 10^{-4}$
1×10^{-3}	$1,13 \times 10^{-3}$
$1,5 \times 10^{-3}$	$1,84 \times 10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

4.4 Comparação entre as hidrazonas

O ensaio espectrofotométrico de Ellman foi realizado para a ciclopropil metil hidrazona, 3-metil-2-butanona hidrazona e para o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico para fins comparativos.

As concentrações utilizadas foram [hidrazonas] = 6×10^{-3} mol L⁻¹, [ATCh] = 2×10^{-3} mol L⁻¹ e [DTNB] = 2×10^{-3} mol L⁻¹. Observou-se que o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico foi mais rápido que as demais hidrazonas, mas como esperado muito mais lenta que a enzima (Figura 30). Em termos da velocidade inicial, a molécula mimética foi 3 vezes mais rápida que a ciclopropil metil hidrazona e 4 vezes mais rápida que a 3-metil-2-butanona hidrazona.

Do ponto de vista teórico, o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico deveria ser a mais lenta, uma vez que sua estrutura é estabilizada por ressonância. No entanto, experimentalmente o contrário foi observado, reforçando indícios de que não era apenas o grupo -NH₂ que participava da reação. O grupo aromático da molécula ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico provavelmente atrai a carga positiva do substrato ATCh para facilitar o ataque nucleofílico promovido pelo nitrogênio do grupo hidrazona (Figura 27).

Figura 30 - Comparação do comportamento catalítico das hidrazonas em relação à enzima AChE (•), nas mesmas condições experimentais: ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico (•), ciclopropil metil hidrazona (•) e 3-metil-2-butanona-hidrazona (•).

Fonte: Autoria própria.

Para investigar a influência dos grupos substituintes das moléculas, realizou-se um estudo de modelagem computacional baseado na interação entre as hidrazonas e a ATCh. Os resultados mostraram que o anel aromático exerce um papel importante já que possui alta densidade eletrônica atraindo o grupo da amina quaternária positivamente carregada, facilitando o ataque nucleofílico pelo grupo -NH_2 , pelo possível posicionamento e distâncias adequadas. As outras hidrazonas que não possuem anel aromático apenas atuam realizando ataque nucleofílico à carbonila.

A Figura 31 mostra os resultados da simulação ressaltando que o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico atua com um mecanismo de certo modo similar ao enzimático, ou seja, envolve interações eletrostáticas, além do ataque nucleofílico. Tais resultados concordam com as curvas cinéticas e justificam sua classificação como molécula mimética. Pode-se observar na Figura 31A que a distância entre o anel aromático e a amina quaternária é 4,3 e 4,8 Å. Já na Figura 31B, a distância entre o ciclo propil e a amina carregada positivamente é 6,8 e 7,3 Å. E na Figura 31C, a distância entre a cadeia carbônica da hidrazona alifática e a amina é 5,9 e 6,2 Å. Tais resultados evidenciam a importância da atração eletrostática para que ocorra o ataque nucleofílico, como mostrado experimentalmente pela comparação do desempenho cinético na Figura 30.

Figura 31 - Configurações obtidas a partir dos dados de simulação computacional entre a ATCh e A) ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico, B) ciclopropil metil hidrazona e C) 3-metil-2-butanona-hidrazona.

Fonte: Autoria própria.

4.5 Interação de molécula mimética genérica com pesticidas organofosforados e carbamatos

A aplicação de uma molécula mimética em um sensor eletroquímico é baseada na reação com a ATCh, além da reação/interação com pesticidas organofosforados e/ou carbamatos. Tal comportamento mimetizaria a enzima AChE que catalisa a hidrólise da ATCh e é inibida por pesticidas destas classes. No caso da molécula biomimética, a inibição deve ocorrer a partir da formação de ligação covalente, interação eletrostática ou por forças intermoleculares, como a de van der Waals entre a molécula biomimética e o pesticida. Desta forma, parte das moléculas miméticas não reagiria com a ATCh obtendo-se um sinal de corrente menor que o obtido na ausência dos pesticidas.

4.5.1 Ensaios espectrofotométricos para verificação da interação de pesticida organofosforado com o ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico

O paraoxon, pertencente à classe dos organofosforados, foi escolhido para verificar a possível interação/reação com a hidrazona ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico. A escolha baseou-se no fato de que o paraoxon possui um bom grupo de saída, o *p*-nitrofenol, o que facilitaria a reação com a hidrazona. Além disso, a liberação de *p*-nitrofenol pode ser monitorada espectrofotometricamente em 320 nm ou *p*-nitrofenolato em 400 nm, considerando seu pK_a 7,16.³⁴ A Figura 32 mostra o mecanismo especulativo entre a hidrazona e o paraoxon, com a liberação de *p*-nitrofenol.

Figura 32 - Mecanismo especulativo da reação entre o organofosforado paraoxon e a hidrazona ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.

Fonte: Autoria própria.

Primeiramente, foram obtidos os espectros do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e do paraoxon (Figura 33A), verificando que ambas as espécies apresentam um pico de absorbância em 276 nm. Para verificar a formação de *p*-nitrofenolato, foi adicionado em uma cubeta de quartzo 2×10^{-4} mol L⁻¹ de paraoxon e posteriormente, o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico (1×10^{-4} a 5×10^{-4} mol L⁻¹) sob agitação. A reação foi monitorada durante uma hora obtendo-se um espectro a cada 5 min. A Figura 33B mostra os espectros obtidos após uma hora, podendo-se observar que não houve formação de *p*-nitrofenolato, comparando-se estes espectros com o de 5×10^{-5} mol L⁻¹ de *p*-nitrofenolato padrão que apresenta um pico em 400 nm.

Figura 33 - A) Espectros de absorção de 2×10^{-4} mol L⁻¹ do paraoxon (●) e de 5×10^{-4} mol L⁻¹ do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico (●) em tampão pH 7,0. B) Efeito da interação entre o paraoxon (2×10^{-4} mol L⁻¹) com diversas concentrações de hidrazona: 1×10^{-4} (●), 2×10^{-4} (●), 3×10^{-4} (●) e 5×10^{-4} mol L⁻¹ (●) em pH 7,0 após uma hora e espectro de 5×10^{-5} mol L⁻¹ de *p*-nitrofenol (●).

Fonte: Autoria própria.

Como a reação não teve êxito nas condições acima estabelecidas, foi necessário basificar o meio reacional (pH 8,0 e 11,0), para tornar a hidrazona mais reativa, já que estaria desprotonada.

Em uma cubeta de quartzo, adicionaram-se 2×10^{-4} mol L⁻¹ de paraoxon e posteriormente, o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico em diferentes proporções (1×10^{-4} , 2×10^{-4} e 5×10^{-4} mol L⁻¹) em pH 8,0, obtendo-se cada espectro depois de uma hora (Figura 34). A partir dos espectros da Figura 34, verificou-se que houve apenas diminuição da absorbância em relação ao sistema em pH 7,0; o que pode estar associado à interação entre o pesticida e a hidrazona, no entanto, não foi possível identificar tal interação por outros métodos.

Além dessa condição reacional, outras foram avaliadas com diferentes proporções estequiométricas entre o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e ATCh

em pH 8,0. No entanto, nenhum resultado que mostrasse indícios de formação de *p*-nitrofenolato foi observado.

Figura 34 - Efeito da interação entre paraoxon ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com 1×10^{-4} (●), 2×10^{-4} (●), $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (●) do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico em pH 8,0 após uma hora.

Fonte: Autoria própria.

Subsequentemente, a hidrólise espontânea do paraoxon foi avaliada em pH 11,0. Em uma cubeta, foram adicionados $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pesticida monitorando-se a absorbância por 10 horas, e adquirindo um espectro a cada 30 min. Verificou-se que o paraoxon é hidrolisado a *p*-nitrofenolato, já que há diminuição do pico em 276 nm e aparecimento de outro em 400 nm (Figura 35A).

A reação entre $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon e de ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico foi monitorada em pH 11,0; obtendo-se um espectro a cada 30 min. No entanto, verificou-se que o aparecimento do pico em 400 nm era referente à hidrólise espontânea do paraoxon, já que o aumento da absorbância foi insignificante em relação ao da hidrólise espontânea, para poder ser atribuído à catálise pelo ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico (Figura 35B).

Figura 35 - A) Monitoramento da hidrólise espontânea de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon em pH 11,0 por 6,0 h. B) Espectros de absorção referentes à reação entre de $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e de paraoxon em pH 11,0 por 6,0 h.

Fonte: Autoria própria.

4.6 Avaliação do comportamento mimético do iodeto de pralidoxima (2-PAM): Análise cinética da hidrólise da acetilcolina

Como o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico mostrou-se ineficiente para reagir com o paraoxon nas condições estudadas, decidiu-se avaliar a oxima 2-PAM, devido suas propriedades de alfa nucleófilo. Como tal oxima é utilizada na desintoxicação por pesticidas organofosforados,⁶² já que interage com a AChE fosforilada reativando a enzima, poderia ser utilizada como um possível biomimético.

Primeiramente, a oxima se aproxima do grupo fosforil covalentemente ligado à serina do sítio ativo da AChE, formando um conjugado totalmente reversível: AChE-fosforila-oxima. Este processo é seguido pelo deslocamento do resíduo fosforila do estado de transição pentacoordenado. A remoção de tal resíduo, resulta na formação de uma oxima fosforilada e na restauração da enzima, como mostrado na Figura 14.⁸⁰

Tal comportamento encorajou a utilização da oxima 2-PAM como um possível mimético para a AChE. No entanto, para que tal desempenho seja completo é necessário que a 2-PAM também hidrolise a ATCh. Estudos presentes na literatura mostraram que a 2-PAM é capaz de catalisar a hidrólise da ATCh.^{81; 82} Em tais estudos, a 2-PAM hidrolisou tanto a acetilcolina, quanto a butirilticolina com velocidades superiores em pH 8,0 em relação ao pH 7,0. Além disso, a 2-PAM possui pK_a relativamente baixo (7,8 a 8,1) em relação a outras oximas, possibilitando condições reacionais mais amenas.⁸³

Deste modo, o efeito na hidrólise da ATCh foi avaliado na presença de 2-PAM, variando-se sua concentração em um intervalo de 7×10^{-4} a $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e mantendo

constante a concentração de ATCh em $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, considerando as condições de cinética de pseudo primeira ordem (tampão MES pH 8,0).

A Figura 36A mostra as curvas de absorbância obtidas a partir do método de Ellman, fixando-se o comprimento de onda em 412 nm. Nota-se que em concentrações elevadas de 2-PAM (5 a $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a velocidade da reação não depende mais da concentração de 2-PAM. A partir das tangentes das curvas, os valores de velocidade foram obtidos, resultando no gráfico de $\ln v$ vs $\ln c$ (Figura 36B), cujo ajuste linear foi feito até o valor correspondente a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-PAM, já que a partir deste a velocidade não apresentou efeito significativo com aumento da concentração. A ordem de reação obtida foi 1, o que está de acordo com as condições experimentais estabelecidas de pseudo ordem um. O intercepto forneceu a constante de velocidade de ordem de primeira ordem igual a $1,902 \text{ s}^{-1}$. Dividindo este valor por $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração de ATCh mantida constante), obteve-se a constante de segunda ordem igual a $3804 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. A Tabela 3 mostra que a velocidade aumentou com o aumento da concentração de 2-PAM, tornando-se constante a partir de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 36 - A) Efeito da concentração de 2-PAM a) $7,0 \times 10^{-4}$, b) $1,0 \times 10^{-3}$, c) $1,5 \times 10^{-3}$, d) $2,0 \times 10^{-3}$, e) $3,0 \times 10^{-3}$, f) $4,0 \times 10^{-3}$, g) $5,0 \times 10^{-3}$, h) $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de ATCh e DTNB fixa em $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [2\text{-PAM}]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Velocidade da reação catalisada por 2-PAM e a relação com sua concentração em pH 8,0

<i>Concentração de 2-PAM / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
7×10^{-4}	$1,65 \times 10^{-3}$
1×10^{-3}	$1,95 \times 10^{-3}$
$1,5 \times 10^{-3}$	$3,55 \times 10^{-3}$
2×10^{-3}	$5,00 \times 10^{-3}$
3×10^{-3}	$7,05 \times 10^{-3}$
4×10^{-3}	$8,55 \times 10^{-3}$
5×10^{-3}	$1,01 \times 10^{-2}$
6×10^{-3}	$9,93 \times 10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, a concentração de ATCh e DTNB foi variada em um intervalo de 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹ e a concentração de 2-PAM foi mantida constante em 6×10^{-3} mol L⁻¹, novamente para atender aos critérios de reação de pseudo primeira ordem, em que um dos reagentes está em excesso. A Figura 37A mostra as curvas de absorbância *versus* tempo, cujas tangentes representam as velocidades de reação. A ordem de reação e a constante de velocidade de pseudo primeira ordem foram 1 e 17,25 s⁻¹, respectivamente. Estas foram obtidas a partir do gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$ (Figura 37B). Para obter a constante de velocidade de reação de segunda ordem é necessário dividir o valor encontrado pela concentração do reagente que foi mantida fixa, no caso, $[2\text{-PAM}] = 6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, resultando em 2874 mol⁻¹ L s⁻¹. A Tabela 4 mostra os valores de velocidade encontrados com a variação de concentração de ATCh.

Figura 37 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, mantendo-se constante a concentração de 2-PAM em 6×10^{-3} mol L⁻¹, em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Velocidade da reação catalisada por 2-PAM e a relação com a concentração de ATCh em pH 8,0

<i>Concentração de ATCh / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
1×10^{-5}	$2,48 \times 10^{-4}$
$2,5 \times 10^{-5}$	$5,83 \times 10^{-4}$
5×10^{-5}	$1,25 \times 10^{-3}$
7×10^{-5}	$1,63 \times 10^{-3}$
1×10^{-4}	$2,31 \times 10^{-3}$
$2,5 \times 10^{-4}$	$5,51 \times 10^{-3}$
4×10^{-4}	$8,62 \times 10^{-3}$
5×10^{-4}	$1,12 \times 10^{-2}$

Fonte: Autoria própria.

Para fins comparativos, as mesmas condições reacionais de pH e concentração foram utilizadas em outro ensaio cinético com o ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico. Deste modo a comparação entre o efeito das duas moléculas na hidrólise da ATCh pôde ser realizada de modo condizente. Os experimentos foram realizados baseados no método de Ellman em tampão MES pH 8,0, com intervalo de concentração de ATCh e DTNB de 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹, o mesmo utilizado no ensaio com a 2-PAM. A concentração de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico foi mantida constante em 6×10^{-3} mol L⁻¹. As curvas cinéticas são mostradas na Figura 38A. A partir do gráfico de $\ln v$ versus $\ln c$ (Figura

38B) obteve-se a ordem de reação igual que igual a 1, o que está em concordância com os critérios estabelecidos de pseudo ordem um e a constante de velocidade de pseudo primeira ordem encontrada foi de $0,358 \text{ s}^{-1}$. Dividindo tal valor pela concentração de hidrazona ($6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), obteve-se a constante de velocidade de ordem dois igual a $59,7 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. A Tabela 5 mostra a relação entre o aumento da velocidade da reação com o aumento da concentração de ATCh, mantendo-se a concentração de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico constante.

Figura 38 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$ e h) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; mantendo-se a concentração de ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico fixa em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão MES pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [\text{ATCh}]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Velocidade da reação catalisada pelo ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico e a relação com a concentração de ATCh em pH 8,0

<i>Concentração de ATCh / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
1×10^{-5}	$1,65 \times 10^{-5}$
$2,5 \times 10^{-5}$	$3,92 \times 10^{-5}$
5×10^{-5}	$6,23 \times 10^{-5}$
7×10^{-5}	$8,45 \times 10^{-5}$
1×10^{-4}	$1,13 \times 10^{-4}$
$2,5 \times 10^{-4}$	$2,85 \times 10^{-4}$
4×10^{-4}	$4,15 \times 10^{-4}$
5×10^{-4}	$4,65 \times 10^{-4}$

Fonte: Autoria própria.

Comparando-se as constantes de velocidade, verificou-se que a hidrólise da ATCh é mais eficiente com o 2-PAM como catalisador, sendo a reação cerca de 48 vezes mais rápida na presença de oxima do que com a hidrazona. Tal resultado mostra que a oxima 2-PAM seria mais eficiente que a hidrazona na mimetização da enzima AChE.

4.7 Estudo espectrofotométrico da interação entre 2-PAM e paraoxon

A Figura 39A mostra os espectros referentes à reação de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-PAM e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon obtidos no tempo zero e após três horas. Esperava-se que houvesse formação de *p*-nitrofenolato, já que excesso de 2-PAM foi adicionado; no entanto, nenhum indício foi observado.

Outro sistema reacional foi analisado de acordo com as seguintes condições: $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-PAM e $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB em tampão fosfato pH 9,0. O surfactante foi adicionado já que a reatividade de nucleófilos aumenta em meio micelar.⁸⁴ Todavia, os espectros mostrados na Figura 39B não sugerem nenhuma evidência de formação de *p*-nitrofenolato. Os picos observados entre 200 e 300 nm são referentes aos reagentes adicionados.

Outras condições reacionais foram analisadas, porém nenhum resultado significativo foi encontrado.

Figura 39 - A) Efeito da interação entre $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-PAM e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon monitorada por 3 h em tampão MES pH 8,5. B) Efeito da interação entre $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-PAM e $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon, na presença de CTAB $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ monitorada por 3 h em tampão fosfato pH 9,0.

Fonte: Autoria própria.

4.8 Síntese e caracterização do polímero polihidroxamicalcanoato (PHA): Nova abordagem de molécula biomimética para AChE

Uma nova alternativa visando à obtenção de uma molécula biomimética adequada para a AChE foi baseada no trabalho de Mello *et al.* (2011),⁶⁴ que sintetizaram um polímero híbrido contendo grupos funcionais ácido carboxílico e hidroxâmico, o polihidroxamicalcanoato (PHA), com habilidade de acelerar algumas reações de desfosforilação. De acordo com os autores, a rota sintética utilizada para preparar tal polímero favoreceu o posicionamento próximo dos grupos funcionais, permitindo a cooperação entre eles. Tal cooperação é fundamental na imitação do sítio ativo da enzima. Com base na capacidade do polímero híbrido em interagir com organofosforados, conjecturou-se que ele também poderia interagir/reagir com a ATCh, o que faria dele um biomimético apropriado para a AChE. Além disso, um polímero pode ser facilmente imobilizado na superfície de um eletrodo, considerando os diversos métodos empregados na literatura.

O PHA foi obtido através da modificação do precursor poli(acrilamida) (PAA), com a inserção de grupos funcionais ácido carboxílico e ácido hidroxâmico. Para verificar tal modificação, algumas técnicas de caracterização foram empregadas, tais como RMN de ^1H e ^{13}C , além de titulação potenciométrica.

A poli(acrilamida) comercial (PAA) e o polímero mimético PHA foram ambos caracterizados por espectroscopia RMN ^1H em D_2O . O espectro de ^1H referente à PAA (Figura 40A) apresentou picos entre 1,56-1,68 ppm (1), correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico (CH_2) e outro entre 2,09-2,24 ppm (2), relacionado ao hidrogênio ligado ao carbono metínico (CH) da cadeia polimérica, os hidrogênios referentes ao grupo amida encontram-se em 6,87 e 7,60 e 7,67 ppm (3). O espectro de RMN ^1H referente ao PHA (Figura 40B) mostrou os mesmos picos em 1,55-1,67 ppm e 2,09-2,24, respectivamente.⁸⁵ A similaridade dos espectros pode ser explicada pela baixa conversão dos grupos amida em grupos ácidos carboxílico e hidroxâmico, segundo Mello (2010).⁸⁶ O pico em torno de 4,7 ppm é referente ao hidrogênio do solvente D_2O .

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 41) foram condizentes com aqueles apresentados por Mello *et al.* (2011).⁶⁴ Não é possível verificar diferença significativa entre o espectro do precursor PAA e o produto PHA. O espectro de PAA compreende, basicamente, a presença de carbonos metínicos antes de 40 ppm, de carbonos

metilênicos entre 40 e 50 ppm e de carbono referente à carbonila em ~180 ppm.⁸⁷ O carbono metínico da cadeia principal da PAA é um carbono assimétrico e é sensível a inserções de monômeros ao longo da cadeia polimérica. Diferentes deslocamentos químicos aparecem no espectro referente à resposta de ressonância do CH, ficando evidente a subdivisão em diversos picos (cerca de oito) com menos de 1 ppm de diferença entre eles. Tal comportamento revela a aleatoriedade em relação à taticidade da PAA, revelando a presença de PAA atática, isotática e sindiotática.

Em relação ao CH₂, há cerca de 13 picos separados por aproximadamente 3,5 ppm. Em relação à carbonila, a separação de picos é bem mais limitada, com distância de 1 ppm.⁸⁷ Outros picos podem estar relacionados a impurezas.

Figura 40 - A) Espectros de RMN de ¹H da A) PAA e do B) PHA em D₂O.

Fonte: Autoria própria.

Figura 41 - Espectros de RMN de ^{13}C da A) PAA e do B) PHA em D_2O .

Fonte: Autoria própria.

Como os dados de RMN não foram conclusivos em relação à eficiência da síntese, a titulação potenciométrica de ambos os polímeros foi realizada. As curvas de titulação são apresentadas na Figura 42. O valor de pK_a obtido para a PAA foi 4,13, que está relacionado com a conversão da PAA em ácido poliacrílico, tendo em vista que a PAA foi hidrolisada quando a solução de PAA foi acidificada.⁸⁸ O valor de pK_a obtido está de acordo com aqueles encontrados na literatura (pK_a 4,5).⁸⁹ Os valores de pK_a encontrados para o PHA foram pK_{a1} 5,5 e pK_{a2} 9,3 de acordo com o equilíbrio mostrado no Esquema 1.

Figura 42 - A) Curvas de titulação da PAA e do PHA. B) Gráfico da primeira derivada da curva de titulação do PHA.

Fonte: Autoria própria.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de Mello, R. S., 2010, p. 88.⁸⁶

As porcentagens de conversão de grupos ácidos carboxílico e hidroxâmico foram obtidas a partir da derivada primeira da curva de titulação do PHA (dpH/dV). Os três picos observados a partir da Figura 42B representam: a neutralização do ácido adicionado no início da titulação (P_i), a desprotonação dos grupos ácido carboxílico (P_a) e a desprotonação dos grupos ácido hidroxâmico (P_h). Por meio das equações 6a e 6b, obtém-se a porcentagem de cada grupo na cadeia do polímero. Considerando que os valores de P_i , P_a e P_h foram 1,19; 8,5 e 15 mL, respectivamente; calculou-se que 53% dos grupos convertidos do precursor PAA são ácido carboxílico e 47% ácido hidroxâmico. A titulação potenciométrica forneceu indícios de que realmente os grupos funcionais ácidos carboxílico e hidroxâmico foram inseridos em sua estrutura, o que não pôde ser verificado pelo RMN.

$$\% \text{Ácido carboxílico} = \frac{P_a - P_i}{P_h - P_i} * 100 \quad \text{Equação 6a}$$

$$\% \text{Ácido Hidroxâmico} = \frac{P_h - P_a}{P_h - P_i} * 100 \quad \text{Equação 6b}$$

4.9 Avaliação cinética relacionada ao polímero polihidroxamicalcanoato (PHA) na hidrólise da acetiltiocolina

De acordo com Mello *et al.* (2011)⁶⁴, o polímero PHA atua como um nanoreator na reação com organofosforados devido ao efeito alfa nucleófilo relacionado à sua constituição, uma vez que possui grupos hidroxamatos e carboxílicos em sua estrutura, podendo funcionar de modo similar aos processos enzimáticos. Nanoreatores são complexos moleculares ou moléculas grandes com cavidade estrutural externamente acessível, na qual uma ou mais moléculas são capazes de entrar e sofrer transformações químicas, de modo que várias enzimas naturais ou sintéticas podem ser classificadas

como tal.⁹⁰ Um nanoreator macromolecular é definido como uma estrutura com múltiplas cavidades repetidas, tais como alguns polímeros orgânicos e proteínas.

Tal polímero foi preparado introduzindo dois grupos funcionais distintos (ácido carboxílico, CO_2H e ácido hidroxâmico, CONH_2OH), em um esqueleto polimérico, em uma posição favorável, já que esses grupos têm por finalidade mimetizar o sítio ativo de uma enzima. O grupo ácido hidroxâmico foi escolhido por ser um nucleófilo alfa, apresentando então uma maior nucleofilicidade, podendo acelerar diversas reações. O grupo ácido carboxílico foi escolhido já que é conhecido por atuar como uma base geral em vários processos, além disso, estão presentes em vários sítios ativos de enzimas.

Diante disso, uma vez reportada a habilidade do PHA em acelerar a desfosforilação de alguns compostos,⁶⁴ houve interesse em avaliar seu efeito em relação ao organofosforado paraoxon.

A reação entre $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PHA e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon em tampão Tris pH 8,0 (Figura 43A) e pH 9,0 (Figura 43B) foi espectrofotometricamente monitorada a cada 10 min por 24 h, em condições de pseudo primeira ordem, ou seja, com excesso de PHA. O pico em 400 nm que aumentou com o tempo está relacionado com a formação de *p*-nitrofenolato, que é liberado quando o PHA ataca nucleofilicamente o paraoxon. Nota-se que em pH 9,0 a reação é favorecida, pois há aumento da absorbância no mesmo intervalo de tempo analisado. Os resultados aqui obtidos sugerem que em pH 9,0, a reação é mais eficiente, provavelmente pela presença de mais grupos hidroxâmicos desprotonados, que realizam ataque nucleofílico diretamente ao fósforo do paraoxon.

Figura 43 - Espectros de absorção referentes à reação entre $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PHA e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon monitorada a cada 10 min por 24 h em tampão Tris A) pH 8,0 e B) pH 9,0.

Fonte: Autoria própria.

No entanto, para aumentar a eficiência da reação, optou-se por realizar a reação entre o PHA e o paraoxon em tampão Borax pH 10,0 onde tanto o grupo carboxílico quanto o hidroxâmico estariam desprotonados, já que os pK_a s do PHA são 4,1 e 9,3. A reação foi monitorada da mesma forma que as anteriores em pH 8,0 e 9,0; e o espectro referente a tal processo está representado na Figura 44A. Observa-se que o aumento na absorbância em 400 nm, referente à formação do *p*-nitrofenolato, é mais rápida do que nas outras condições reacionais em pHs mais baixos. A Figura 44B mostra a formação do *p*-nitrofenolato após 2h, na cubeta com solução amarela, em comparação com a cubeta com solução incolor referente ao tempo zero da reação.

Figura 44 - A) Monitoramento da reação entre $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PHA e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon por 2 h em tampão Borax pH 10,0. B) Fotografia referente à reação do PHA e paraoxon. A cubeta da esquerda representa a reação no tempo zero; e a da direita, a reação após duas horas.

Fonte: Autoria própria.

Para verificar a eficiência do PHA em relação à interação com o paraoxon foi necessário realizar alguns experimentos de controle. Primeiramente, monitorou-se a hidrólise espontânea do paraoxon em pH 10,0 por 2h. O espectro de absorção (Figura 45) mostra que houve um aumento na absorbância em 400 nm relacionada à formação do *p*-nitrofenolato pela hidrólise espontânea do paraoxon, no entanto não é significativa quando comparada com a reação entre o PHA e o organosfosforado. Quando se utilizou o precursor PAA, ao invés do PHA, nas mesmas condições reacionais, o PAA não foi capaz de reagir com o paraoxon, já que a absorbância foi similar à da hidrólise espontânea. Deste modo, apenas o PHA que possui os grupos funcionais ácidos carboxílico e hidroxâmico foi capaz reagir com o paraoxon de modo eficiente.

Figura 45 - Efeito da interação entre (—) $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PAA e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon; (—) $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PHA e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de paraoxon e da (—) hidrólise espontânea de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ paraoxon após 2 h em tampão borato pH 10,0.

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, foi avaliada a capacidade do PHA para catalisar a hidrólise da ATCh, para que seu desempenho pudesse ser comparado ao da enzima AChE. O estudo preliminar é mostrado na Figura 46, realizado com $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ATCh, $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DTNB e $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de PHA em tampão Tris pH 8,0, cujos espectros foram obtidos a cada 10 min por 90 min. Pode-se observar que houve aumento do pico em 412 nm, referente à formação de tiocolina. Portanto o polímero híbrido PHA mostrou-se adequado para mimetizar o desempenho da AChE, sendo uma alternativa adequada para aplicação em sensores para detecção de organofosforados.

Figura 46 - Monitoramento da catálise da hidrólise de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetiltiocolina por $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de polímero PHA em tampão Tris pH 8,0 monitorado por 90 min. Espectros obtidos a cada 10 min.

Fonte: Autoria própria.

Análise cinética complementar foi conduzida para verificar o parâmetro de constante de velocidade na hidrólise da ATCh e compará-lo com aqueles obtidos para o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e iodeto de pralidoxima. Primeiramente, os ensaios foram conduzidos em pH 7,0; variando-se a concentração do PHA de 6×10^{-4} a $7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e mantendo fixa a concentração de ATCh em $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; fixando-se o comprimento de onda em 412 nm (Figura 47A). O ajuste linear foi feito considerando o intervalo de concentração de 6×10^{-4} a 6×10^{-3} , já que depois disso a velocidade começou a ficar constante. A partir do gráfico de $\ln v$ versus $\ln c$ (Figura 47B), verificou-se que o coeficiente angular da reta foi de 0,7, ou seja, neste caso as condições de pseudo primeira ordem utilizadas para o ensaio cinético não foram atendidas. No entanto, utilizou-se a concentração de $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, como nos demais ensaios para que os resultados pudessem ser comparáveis aos demais sistemas estudados. A Tabela 6 mostra os valores de velocidade obtidos quando a concentração de PHA foi variada em pH 7,0.

Figura 47 - A) Efeito da concentração do polímero PHA a) $6,0 \times 10^{-4}$, b) $7,0 \times 10^{-4}$, c) $1,0 \times 10^{-3}$, d) $1,5 \times 10^{-3}$, e) $2,0 \times 10^{-3}$, f) $3,0 \times 10^{-3}$, g) $4,0 \times 10^{-3}$, h) $5,0 \times 10^{-3}$, i) $6,0 \times 10^{-3}$, j) $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; mantendo-se a concentração de ATCh fixa em $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [PHA]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração em pH 7,0

<i>Concentração de PHA / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
6×10^{-4}	$6,02 \times 10^{-4}$
7×10^{-4}	$8,14 \times 10^{-4}$
1×10^{-3}	$1,12 \times 10^{-3}$
$1,5 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-3}$
2×10^{-3}	$1,78 \times 10^{-3}$
3×10^{-3}	$2,32 \times 10^{-3}$
4×10^{-3}	$2,57 \times 10^{-3}$
5×10^{-3}	$3,14 \times 10^{-2}$
6×10^{-3}	$3,37 \times 10^{-3}$
7×10^{-3}	$3,02 \times 10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, a concentração de ATCh e DTNB foi variada em um intervalo de 1×10^{-5} a $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de PHA foi mantida constante em $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 48A mostra as curvas de absorbância *versus* tempo, cujas tangentes representam as velocidades de reação. A ordem de reação e a constante de velocidade de pseudo primeira ordem foram 1 e $7,14 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estas foram obtidas a partir do gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$ (Figura 48B). Para obter a constante de velocidade de reação de segunda ordem é necessário dividir o valor encontrado pela concentração

do reagente que foi mantida fixa, no caso, $[PHA] = 6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, resultando em $1189 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. A constante de velocidade calculada para o PHA em pH 7,0 é cerca de duas vezes menor do que aquela calculada para o 2-PAM (em pH 8,0); mas vinte vezes maior do que a calculada para a hidrazona (em pH 8,0). Com base nos resultados, foi necessário realizar os estudos cinéticos em pH 8,0 com os mesmos parâmetros que os utilizados para o ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico e para o 2-PAM.

Figura 48 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ e i) $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; mantendo-se a concentração fixa de PHA de $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão Tris pH 7,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com a concentração de ATCh em pH 7,0

<i>Concentração de ATCh / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
1×10^{-5}	$9,35 \times 10^{-5}$
$2,5 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-4}$
5×10^{-5}	$4,72 \times 10^{-4}$
7×10^{-5}	$5,54 \times 10^{-4}$
1×10^{-4}	$8,22 \times 10^{-4}$
2×10^{-4}	$1,56 \times 10^{-3}$
3×10^{-4}	$2,87 \times 10^{-3}$
5×10^{-4}	$4,07 \times 10^{-3}$
6×10^{-4}	$4,90 \times 10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

O sistema reacional foi analisado, posteriormente, em pH 8,0. Primeiramente, variou-se a concentração de PHA em um intervalo de 6×10^{-4} a $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo constante a concentração de ATCh em $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sob condição de cinética de pseudo ordem um. A Figura 49A mostra as curvas de absorbância *versus* tempo obtidas a partir do método de Ellman, fixando-se o comprimento de onda em 412 nm. Percebe-se que a partir de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a velocidade da reação começa a ficar constante. O gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$ (Figura 49B) foi obtido por meio das tangentes das curvas da Figura 49A, e o ajuste linear foi feito até o valor correspondente a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PHA, já que a partir deste a velocidade não apresentou efeito significativo com aumento da concentração. A Tabela 8 mostra que a velocidade aumentou com o aumento da concentração de 2-PAM, tornando-se constante a partir de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A ordem de reação obtida foi 1, o que está de acordo com as condições experimentais estabelecidas de pseudo ordem um, a constante de velocidade obtida foi de $5,37 \text{ s}^{-1}$. Transformando a constante de velocidade de primeira em segunda ordem, obteve-se $10752 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Os resultados mostraram que em pH 8,0 a reação é mais rápida, provavelmente devido ao número superior de grupos funcionais desprotonados, o que torna o ataque nucleofílico da ATCh mais eficiente.

Figura 49 - A) Efeito da concentração do polímero PHA a) $6,0 \times 10^{-4}$, b) $7,0 \times 10^{-4}$, c) $1,0 \times 10^{-3}$, d) $1,5 \times 10^{-3}$, e) $2,0 \times 10^{-3}$, f) $3,0 \times 10^{-3}$, g) $4,0 \times 10^{-3}$, h) $5,0 \times 10^{-3}$, i) $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; mantendo-se a concentração de ATCh fixa em $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln [PHA]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração em pH 8,0

<i>Concentração de 2-PAM / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
6×10^{-4}	$4,04 \times 10^{-3}$
7×10^{-4}	$4,32 \times 10^{-3}$
1×10^{-3}	$6,40 \times 10^{-3}$
$1,5 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-2}$
2×10^{-3}	$1,25 \times 10^{-2}$
3×10^{-3}	$1,87 \times 10^{-2}$
4×10^{-3}	$2,36 \times 10^{-2}$
5×10^{-3}	$3,20 \times 10^{-2}$
6×10^{-3}	$3,34 \times 10^{-2}$

Fonte: Autoria própria.

A próxima etapa consistiu em variar a concentração de ATCh em um intervalo de 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹, mantendo constante a concentração de PHA em 6×10^{-3} mol L⁻¹ (pseudo ordem 1) em pH 8,0. A Figura 50A mostra as curvas de absorbância *versus* tempo, cujas tangentes representam as velocidades de reação. As velocidades de reação estão mostradas na Tabela 9. A ordem de reação e a constante de velocidade de pseudo primeira ordem foram calculadas a partir do gráfico de $\ln v$ *versus* $\ln c$ (Figura 50B), sendo estas 1 e 83,20 s⁻¹, respectivamente. A constante de velocidade de reação de segunda ordem foi obtida dividindo-se o valor encontrado pela concentração do reagente que foi mantida fixa ([PHA] = 6×10^{-3} mol L⁻¹), resultando em 13867 mol⁻¹ L s⁻¹. A constante de velocidade calculada para o PHA em pH 8,0 é cerca de 5 vezes maior do que aquela calculada para o 2-PAM (em pH 8,0); e 232 vezes maior do que a calculada para a hidrazona (em pH 8,0). Os resultados mostraram que o polímero híbrido PHA foi a molécula mais eficiente entre aquelas analisadas, catalisando a hidrólise da ATCh de forma mais eficiente, além de ter interagido com o paraoxon, o que não foi observado com as demais moléculas propostas.

Figura 50 - A) Efeito da concentração de ATCh a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,5 \times 10^{-5}$, c) $5,0 \times 10^{-5}$, d) $7,0 \times 10^{-5}$, e) $1,0 \times 10^{-4}$, f) $2,0 \times 10^{-4}$, g) $4,0 \times 10^{-4}$, h) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, mantendo-se a concentração fixa de PHA de 6×10^{-3} mol L⁻¹ em tampão Tris pH 8,0. B) Gráfico de $\ln v$ versus $\ln [ATCh]$.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Velocidade da reação catalisada por PHA e a relação com sua concentração de ATCh pH 8,0

<i>Concentração de ATCh / mol L⁻¹</i>	<i>Velocidade / s⁻¹</i>
1×10^{-5}	$7,58 \times 10^{-4}$
$2,5 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-3}$
5×10^{-5}	$3,30 \times 10^{-3}$
7×10^{-5}	$4,49 \times 10^{-3}$
1×10^{-4}	$5,99 \times 10^{-3}$
2×10^{-4}	$1,21 \times 10^{-2}$
4×10^{-4}	$2,62 \times 10^{-2}$
5×10^{-4}	$4,81 \times 10^{-2}$

Fonte: Autoria própria

4.10 Cálculos Teóricos

O polímero PHA é descrito como um nanoreator por apresentar cavidades que se assemelhariam aos sítios ativos das enzimas. Como verificado pelas demais técnicas experimentais, o PHA executa as mesmas reações que a enzima AChE: a aceleração da hidrólise da ATCh e interação com os pesticidas organofosforados. Diante de tais evidências experimentais, é interessante verificar como tais interações ocorrem na cavidade reacional, o que pode ser viabilizado por meio de cálculos teóricos.

Primeiramente, as estruturas das moléculas ATCh e paraoxon foram construídas com base em dados publicados na literatura e otimizadas.^{74; 91} Todos os cálculos foram realizados considerando a fase gasosa. A Figura 51A mostra a estrutura da ATCh de menor energia, ou seja, mais estável; e a Figura 51B mostra a do paraoxon.

Figura 51 - Estruturas moleculares obtidas por cálculos computacionais A) acetiltiocolina e B) paraoxon.

Fonte: Autoria própria.

A estrutura do PHA foi obtida considerando apenas um fragmento da cadeia do polímero, formado por duas extremidades contendo grupos funcionais acrilamida, sendo essa a unidade que se repete na cadeia estrutural do polímero; além de dois grupos funcionais entre as duas acrilamidas, os ácidos carboxílico e hidroxâmico, que constituem a unidade reacional. Como tal estrutura não estava disponível na literatura, foi necessário construí-la. Primeiramente, construiu-se a estrutura de um hidrocarboneto genérico, posteriormente otimizada. Depois os grupos funcionais, acrilamida, ácido carboxílico e hidroxâmico foram adicionados.

O PHA foi obtido a partir do precursor poliacrilamida, que por sua vez foi gerado sem controle estrutural, ou seja, seus grupos estão dispostos tanto do mesmo lado, como alternados. Desta forma, várias estruturas conformacionais do PHA foram construídas, e posteriormente, calculadas. As estruturas estão mostradas na Figura 52 sendo que a de maior energia possui os grupos ácidos carboxílicos e hidroxâmicos do mesmo lado (Figura 52A) e o de menor possui os grupos alternados (Figura 52D). Aquelas com energias intermediárias estão representadas em B e C.

Figura 52 - Configurações moleculares do PHA obtidas a partir de cálculos teóricos com ordem decrescente de energia de A para D, sendo D a mais estável.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 10 mostra os valores de energia obtidos a partir dos cálculos teóricos para as diferentes estruturas do PHA. A relação entre a configuração dos polímeros com a energia calculada está relacionada com as distâncias entre os grupos funcionais. No caso do polímero A, cujos grupos ácido carboxílico e hidroxâmico estão do mesmo lado, verificou-se que a distância entre o oxigênio da carbonila do ácido carboxílico e o nitrogênio do ácido hidroxâmico é 2,898 Å, enquanto no polímero B é 5,680 Å, em C é 3,066 Å e em D 6,220 Å. Diante de tais valores, é possível notar que o polímero A com maior energia possui a menor distância mencionada; assim como D, o mais estável, tem a maior energia, o que minimiza a repulsão entre os grupos. Outras análises foram feitas, como a distância entre o nitrogênio do ácido hidroxâmico e o oxigênio da hidroxila do ácido carboxílico, os valores encontrados foram: 4,327 Å (A), 4,215 Å (B), 5,061 Å (C) e 6,183 Å (D). Mais uma vez, os polímeros de menor energia, C e D, exibiram maiores distâncias entre os grupos mencionados. Por fim, a distância entre o oxigênio da carbonila do ácido hidroxâmico e o oxigênio do ácido carboxílico foi analisada: 4,530 Å, 5,630 Å (B), 6,371 Å (C) e 5,562 Å (D). O mesmo comportamento foi observado, o que levou à constatação de que a energia superior dos polímeros A e B estão relacionadas com as menores distâncias entre os grupos funcionais, resultando na repulsão entre eles.

Tabela 10 - Valores de energia obtidos para as diferentes estruturas conformacionais do polímero PHA mostrados na Figura 52

<i>Polímero PHA</i>	<i>Energia /eV</i>
A	-30614,68781624
B	-30614,78964324
C	-30614,94903412
D	-30615,03385887

Fonte: Autoria própria.

4.10.1 Cálculos teóricos relacionados com a interação entre o polímero PHA e a ATCh

Apesar da pequena diferença energética entre as diferentes configurações do PHA, duas estruturas (a de maior e a de menor energia) foram selecionadas para o estudo da interação entre as moléculas ATCh com o polímero PHA. As duas estruturas selecionadas diferem principalmente na orientação entre os radicais ácido carboxílico e hidroxâmico, que possuem a mesma orientação na configuração de maior energia (Figura 52A), ou estão em lados opostos na de menor energia (Figura 52D). Os cálculos teóricos relacionados à interação entre ATCh e PHA foram realizados retirando um próton do PHA, já que a condição experimental é realizada em PH 8,0, ou seja, há desprotonação do grupo ácido carboxílico. No entanto, o sistema total estava neutro, considerando que a ATCh tem carga positiva, pois é uma amina quaternária.

Diferentes possibilidades relacionadas com as interações entre o ATCh com o PHA foram avaliadas, tanto com a estrutura do PHA de alta, como de baixa energia. A Figura 53 mostra os resultados das simulações entre o PHA e a ATCh. As figuras foram dispostas em ordem decrescente de energia de A a J, sendo então J a de menor energia e, portanto, mais estável. As configurações representam como as moléculas se aproximam umas das outras. Além disso, destaca-se que o ácido carboxílico encontra-se desprotonado e o ácido hidroxâmico protonado, caracterizando as condições reacionais em pH 8,0. As Figuras 53A e 53B representam o polímero PHA de maior energia, ou seja, os grupos reacionais estão localizados do mesmo lado; e como a ATCh se aproxima dele. Verifica-se que em ambas, a carbonila da ATCh (que sofrerá o ataque nucleofílico do ácido hidroxâmico) está longe do nucleófilo, o que dificulta a execução de tal reação. As Figuras 53C e 53D exibem as estruturas de menor energia do PHA, ou

seja com grupos funcionais de lados opostos, e sua interação com a ATCh, que se aproxima do carboxilato do polímero pelo grupo carregado positivamente (nitrogênio quaternário), resultando em um afastamento ainda maior da carbonila da ATCh; dificultando a reação entre os dois e explicando a energia mais elevada.

As Figuras 53E e 53F correspondem ao PHA de menor energia interagindo com a ATCh, e o carboxilato é quem está mais próximo do grupo positivo da ATCh, resultando em uma configuração que afasta o ácido hidroxâmico do PHA da carbonila da ATCh. As Figuras 53G e 53H mostram o PHA de maior energia cujas configurações da ATCh levam ao afastamento da carbonila e aproximação do grupo positivo.

No entanto, a Figura 53I representa o PHA de menor energia cuja configuração seria a mais favorável em relação às demais deste tipo de polímero. O que leva a crer que primeiro há uma aproximação do nitrogênio quaternário positivo ao centro negativo carboxilato, para depois ocorrer o ataque nucleofílico realizado pelo ácido hidroxâmico à carbonila da ATCh. A configuração mais estável (de menor energia), relacionada ao modo que as espécies aproximam-se para resultar em uma reação, está apresentada na Figura 53J. Nela, a carbonila da ATCh está mais próxima ao ácido hidroxâmico, assim como o nitrogênio quaternário positivo da ATCh está mais próximo do carboxilato do PHA de maior energia. Tal geometria pode levar a especulações de que a reação entre o PHA e a ATCh é mais favorável quando os grupos funcionais carboxilato e ácido hidroxâmico estão do mesmo lado, apesar da configuração ser mais energética. O “encaixe” entre o PHA e a ATCh é mais efetivo em tais condições. As energias referentes a cada configuração estão representadas na Tabela 11 em ordem decrescente.

Figura 53 - Resultados dos cálculos teóricos relacionados à interação entre o PHA de maior e menor energia com a ATCh. As figuras estão dispostas em ordem decrescente de energia sendo *A* a mais energética e *J* a de menor energia (mais estável).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Valores de energia em ordem decrescente obtidas para as diferentes configurações relacionadas com a aproximação do PHA com a ATCh

<i>Configuração</i>	<i>Energia / eV</i>
Figura 53A	-52532,81128142
Figura 53B	-52532,86445418
Figura 53C	-52532,99039766
Figura 53D	-52533,12357119
Figura 53E	-52533,13161293
Figura 53F	-52533,16801309
Figura 53G	-52533,18558862
Figura 53H	-52533,25976357
Figura 53I	-52533,32918843
Figura 53J	-52533,33303533

Fonte: Autoria própria.

4.10.2 Cálculos teóricos relacionados com a interação entre o polímero PHA e o paraoxon

Os cálculos referentes à aproximação do PHA com o paraoxon foram feitas de modo a considerar tanto o ácido carboxílico, como o hidroxâmico desprotonados para simular as condições em pH 10,0, na qual que foram realizados os experimentos. Deste modo, o PHA apresenta duas cargas negativas, enquanto que o paraoxon é neutro; e a carga total do sistema é negativa. As Figuras 54A e 54B mostram as configurações mais

energéticas e, portanto, menos prováveis. Na Figura 54A, o PHA está representado em sua forma menos energética, ou seja, com os grupos carboxilato e hidroxamato em lados opostos. O paraoxon aproxima-se de modo que o grupo *p*-nitrofenil está muito próximo do carboxilato (menor distância em relação às demais configurações mostradas), levando à repulsão entre os grupos dificultando aproximação do paraoxon ao PHA. O grupo hidroxamato, o mais nucleofílico, está distante em tal configuração, o que dificultaria a reação.

Já na Figura 54B, o PHA é o mais energético, consequentemente menos estável, pois apresenta os grupos carboxilato e hidroxamato do mesmo lado. O átomo de fósforo que sofrerá o ataque nucleofílico está posicionado em uma distância intermediária entre o carboxilato e o hidroxamato. No entanto, o *p*-nitrofenil está ocupando uma posição relativamente próxima de tais grupos funcionais, o que poderia dificultar a aproximação com o polímero.

A Figura 54C exibe o PHA de menor energia, o paraoxon se aproxima com o grupo *p*-nitrofenil do hidroxamato, que é um nucleófilo mais forte que o carboxilato. O anel aromático está muito afastado do hidroxamato, o que evidencia a necessidade do carboxilato na reação; já que apesar da distância entre o grupo aromático e o nucleófilo, tal configuração não é a mais favorável.

A Figura 54D apresenta o PHA de maior energia. Neste caso, a configuração está relacionada com a aproximação do paraoxon ao grupo carboxilato, que é um nucleófilo mais fraco que o hidroxamato.

As Figuras 54E e F também apresentam o PHA de menor energia. Na Figura 54E, o fósforo do paraoxon está mais próximo do grupo carboxilato, porém muito distante do hidroxamato. O anel aromático também está distante do hidroxamato, o que mostra que ambos os grupos tem que participar da aproximação com o paraoxon. Características similares aparecem na Figura 54F, no entanto a distância entre o fósforo e o carboxilato é menor que em E, explicando a estabilidade em relação a E.

Ambas as Figuras 54G e H abordam o PHA de menor energia, nelas o fósforo está mais perto do hidroxamato e o distante do *p*-nitrofenil, minimizando a repulsão entre eles. A distância menor com o hidroxamato mostra que este grupo desempenha um papel muito mais eficiente na reação do que quando o carboxilato está mais próximo. O que diferencia a Figura G da H é a distância entre o oxigênio do hidroxamato (nucleófilo) do grupo etil do paraoxon, que é maior em H, ou seja, diminui o impedimento estérico, facilitando o ataque do oxigênio ao fósforo.

No entanto, a Figura 54I que apresenta o PHA de maior energia, exibiu menor energia em relação à aproximação do paraoxon, o que leva à constatação de que quando os grupos hidroxamato e carboxilato estão do mesmo lado, a reação é favorecida.

As energias obtidas nos cálculos relacionados com a aproximação entre o PHA com o paraoxon estão mostradas na Tabela 12.

Figura 54 - Resultados dos cálculos teóricos relacionados à interação entre o PHA de maior e menor energia com o paraoxon. As figuras estão dispostas em ordem decrescente de energia sendo A a mais energética e I a de menor energia (mais estável).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Valores de energias obtidas para as diferentes configurações relacionadas com a aproximação do PHA com o paraxon

<i>Configuração</i>	<i>Energia / eV</i>
Figura 54A	-64282,35947911
Figura 54B	-64282,72774172
Figura 54C	-64282,79335098
Figura 54D	-64282,85956773
Figura 54E	-64282,88940214
Figura 54F	-64282,90008869
Figura 54G	-64282,94667409
Figura 54H	-64282,9621406
Figura 54I	-64283,00034324

Fonte: Autoria própria.

4.11 Imobilização da molécula biomimética na superfície do eletrodo impresso descartável (SPE)

O polímero PHA foi a molécula sintética escolhida para mimetizar o comportamento da AChE em um dispositivo eletroquímico para detecção de pesticidas organofosforados. No entanto, o PHA é altamente hidrofílico e consequentemente solúvel em água, o que dificulta sua imobilização na superfície eletródica. Em virtude das propriedades do PHA, a etapa de imobilização foi uma das mais desafiadoras do projeto.

Diversas estratégias foram verificadas, e a mais adequada foi a utilização do polímero mPEG, cuja interação com a poliacrilamida leva à formação de uma blenda, como descrito por Lue *et al.* (2010),⁹² que utilizou o polietileno glicol (PEG), de estrutura muito similar. Uma blenda polimérica é definida como uma mistura macroscopicamente homogênea de dois ou mais polímeros diferentes, originando um novo material com propriedades diferentes.⁹³

De acordo com Lue *et al.* (2010)⁹², a cadeia molecular da poliacrilamida interage com o PEG por meio de ligação hidrogênio entre os grupos amida da PAA e éster do PEG, em solução aquosa relativamente concentrada (Figura 55A). Ao mesmo tempo, as cadeias moleculares da PAA preferem se torcer para formar novelos, especialmente quando o peso molecular é elevado. Portanto, a interação entre a PAA e o PEG não é feita exclusivamente por ligação hidrogênio entre a amida e o éter, mas também as cadeias moleculares do PEG se agregam em torno dos novelos de PAA através de ligações hidrogênio entre os grupos éter e grupos amida parciais da PAA, como mostrado na Figura 55B.

O mesmo princípio de interação deve ocorrer com o polímero híbrido PHA e o mPEG, considerando que a cadeia molecular do PHA é formada, majoritariamente, por poliacrilamida.

Figura 55 - A) Ligação hidrogênio entre os grupos funcionais amida e éter da PAA e do PEG em água, respectivamente. B) Esquema da interação entre PAA, PEG em água.

Fonte: Adaptação de Sgobbi (2016) a partir de LUE, T., 2010, p. 2580.⁹²

Para verificar a interação entre o mPEG e o PHA; e a consequente formação de uma blenda, várias técnicas de caracterização foram utilizadas. Primeiramente, foram obtidas micrografias a partir da microscopia eletrônica de varredura com canhão de efeito de campo (MEV-FEG) a partir de diferentes magnitudes de ampliação dos polímeros PHA 2% w/v puro (Figuras 56 A e B), mPEG 2% w/v puro (Figura 56C e D), e da blenda contendo 2% w/v na proporção 50% de PHA e mPEG (Figuras 56 E-H). A partir das micrografias foi possível analisar a morfologia de tais amostras e verificar que o PHA exibe morfologia com aspecto vítreo, característica da poliacrilamida precursora do PHA. Entretanto, o mPEG possui morfologia homogênea e lisa contrastando com aquela apresentada pelo PHA. A mistura de 50% mPEG e 50% PHA levou à formação de uma blenda com características morfológicas extremamente distintas daquelas exibidas pelos polímeros puros, observando-se estruturas aparentemente cristalinas. Observa-se que nas Figuras 56 E-H supostamente houve a formação de duas fases; o que é condizente com as características de algumas blendas ditas imiscíveis.⁹⁴

Figura 56 - Micrografias obtidas por MEV-FEG com diferentes magnitudes de ampliação A) polímero PHA 2% w/v 400x, B) polímero PHA 2% w/v 800x, C) polímero mPEG 2% w/v 400x, D) polímero mPEG 2% w/v 800x, E) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 400x, F) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 800x, G) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 2000x, e H) blenda 2% w/v contendo 50:50 mPEG/PHA 3200x.

Fonte: Autoria própria.

A caracterização da blenda mPEG/PHA foi realizada por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C em D_2O . Para isso, a comparação entre os espectros de mPEG e PHA puros foi necessária, como mostrado na Figura 57 e Figura 58. De acordo com Lue *et al.* (2010),⁹² a formação da blenda entre o PEG e a poliacrilamida ocorre por ligação de hidrogênio a partir da interação entre o hidrogênio da amida e do oxigênio do éter. Neste caso, o pico referente ao deslocamento químico dos hidrogênios do éter no PEG em 3,58 ppm se desloca para 3,96 ppm na blenda, o que indicaria a formação da blenda pela presença de ligação de hidrogênio entre os polímeros.

No entanto, neste trabalho foi utilizado o polímero híbrido PHA e o mPEG, o que leva a possíveis diferenças na interação entre as duas moléculas. Comparando os espectros mostrados nas Figuras 57 e 58, nota-se que o espectro da blenda apresentou os mesmos picos presentes nos espectros do mPEG e do PHA, com deslocamentos químicos muito próximos, o que pode significar que neste tipo de blenda as ligações de hidrogênio são mais fracas.

1H NMR spectrum of PHA. The x-axis is 'Deslocamento químico / ppm' (Chemical shift / ppm) ranging from 14 to -2. The y-axis is 'Intensidade normalizada' (Normalized intensity) ranging from 0 to 0.07. The spectrum shows several peaks, with the most prominent ones at 3.24 ppm and 1.55 ppm. Other labeled peaks include 7.65, 7.58, 6.86, 3.58, 3.38, 2.24, 2.09, and 1.67 ppm.

Fonte: Autoria própria.

Figura 58 - Espectros de RMN de ^{13}C do PHA, mPEG e da blenda mPEG/PHA em D_2O .

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, a superfície dos eletrodos SPE não modificado, assim como o SPE modificado com mPEG, PHA e com blenda mPEG/PHA foi caracterizada por MEV-FEG com magnitudes de ampliação de 200 e 800 vezes. A partir da Figura 59A e 59B, pôde-se observar que a superfície do eletrodo sem modificação SPE apresenta

morfologia consideravelmente distinta daquela modificada com PHA (Figura 59 C e D), já que o PHA apresenta aparência vítrea. Quando recoberto apenas com mPEG (Figura 59 E e F), a rugosidade da superfície parece diminuir. E finalmente, quando modificado com a blenda constituída por 2% m/v de mPEG e PHA, há aparentemente formação de um material bifásico distinto dos demais.

Figura 59 - Micrografias obtidas por MEV-FEG da superfície do eletrodo SPE não modificado e do SPE modificado com diferentes magnitudes de ampliação. A) SPE 200x, B) SPE 400x, C) SPE/PHA 200x, D) SPE/PHA 800 x, E) SPE/mPEG 200 x, F) SPE/mPEG 800 x, G) SPE/ mPEG/PHA 200 x, e H) SPE/mPEG/PHA 800 x

Fonte: Autoria própria.

4.12 Caracterização do eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA pelas técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica

O efeito da modificação da superfície do SPE com a blenda mPEG/PHA foi estudado por voltametria cíclica e EIE.

A voltametria cíclica foi realizada em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} a 50 mV s⁻¹, com intervalo de potencial de -0,7 a 1,1 V. A Figura 60A exibe os voltamogramas cíclicos para os eletrodos SPE (—) e SPE/mPEG/PHA (—). Comparando o eletrodo não modificado SPE com o SPE/mPEG/PHA, observou-se que a reversibilidade do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} é muito menor para o eletrodo modificado ($\Delta E = 0,555$ V) em relação a ($\Delta E = 0,474$ V) do SPE. O valor elevado de ΔE exibido pelo eletrodo sem modificação SPE é explicado pelo fato de que tal eletrodo não pode ser polido mecanicamente para evitar a remoção da tinta, portanto o procedimento de limpeza superficial é exclusivamente eletroquímico. Tal comportamento com caráter irreversível é característico em tais sistemas, sendo reprodutível em eletrodos SPE diferentes. O deslocamento do potencial de pico de oxidação E_{pa} em 36 mV para potencial mais positivo em relação ao sistema SPE/mPEG/PHA está associado ao fato de que o SPE foi modificado com um material isolante. No entanto, foi observado um aumento de corrente no sistema modificado, o que está relacionado com o aumento de área superficial promovido pela estrutura morfológica da blenda.

O estudo de EIE foi realizado com a finalidade de obter os valores de resistência à transferência de carga no processo de oxirredução do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} na

superfície dos eletrodos estudados. Os espectros de EIE foram obtidos sob regime de potencial de circuito aberto (OCP), para o eletrodo SPE o valor de OCP foi 0,154 V, e para SPE/mPEG/PHA, OCP de 0,158 V. Os espectros de EIE são mostrados na Figura 60B sob a forma de diagramas de Nyquist, cujo plano complexo leva à formação de um semicírculo em altas e médias frequências, e uma reta em baixas frequências sugerindo um controle difusional.

A análise quantitativa dos sistemas foi realizada por meio do circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$ como mostrado na Figura 60B, onde R_s é a resistência da solução, R_{tc} é a resistência à transferência de carga, Z_w é a impedância de Warburg, e CPE é o elemento constante de fase, representando a capacitância da dupla camada elétrica. As condições experimentais utilizadas nos experimentos de EIE foram descritas na seção 3.12.

A partir dos espectros da Figura 60B foi possível observar que o eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA apresentou maior tamanho de semicírculo que o SPE, indicando maior valor de resistência à transferência de carga R_{tc} . O aumento de R_{tc} está relacionado com a modificação do eletrodo SPE com um material não condutor, o que dificulta a transferência eletrônica entre a solução e a superfície do eletrodo modificado. A Tabela 13 mostra os parâmetros obtidos a partir do ajuste dos espectros utilizando o *software Electrochemistry-Zview2*.

Figura 60 - Em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ foram obtidos os A) Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo sem modificação SPE e ao eletrodo SPE/mPEG/PHA, a 50 mV s⁻¹. B) Diagramas de Nyquist para o eletrodo SPE não-modificado e o SPE/mPEG/PHA, realizados em regime OCP, com faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV de amplitude. Inserção: Circuito de Randles utilizado como modelo.

Tabela 13 – Dados obtidos a partir dos diagramas de Nyquist da Figura 60B

<i>Eletrodos</i>	R_{tc} / Ω	$CPE / \mu F$
SPE	3325	0,64
SPE/mPEG/PHA	4238	0,60

Fonte: Autoria própria.

4.13 Desempenho eletroquímico do sensor biomimético SPE/mPEG/PHA

O eletrodo impresso modificado com a molécula biomimética foi acoplado a um potenciostato por meio de um conector apropriado. O volume de eletrólito suporte utilizado para cobrir a área contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e o pseudo referência foi de 50 μ L. A redução do volume de solução utilizado nas análises mostra um avanço para possível aplicação em campo. A Figura 61 apresenta o sistema contendo o eletrodo impresso modificado, assim como a gota de eletrólito suporte cobrindo sua superfície, e por fim, a conexão entre o SPE e o potenciostato.

Figura 61 - Fotografias relacionadas ao eletrodo impresso SPE modificado com mPEG/PHA: A) superfície contendo 50 μ L de eletrólito suporte e B) conector utilizado para acoplamento ao potenciostato.

Fonte: Autoria própria.

Em primeiro lugar, foi necessário investigar se o PHA realmente estava sendo responsável pela catálise da hidrólise do substrato ATCh, ao invés de ocorrer hidrólise espontânea. Para isso, a solução de ATCh foi preparada no momento do uso e gotejada sobre o eletrodo SPE sem modificação. Em seguida, foi obtido o voltamograma de pulso diferencial de 4,0 mmol L⁻¹ no *tempo zero*, ou seja, subsequentemente ao se

adicionar os 50 μL da solução de ATCh sobre a superfície do SPE, realizando então a medida de voltametria de pulso diferencial. Após 20 min, outro voltamograma foi obtido. Por comparação, a mesma concentração de ATCh foi analisada utilizando-se o eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA, no tempo zero e 20 min. Os voltamogramas de pulso diferencial são mostrados na Figura 62, sendo que os voltamogramas em vermelho representam o eletrodo SPE sem modificação cujo efeito da hidrólise espontânea foi avaliado. A linha pontilhada vermelha representa o tempo zero e a linha sólida vermelha, a medida de VPD realizada após 20 min; a partir de tais resultados pôde-se verificar que não houve formação de um pico definido referente à oxidação da TCh, o que significa que no tempo estudado não há hidrólise espontânea considerável do substrato ATCh. Em contrapartida, os voltamogramas em azul estão associados com a resposta de corrente do eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA, em que é notável a formação de um pico em cerca de 0,46 V tanto no tempo zero, como após 20 min, havendo aumento da corrente com o tempo. Tal resultado leva à constatação de que o PHA está realmente catalisando a hidrólise da ATCh nas condições estudadas. O voltamograma em preto representa a medida de VPD realizada na ausência de ATCh, ou seja, é o branco relacionado à resposta eletroquímica em tampão BR pH 8,0.

Figura 62 - Voltamogramas de pulso diferencial de $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ATCh em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 após 0 min (linha pontilhada) e 20 min (linha sólida) de incubação com o substrato para o eletrodo não modificado SPE (vermelho) e o eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA (azul).

Fonte: Autoria própria.

O desempenho eletroquímico do eletrodo modificado SPE/mPEG/PHA foi analisado primeiramente em relação à interação com a ATCh. Tal interação está

associada com a formação de TCh gerada a partir da hidrólise da ATCh catalisada pelo PHA, de forma similar à enzima AChE. Primeiramente, o sistema SPE/mPEG/PHA foi condicionado em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 por sucessivos ciclos a 50 mV s⁻¹, no intervalo de potencial de 0,0 a 1,0 V até a estabilização do perfil voltamétrico. Em seguida, utilizou-se a técnica de VPD para verificar a formação de TCh em solução. O intervalo de concentração de ATCh analisado foi 1,0 a 10,0 mmol L⁻¹. As soluções de ATCh foram preparadas em tampão BR pH 8,0, uma vez que os estudos espectrofotométricos efetuados em tal condição resultaram em um desempenho adequado para o polímero PHA catalisar a hidrólise da ATCh, já que o grupo ácido carboxílico está desprotonado. O tempo necessário para que a ATCh fosse hidrolisada foi verificado para cada concentração, medindo-se a resposta voltamétrica no momento em que a solução de ATCh foi adicionada ao sistema SPE/mPEG/PHA, sendo este denominado *tempo zero*. O intervalo de tempo estudado foi de 40 min, obtendo-se um voltamograma a cada 10 min. As Figuras 63 A-G mostram a oxidação da TCh formada a partir da hidrólise do ATCh no intervalo de tempo de 0 a 40 min. Em todas as Figuras 63 de A a G, observou-se que no tempo zero houve um aumento de corrente entre 0,2 a 0,6 V que pode estar relacionado com a formação de TCh que ocorre quando a ATCh entre em contato com o PHA. Com o aumento do tempo para 10min, obteve-se o voltamograma de pulso diferencial em azul (c) para cada concentração de ATCh; aqui nota-se que houve a formação de um pico mais definido relacionado com a oxidação da TCh em 0,46 V. Aumentando o tempo para 20 min, a corrente de em 0,46 V aumenta e estabiliza quando comparada aos tempos de 30 e 40 min. Em virtude disso, o tempo de 20 min foi estabelecido para os demais experimentos como o tempo em que o PHA catalisou completamente a ATCh adicionada.

Figura 63 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em (a) tampão BR 0,1 mmol L⁻¹ pH 8,0 em diferentes tempos (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 20 min, (e) 30 min e (f) 40 min para diferentes concentrações de ATCh: A) 1,0 ; B) 2,0 ; C) 4,0; D) 5,0; E) 6,0; F) 8,0; e G) 10,0 mmol L⁻¹.

Fonte: Autoria própria.

Após a otimização das condições experimentais, medidas de cronoamperometria foram realizadas para obtenção da curva de analítica referente à variação da concentração de ATCh. Como o eletrodo utilizado foi do tipo SPE, foi necessário preparar diferentes soluções com as concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; e 10,0 mmol L⁻¹ de ATCh. Os registros de corrente em relação ao tempo foram adquiridos aplicando-se 0,5 V por 60 s e entre cada nova concentração de ATCh, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada (Figura 64A). A Figura 64B exibe a relação linear da variação da concentração de ATCh com o aumento da corrente, representada pela equação $I \text{ (A)} = 5,73 \times 10^{-4} C \text{ (mol L}^{-1}) + 7,35 \times 10^{-8}$ ($R^2 = 0,9967$), em que C é a concentração de ATCh. A sensibilidade correspondente, determinada pelo coeficiente angular da curva analítica linear foi $5,73 \times 10^{-4} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$. O LOD foi calculado de acordo com a equação 3, ou seja, três vezes o valor do desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente angular da curva analítica, obtendo-se o valor de $2,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O valor de LOD obtido relacionado à ATCh foi comparado com alguns apresentados na literatura que utilizaram biossensores enzimáticos (Tabela 14). Como pôde ser observado, o LOD obtido para o eletrodo modificado com a molécula biomimética PHA foi inferior ou análogo a alguns presentes na literatura, o que evidencia que a sistema biomimético aqui descrito pode funcionar analogamente à enzima. Além disso, o potencial de oxidação obtido para a TCh foi inferior àqueles reportados em 100 mV, minimizando a resposta de espécies interferentes em relação aos sistemas citados na Tabela 14. O intervalo de concentração de ATCh analisado está relacionado com as concentrações utilizadas nos biossensores que utilizam a enzima AChE.^{21; 22; 95; 96} Nota-se que, geralmente, a concentração de ATCh utilizada em

biossensores para detecção indireta de pesticidas é alta, já que é necessário obter um sinal de corrente elevado, pois as medidas posteriores com o pesticida serão baseadas na diminuição de tal corrente medida inicialmente na ausência de tais espécies. Diante de tais considerações, a concentração de $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi escolhida para os ensaios realizados com o pesticida paraoxon, como descrito na próxima seção. Os valores obtidos relacionados à diminuição da corrente para cada valor de concentração foram calculados a partir da média de três medidas utilizando o mesmo eletrodo.

Figura 64 - A) Cronoamperogramas relacionados com o aumento da concentração de ATCh no intervalo de $1,0$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH $8,0$; potencial aplicado de $0,5 \text{ V}$ por 60 s . B) Curva analítica relacionada ao aumento da corrente com o aumento da concentração de ATCh empregando o eletrodo SPE/mPEG/PHA.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 – Comparação entre os parâmetros analíticos do eletrodo SPE/mPEG/PHA e outros descritos na literatura

<i>Eletrodos</i>	<i>LOD</i> (mol L^{-1})	<i>Intervalo de</i> <i>Concentração</i> (mmol L^{-1})	<i>Sensibilidade</i> ($\text{A mol}^{-1}\text{L}$)	<i>E_p</i> (mV)	<i>Referência</i>
GCE/QCdS-PVP/AChE	5×10^{-6}	0,02-0,7	0,0724	600	97
AChE-CMC/GCE	$1,0 \times 10^{-7}$	0,002-0,4	-	660	98
SPE/mPEG/PHA	$2,2 \times 10^{-7}$	1,0 – 10,0	$5,73 \times 10^{-4}$	460	Presente Trabalho

GCE/QCdS-PVP/AChE: Eletrodo de carbono vítreo modificado com quantum dot de CdS recoberto com poli(N-vinil-2-pirrolidona) e acetilcolinesterase

AChE-CMC/GCE: Eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de nanotubo de carbono e quitosana e acetilcolinesterase

Fonte: Autoria própria

4.14 Aplicação do eletrodo SPE/mPEG/PHA na detecção do pesticida organofosforado paraoxon por método amperométrico

A partir das condições ótimas estabelecidas nos estudos anteriores, foi utilizada a concentração fixa de $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ATCh. A medida relacionada à interação entre o paraoxon e a molécula biomimética PHA foi baseada na detecção da resposta de corrente do substrato ATCh na ausência de pesticida (corrente inicial I_0), e a posterior detecção da corrente do substrato após a incubação em solução contendo o pesticida. A solução de paraoxon foi preparada em tampão Borax $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0; tal condição foi escolhida pois quando adicionado ao eletrodo contendo a molécula biomimética PHA, esta fica totalmente desprotonada, aumentando sua reatividade em relação ao paraoxon, como exemplificado pelos estudos espectrofotométricos descritos anteriormente. O período de incubação com o pesticida foi de 20 min.

A Figura 65A mostra a resposta de corrente em função do tempo na ausência de pesticida e a diminuição de tal resposta após a interação do PHA com o paraoxon, coletada no tempo de 60 s. O intervalo de concentração de paraoxon estudado foi de $1,0$ a $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de inibição (Figura 65B) foi obtida convertendo a diminuição de corrente observada em porcentagem de inibição dada pela equação $I(\%) = I_0 - I_1 / I_0$, em que I_0 é a corrente inicial na ausência de pesticida e I_1 é a corrente obtida após a interação com o pesticida. A equação da reta obtida foi $I(\%) = [4,80 \times 10^6 C (\text{mol L}^{-1}) + 0,8169] \times 100$ ($R^2 = 0,99969$). O LOD calculado de mesmo modo que o efetuado na seção anterior foi de $3,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (99,9 ppb). Os valores obtidos relacionados à diminuição da corrente para cada valor de concentração foram calculados a partir da média de três medidas utilizando o mesmo eletrodo. Neste caso, o processo de inibição pode estar associado com o ataque nucleofílico realizado pelos grupos funcionais do PHA, em que o fósforo do paraoxon permanece ligado a parte dos grupos, liberando o *p*-nitrofenol; e se assemelhando ao mecanismo de inibição enzimático. Em contrapartida, interações intermoleculares entre o PHA e o pesticida podem ter levado ao processo de diminuição da corrente observada.

Figura 65 - A) Resposta cronoamperométrica do eletrodo SPE/mPEG/PHA polarizado em 0,5 V em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 contendo $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ATCh (curva preta), e após a incubação com diferentes concentrações de paraoxon, $1,0$ a $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: Ampliação da região entre 35 e 60 s.

B) Curva de calibração relacionada à diminuição da corrente com o aumento da concentração de o paraoxon

Fonte: Autoria própria.

4.15 Ensaio de recuperação

Para a realização dos ensaios de recuperação, amostras de água de abastecimento foram coletadas diretamente da torneira dos laboratórios de pesquisa (GMEME). Soluções fortificadas preparadas pela adição de 500 μL de amostra em 1000 μL de tampão Borax pH 10,0 e além de 500 μL de solução de pesticida, totalizando 2000 μL de solução do pesticida com concentração final conhecida. Sobre a superfície do eletrodo modificado adicionou-se 50 μL da solução fortificada por um tempo de incubação de 20 min, como otimizado anteriormente. O percentual de inibição foi calculado para determinação das recuperações. As concentrações conhecidas de paraoxon foram 3,0; 6,0 e 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 66 mostra os cronoamperogramas relacionados com a diminuição de corrente da solução de 8,0 mmol L^{-1} de ATCh, após a incubação com a amostra fortificada. Os valores de recuperação obtidos para a curva 1 da Figura 66 relacionada com a concentração conhecida de 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de paraoxon foi 115%. Para a curva 2 referente à concentração de 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pesticida, a recuperação foi de 106%. E por fim, para a curva 3, relacionada com a concentração de 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de paraoxon, a recuperação encontrada foi de 94,5%.

Figura 66 - Resposta amperométrica de recuperação das amostras de água de abastecimento fortificadas com concentrações conhecidas de paraoxon (1) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (2) $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (3) $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ATCh em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0.

Fonte: Autoria própria.

5 Conclusões

A necessidade iminente de desenvolver técnicas baratas, miniaturizadas e fáceis de aplicar na determinação de pesticidas em diferentes matrizes aponta para a substituição da enzima acetilcolinesterase, comumente utilizada para o desenvolvimento de biossensores para a quantificação de carbamatos e organofosforados. Esta enzima possui um custo elevado, é instável e sua atividade dificilmente é restaurada após sua utilização. Com isto, sua aplicação prática em determinações em matrizes de alimentos, ambientais, etc. é muito restrita.

Desta forma, neste projeto se investigou a possibilidade de substituí-la por algumas moléculas miméticas que fossem baratas, fáceis de imobilizar em eletrodos descartáveis e que fornecessem respostas rápidas para a detecção dos pesticidas. Inicialmente os estudos apontaram na direção das hidrazonas, como o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e das oximas, como o iodeto de pralidoxima (2-PAM). Estas duas classes de moléculas tiveram êxitos na catálise da hidrólise do substrato enzimático acetiltiocolina, porém não foram convenientes para quantificar os pesticidas organofosforados pela inibição da sua atividade catalítica, pois não apresentaram interação com os pesticidas, como é característico do centro ativo das enzimas colinesterases. Desta forma, elas não se mostraram adequadas para substituir a enzima em biossensores para pesticidas.

Por outro lado, o polímero polihidroxamicalcanoato (PHA), contendo grupos ácido hidroxâmico e ácido carboxílico em sua cadeia, foi uma das moléculas sintéticas avaliadas em virtude do caráter de alfa nucleófilo do ácido hidroxâmico e da importância do ácido carboxílico em diversos processos enzimáticos. De acordo com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico de Ellman, que avaliou o desempenho das moléculas propostas na catálise da hidrólise da acetiltiocolina, o PHA foi 232 vezes mais rápido que o ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e 5 vezes mais rápido que o 2-PAM. O polímero PHA foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo descartável impresso por meio da formação de uma blenda com outro polímero, o mPEG, evitando que o PHA fosse solubilizado. O uso de eletrodos impressos descartáveis proporcionou a redução do volume de amostra utilizado (50 µL), o que torna possível a aplicação da metodologia aqui desenvolvida para possível detecção em tempo real e em campo de pesticidas organofosforados.

Os resultados obtidos pelas técnicas eletroquímicas de VPD e cronoamperometria demonstraram que o sensor biomimético aqui proposto foi adequado para o monitoramento da formação do produto gerado a partir da catálise do substrato ATCh. Além de demonstrar uma forte interação com o pesticida organofosforado paraoxon, tendo sua atividade catalítica para a hidrólise da ATCh diminuída proporcionalmente à concentração de pesticidas no analito investigado.

Para se investigar estas interações, cálculos teóricos foram realizados com a molécula escolhida, o PHA, mostrando que uma dada configuração do polímero (com os grupos funcionais ácido hidroxâmico e ácido carboxílico do mesmo lado da cadeia) interage mais fortemente com o pesticida paraoxon e com a acetiltiocolina, em relação ao PHA com tais grupos funcionais do lado oposto. Tal informação levou à conclusão de que a reação ocorre majoritariamente quando tais grupos estão do mesmo lado da cadeia polimérica, confirmando o comportamento biomimético do polímero híbrido PHA, que contém cavidades em sua estrutura funcionando analogamente aos sítios ativos de uma enzima.

Assim, conclui-se que o PHA pode ser utilizado na confecção de biossensores miméticos mais adequados que o enzimático, para a quantificação do pesticida organofosforado. Além disto, esta molécula é estável, barata, fácil de imobilizar sobre o substrato descartável e, assim, pode permitir a popularização da análise de pesticidas. Entretanto, diferentes parâmetros ainda necessitam de otimização como, por exemplo, o transdutor, que deve ter sua atividade catalítica para a oxidação da tiocolina formada no processo aumentada, visando melhorar a resposta do biossensor mimético e deslocar o potencial de oxidação para valores menos positivos, minimizando a interferência de outras moléculas ou íons oxidáveis. Estes itens serão considerados em trabalhos futuros.

6 Perspectivas

O desempenho do sensor eletroquímico aqui desenvolvido pode ser melhorado a partir de alguns critérios relacionados com a configuração da molécula artificial biomimética.

A utilização do precursor poliacrilamida com peso molecular superior, acima de 100 kDa, simplificaria o procedimento experimental de imobilização do polímero híbrido formado sobre a superfície eletródica, uma vez que sua solubilidade em água se reduziria, descartando a necessidade da adição de outra espécie. A introdução de outros grupos funcionais ao polímero poderia levar ao aumento da reação entre o este e o substrato ATCh, bem como com o pesticida.

O uso de mediador de elétrons levaria ao deslocamento do potencial de oxidação da tiocolina, o que evitaria a resposta de espécies interferentes, melhorando a eficiência do dispositivo.

Referências

- 1 VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 291-307, 2011.
- 2 LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.
- 3 ROBERTS, S. M.; JAMES, R. C.; WILLIAMS, P. L. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. New Jersey: Wiley, 2015. 496 p.
- 4 GUPTA, R. C. **Toxicology of organophosphate and carbamate compounds**. London: Elsevier, 2006. p. 735.
- 5 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.
- 6 CHAMBERS, H. W.; BOONE, J. S.; CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Chemistry of Organophosphorus Insecticides. In: KRIEGER, R. I. K. C. (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 913-917.
- 7 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília: 2014. p. 1-32.
- 8 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.
- 9 AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1405-1423, 2006.
- 10 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification¹. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

- 11 LONG, F.; ZHU, A.; SHI, H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning. **Sensors**, v. 13, n. 10, p. 13928-13948, 2013.
- 12 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- 13 FERRI, S.; KOJIMA, K.; SODE, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 5, n. 5, p. 1068-1076, 2011.
- 14 RASSAEI, L.; OLTHUIS, W.; TSUJIMURA, S.; SUDHÖLTER, E. R.; VAN DEN BERG, A. Lactate biosensors: Current status and outlook. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 1, p. 123-137, 2014.
- 15 PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19-31, 2012.
- 16 GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.
- 17 CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441-456, 2002.
- 18 DZYADEVYCH, S. V.; ARKHYPOVA, V. N.; SOLDATKIN, A. P.; EL'SKAYA, A. V.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. **IRBM**, v. 29, n. 2-3, p. 171-180, 2008.
- 19 EGGINS, B. **Biosensors** - an introduction. New York: Wiley-Teubner, 1996. 212 p.
- 20 MULCHANDANI, A.; CHEN, W.; MULCHANDANI, P.; WANG, J.; ROGERS, K. R. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 4-5, p. 225-230, 2001.
- 21 ANDREESCU, S.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J. L. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, n. 2, p. 171-180, 2002.

- 22 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.
- 23 DU, D.; CHEN, W.; CAI, J.; ZHANG, J.; QU, F.; LI, H. Development of acetylcholinesterase biosensor based on CdTe quantum dots modified cysteamine self-assembled monolayers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 623, n. 1, p. 81-85, 2008.
- 24 KANDIMALLA, V. B.; JU, H. X. Binding of acetylcholinesterase to a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite for flow-injection amperometric detection of an organophosphorous insecticide. **Chemistry- A European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1074-1080, 2006.
- 25 PERIASAMY, A. P.; UMASANKAR, Y.; CHEN, S.-M. Nanomaterials - Acetylcholinesterase Enzyme Matrices for Organophosphorus Pesticides Electrochemical Sensors: A Review. **Sensors**, v. 9, n. 6, p. 4034-4055, 2009.
- 26 SASSOLAS, A.; PRIETO-SIMÓN, B.; MARTY, J. L. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 210-232, 2012.
- 27 MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 1791-1799, 2008.
- 28 WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. Toronto: John Willey & Sons, 2000. 348 p.
- 29 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.
- 30 BUCUR, M.-P.; BUCUR, B.; RADU, G.-L. Critical evaluation of acetylthiocholine iodide and acetylthiocholine chloride as substrates for amperometric biosensors based on acetylcholinesterase. **Sensors**, v. 13, n. 2, p. 1603-1613, 2013.
- 31 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.

- 32 DU, D.; HUANG, X.; CAI, H.; ZHANG, A. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 2, p. 285-289, 2007.
- 33 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 and Bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3692-3695, 2011.
- 34 KIRBY, A. J.; HOLLFELDER, F. **From enzyme models to model enzymes**. Cambridge: Springer, 2009. 273 p.
- 35 SETFORD, S. J.; NEWMAN, J. D. Enzyme biosensors. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Microbial enzymes and biotransformations**. Totowa, NJ: Human Press Inc, 2005. p. 29-60.
- 36 BRESLOW, R. Centenary Lecture: Biomimetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 1, n. 4, p. 553-580, 1972.
- 37 BRESLOW, R. Artificial enzymes. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 532-537, 1982.
- 38 MARCHETTI, L.; LEVINE, M. Biomimetic catalysis. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 9, p. 1090-1118, 2011.
- 39 DONG, Z.; LUO, Q.; LIU, J. Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 23, p. 7890-7908, 2012.
- 40 BRESLOW, R. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design. **Accounts of Chemical Research**, v. 28, n. 3, p. 146-153, 1995.
- 41 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.
- 42 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.
- 43 SARDARLY, N. A.; NAGIEV, T. M. Physicochemical peculiarities of iron porphyrin-containing electrodes in catalase- and peroxidase-type biomimetic sensors. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 83, n. 8, p. 1400-1404, 2009.

- 44 ZAPP, E.; NASCIMENTO, V.; DAMBROWSKI, D.; BRAGA, A. L.; CRUZ VIEIRA, I. Bio-inspired sensor based on glutathione peroxidase mimetic for hydrogen peroxide detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 782-788, 2013.
- 45 ZHANG, F.-T.; LONG, X.; ZHANG, D.-W.; SUN, Y.-L.; ZHOU, Y.-L.; MA, Y.-R.; QI, L.-M.; ZHANG, X.-X. Layered double hydroxide-hemin nanocomposite as mimetic peroxidase and its application in sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 150-156, 2014.
- 46 KURZĄTKOWSKA, K.; SAYIN, S.; YILMAZ, M.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Calix[4]arene derivatives as dopamine hosts in electrochemical sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p. 111-121, 2015.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 GU, Y.; YAN, X.; LIU, W.; LI, C.; CHEN, R.; TANG, L.; ZHANG, Z.; YANG, M. Biomimetic sensor based on copper-poly(cysteine) film for the determination of metronidazole. **Electrochimica Acta**, v. 152, p. 108-116, 2015.
- 50 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 tetrapyrrolineporphyrine as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 734-743, 2008.
- 51 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.
- 52 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.
- 53 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.

- 54 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.
- 55 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.
- 56 BUNCEL, E.; UM, I. H.; TERRIER, F. Hydroxylamine, Oximate and Hydroxamate as α -Nucleophiles in Dephosphorylation. In: **PATAI'S CHEMISTRY OF FUNCTIONAL GROUPS**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p 2-27.
- 57 UM, I. H.; BUNCEL, E. The Origin of the α -Effect: Dissection of Ground-State and Transition-State Contributions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 577-582, 2000.
- 58 FINA, N. J.; EDWARDS, J. O. The alpha effect. A review. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 5, n. 1, p. 1-26, 1973.
- 59 TIWARI, S.; GHOSH, K.; MAREK, J.; KUCA, K. Comparative study of nucleophilic efficacy of pralidoxime towards phosphorus, sulfur and thiophosphorus based esters. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 98, n. 1, p. 91-97, 2009.
- 60 GONÇALVES, A. D. S.; FRANÇA, T. C. C.; WILTER, A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 968-975, 2006.
- 61 CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Organophosphate toxicology: Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 8, p. 983-998, 2004.
- 62 KOVARIK, Z.; ČALIĆ, M.; ŠINKO, G.; BOSAK, A.; BEREND, S.; VRDOLJAK, A. L.; RADIC, B. Oximes: Reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 173-179, 2008.
- 63 SKRINJARIC-SPOLJAR, M.; FRANCISKOVIC, L.; RADIC, Z.; SIMEON, V.; REINER, E. Reaction of imidazolium and pyridium oximes with the cholinesterase substrate acetylthiocholine. **Acta Pharmaceutica**, v. 42, p. 77-83, 1992

- 64 MELLO, R. S.; ORTH, E. S.; LOH, W.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Polymers Containing Hydroxamate Groups: Nanoreactors for Hydrolysis of Phosphoryl Esters. **Langmuir**, v. 27, n. 24, p. 15112-15119, 2011.
- 65 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.
- 66 NENAJDENKO, V. G.; KOROTCHENKO, V. N.; SHASTIN, A. V.; BALENKOVA, E. S. Conversion of arylalkylketones into dichloroalkenes: 1-Chloro-4-(2,2-dichloro-1-methyl vinyl)benzene. **Organic Syntheses**, v. 82, p. 93-98, 2005.
- 67 SGOBBI, Livia Flório. **Potencialidades do ácido 4-[(1E)etanohidrazonoil]benzóico como biomimético para a esterase da acetilcolina**. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 68 WOMMACK, A. J.; MOEBIUS, D. C.; TRAVIS, A. L.; KINGSBURY, J. S. Diverse Alkanones by Catalytic Carbon Insertion into the Formyl C-H Bond. Concise Access to the Natural Precursor of Achyrofuran. **Organic Letters**, v. 11, n. 15, p. 3202-3205, 2009.
- 69 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.
- 70 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.
- 71 TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.
- 72 PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 18, p. 3865-3868, 1996.

- 73 BLUM, V.; GEHRKE, R.; HANKE, F.; HAVU, P.; HAVU, V.; REN, X.; REUTER, K.; SCHEFFLER, M. *Ab initio* molecular simulations with numeric atom-centered orbitals. **Computer Physics Communications**, v. 180, n. 11, p. 2175–2196, 2009.
- 74 FRYDENVANG, K.; JENSEN, B. Conformational analysis of acetylcholine and related choline esters. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 52, p. 184-193, 1996.
- 75 ARAGAY, G.; PONS, J.; MERKOCI, A. Enhanced electrochemical detection of heavy metals at heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrodes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 4326-4331, 2011.
- 76 SWAMY, T. M. M.; SIDDARAMAIAH. Studies on miscibility of polyacrylamide/polyethylene glycol blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 3, p. 2048-2053, 2007.
- 77 WOMMACK, A. J.; MOEBIUS, D. C.; TRAVIS, A. L.; KINGSBURY, J. S. Diverse alkanones by catalytic carbon Insertion into the formyl C–H bond. Concise access to the natural precursor of achyrofuran. **Organic Letters**, v. 11, n. 15, p. 3202-3205, 2009.
- 78 SGOBBI, L. F.; PINHO, V. D.; CABRAL, M. F.; BURTOLOSO, A. C. B.; MACHADO, S. A. S. Hydrazone molecules as mimics for acetylcholinesterase. A new route towards disposable biosensors for pesticides? **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 182, p. 211-216, 2013.
- 79 LAIDLER, K. J. **Chemical Kinetics**. Nova Iorque: Harper & Row, 1987. 531 p.
- 80 WOREK, F.; THIERMANN, H. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 249-259, 2013.
- 81 PANNBACHER, R. G.; OEHME, F. W. Pralidoxime hydrolysis of thiocholine esters. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 39-40, 2003.
- 82 SKRINJARIC-SPOLJAR, M.; FRANCISKOVIC, L.; RADIC, Z.; SIMEON, V.; REINER, E. Reaction of imidazolium and pyridinium oximes with the cholinesterase substrate acetylthiocholine. **Acta Pharmaceutica**, v. 42, n. 1, p. 77-83, 1992.
- 83 TIWARI, S.; GHOSH, K. K.; MAREK, J.; KUCA, K. Spectrophotometric determination of the acidity constants of some oxime-based alpha-nucleophiles. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 3, p. 1153-1157, 2010.

- 84 SINGH, N.; GHOSH, K. K.; MAREK, J.; KUCA, K. Hydrolysis of carboxylate and phosphate esters using monopyridinium oximes in cationic micellar media. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 43, n. 10, p. 569-578, 2011.
- 85 THEVENOT, C.; KHOUKH, A.; REYNAUD, S.; DESBRIERES, J.; GRASSL, B. Kinetic aspects, rheological properties and mechanoelectrical effects of hydrogels composed of polyacrylamide and polystyrene nanoparticles. **Soft Matter**, v. 3, n. 4, p. 437-447, 2007.
- 86 MELLO, Renata da Silva. **Utilização de macromoléculas contendo grupo funcional ácido hidroxâmico como modelos miméticos na clivagem de estéres de fosfato e acetato: Avaliando o efeito da cooperatividade entre grupos funcionais**. 2010. 179 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- 87 ZIAEE, F.; BOUHENDI, H.; ZIAIE, F. NMR study of polyacrylamide tacticity synthesized by precipitated polymerization method. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 18, n. 12, p. 947-956, 2009.
- 88 BIÇAK, N.; AÇIKKAYA, N.; KOZA, G. Controlled conversion of polyacrylamide into polyacrylic acid. **Polymer Bulletin**, v. 39, n. 4, p. 459-464, 1997.
- 89 TJIPANGANDJARA, K. F.; SOMASUNDARAN, P. Effects of changes in adsorbed polyacrylic acid conformation on alumina flocculation. **Colloids and Surfaces**, v. 55, p. 245-255, 1991.
- 90 OSTAFIN, A.; LANDFESTER, K.; SRIDAR, L.; MOUKASIAN, A. **Nanoreactor engineering for life and medicine**. Norwood, MA: Artech House, 2008. 283 p.
- 91 BAUGHMAN, R. G.; HALL, G. B. Two organophosphorus pesticides: methyl parathion and dicapthon **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. C70, n. 10, p. 975-977, 2014.
- 92 LUE, T.; SHAN, G.; SHANG, S. Intermolecular interaction in aqueous solution of binary blends of poly(acrylamide) and poly(ethylene glycol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, n. 5, p. 2572-2581, 2010.
- 93 UTRACKI, L. A. Compatibilization of Polymer Blends. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 80, n. 6, p. 1008-1016, 2002.
- 94 HURAUX, K.; NARITA, T.; FRÉTIGNY, C.; LEQUEUX, F. Solution drying and phase separation morphology of polyacrylamide/poly(ethylene glycol)/water system. **Macromolecules**, v. 40, n. 23, p. 8336-8341, 2007.

95 ARDUINI, F.; GUIDONE, S.; AMINE, A.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 179, p. 201-208, 2013.

96 ZHAO, H.; JI, X.; WANG, B.; WANG, N.; LI, X.; NI, R.; REN, J. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- β -cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 23-30, 2015.

97 LI, X.-H.; XIE, Z.; MIN, H.; LI, C.; LIU, M.; XIAN, Y.; JIN, L. Development of quantum dots Modified acetylcholinesterase biosensor for the detection of trichlorfon. **Electroanalysis**, v. 18, n. 22, p. 2163-2167, 2006.

98 DU, D.; HUANG, X.; CAI, J.; ZHANG, A.; DING, J.; CHEN, S. An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 3, p. 1059-1065, 2007.

Apêndice A

A.1. Caracterização do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico

O ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C), além de espectrometria de massas.

A.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A formação do ácido [4-(1E)-etanohidrazonoil]benzóico a partir do precursor ácido 4-acetilbenzóico foi identificada pela técnica de espectroscopia no infravermelho, comparando-se os espectros do precursor e do produto obtido. As bandas características de ambas as espécies estão na Tabela A1.

Ao comparar os espectros no infravermelho (Figura A1), observou-se que o grupo característico do precursor é a carbonila de aril cetonas, que absorve fortemente entre $1700\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$. Esta banda não foi observada no espectro do ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico.

A vibração de deformação axial da ligação N – H ocorre na região de $3550\text{-}3330\text{ cm}^{-1}$. Foi observado no espectro do ácido [4-(1E)-etanohidrazonoil]benzóico, uma banda em 3303 cm^{-1} referente a esta ligação, no entanto, há uma banda muito larga de $3400\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ 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 ($1645\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$) em 1628 cm^{-1} , essa banda tem intensidade de média a fraca e está presente na Figura A2, como uma ampliação do espectro original da molécula mimética.

Tabela A1 - Grupos característicos do precursor ácido 4-acetilbenzóico e do ácido [4-(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico

<i>Composto</i>	<i>Ligação</i>	<i>Absorção / cm⁻¹</i>
Ácido 4-acetilbenzóico	C = O	1695
Ácido [4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil]benzóico	N – H	3302
Ácido [4-(1 <i>E</i>)-etanohidrazonoil]benzóico	$\begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} = \text{N} - \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	1628

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 70.⁶⁷

Figura A1 - Espectros no infravermelho do ácido 4-acetilbenzóico (•) e do ácido [4-(1*E*)-etanohidrazonoil]benzóico (•).

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 70.⁶⁷

Figura A2 - Ampliação da região do espectro no infravermelho do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico (•) para verificar a banda do grupo hidrazona em 1628 cm⁻¹.

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 71.⁶⁷

A.1.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

O ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico e seu precursor também foram caracterizados por RMN¹H em CD₃OD. A Figura A3 refere-se ao espectro do ácido 4-acetilbenzóico com as seguintes informações:

Ácido 4-acetilbenzóico: RMN¹H (200 MHz, CD₃OD) δ 8,14 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 8.07 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 2.65 (s, 3H).

Figura A3 - Espectro de RMN ^1H do ácido 4-acetilbenzóico em CDCl_3 .

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 67.⁶⁷

A Figura A4 refere-se ao espectro do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico. *Ácido [4-(1E)etanohidrazonoil]benzóico*: RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ 7.94 (d, 2H, $J=8.6$ Hz), 7.64 (d, 2H, $J=8.6$ Hz), 2.18 (s, 3H).

Figura A4 - Espectro de RMN ^1H do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico em CDCl_3 .

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 68.⁶⁷

As diferenças nos deslocamentos químicos são características 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.

O espectro de RMN ^{13}C foi obtido para reforçar a caracterização da hidrazona, como mostrado na Figura A5. A partir do espectro RMN ^{13}C foram obtidos os seguintes dados: Ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico: (50 MHz, D_2O) δ 181.6, 169.8, 165.1, 157.6, 155.3, 154.5, 41.4.

Figura A5 - Espectro de RMN ^{13}C do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico em D_2O .

Fonte: SGOBBI, L. F., 2012, p. 72.⁶⁷

A.1.3 Espectrometria de massas (HRMS (ESI))

O espectro de massas do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico foi obtido para caracterização complementar, sendo a massa calculada para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $179.0821 \text{ g mol}^{-1}$ e a massa encontrada: $179.0828 \text{ g mol}^{-1}$; como mostrado na Figura A6.

Figura A6 - Espectro de massas do ácido [4-(1*E*)etanohidrazonoil]benzóico.

Fonte: SGOBBI, L. F., 2013, p. SI.⁷⁸