



**INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA**

**PAULO ROBERTO RODRIGUES BRANDÃO NOGUEIRA**

**APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE COLINESTERASES (CHE) NA  
CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA GÁS DE  
GUERRA (SARIN-GB).**

**ARRAIAL DO CABO / RJ**

**2020**

**APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE COLINESTERASES (CHE) NA  
CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA GÁS DE  
GUERRA (SARIN-GB).**

**PAULO ROBERTO RODRIGUES BRANDÃO NOGUEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira- IEAPM/ UFF, Campus Arraial do Cabo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Marinha.

Orientador(a): D.Sc. Maria Helena Campos Baeta Neves

**ARRAIAL DO CABO / RJ**

**2020**

**APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE COLINESTERASES (CHE) NA  
CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA GÁS DE  
GUERRA (SARIN-GB).**

**PAULO ROBERTO RODRIGUES BRANDÃO NOGUEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Marinha, do Instituto de Estudos do Mar  
Almirante Paulo Moreira- IEAPM/ UFF, Campus Arraial do  
Cabo, como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia Marinha.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. D.Sc. Maria Helena Campos Baeta Neves- Orientadora  
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

---

Prof. D.Sc. Manildo Marcião Oliveira  
Instituto Federal Fluminense – IFF.

---

Prof. D.Sc. Rodrigo de Siqueira Melo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

---

Prof. D.Sc. Ricardo Coutinho  
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

**ARRAIAL DO CABO / RJ**

**2020**

## **DEDICATÓRIA.**

A minha família, que sempre está ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS.**

Ao IEAPM, e a minha orientadora, que acreditaram no projeto inicial e permitiram a realização de um sonho.

Ao Professor Manildo Marcião, que me auxiliou no mestrado brilhantemente e contribuiu bastante para realização da Tese.

Ao Professor Rodrigo Melo que abriu as portas do seu laboratório e auxiliou imensamente na segunda etapa da tese.

A Aluna de IC da UFRJ, Ingrid, que me ajudou muito na parte da química experimental.

Sem vocês a realização deste sonho não seria possível.

Meu muito obrigado de todo coração.

## RESUMO

A guerra química quando comparada as guerras biológicas e nucleares é provavelmente uma das mais brutais. As armas químicas utilizadas, são consideradas armas de destruição em massa, construídas com relativo baixo custo e fáceis de se produzir. Devido a sua aplicação destrutiva, simples produção, alta toxicidade, ação rápida e letal mesmo em baixas concentrações, vêm atraindo um amplo interesse de militares e grupos terroristas. Alguns agentes neurotóxicos, são compostos organofosforados (OP's) semelhantes a muitos pesticidas comercialmente disponíveis. Os OP's podem ser considerados armas de destruição em massa, pois são simples e facilmente fabricados, dispersam-se com facilidade na atmosfera, são de difícil detecção e têm potencial para matar centenas de pessoas em um único ataque. Atuam inibindo a colinesterase (ChE), enzima do sistema nervoso que controla impulsos e transmissões dos estímulos nervosos. Estas, podem ser obtidas respectivamente de extratos brutos de vários tecidos, como tecido cerebral e muscular de peixes, mamíferos e aves. O objetivo deste trabalho foi Imobilizar em sílica mesoporosa SBA-15, ChE, de extrato bruto de cérebros de *Paralichthys patagonicus* (linguado branco), avaliando a atividade enzimática sem a presença do inibidor Paraoxon-etil (análogo ao Sarin) e com a presença do inibidor. Detectar e quantificar o substrato de Iodeto de Acetilcolina, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Como resultado da revisão bibliográfica, três artigos utilizaram a sílica mesoporosa como matriz de imobilização, porém não foram identificados na literatura pesquisada, biossensores construídos com ChE imobilizadas em Sílica mesoporosa SBA-15, utilizados para detecção do agente nervoso Paraoxon-etil (análogo ao Sarin). A presente pesquisa concluiu que a sílica mesoporosa SBA-15, mostrou ser uma matriz confiável e estável para imobilização por adsorção de ChE, contidas no extrato bruto. Os testes de inibição da enzima  $IC_{50}$ , detectaram o Paraoxon-etil em uma concentração de  $2,18 \times 10^{-4} \text{ mmol.L}^{-1}$ , demonstrando quanto sensível pode ser a detecção do inibidor em meio aquoso. O método voltamétrico desenvolvido e aplicado apresentou-se eficaz para detecção e quantificação na faixa de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  deste substrato enzimático em solução aquosa, podendo ser utilizado para mensurar a inibição enzimática de ChE, no eletrodo de carbono vítreo.

Palavras-chave: Biossensor. Acetilcolinesterases. Armas Químicas. Paraoxon etil (análogo Sarin).

## ABSTRACT

When the chemical war is compared to the biological and nuclear wars, it is probably one of the most brutal ones. The chemical weapons utilized are constructed cheaply and easily produced, weapons of mass destruction. Due to its destructive application, high toxicity, simple production, and quick and lethal action even in low concentrations, it is attracting a huge military and terrorist interest. Some neurotoxic are organophosphates compounds similar to many commercially available pesticides. The OP's can be considered as weapons of mass destruction because they are simple easily fabricated, disperse well in the atmosphere, it is difficult to detect, and has the potential to kill hundreds of people in a single attack. They act inhibiting the cholinesterase (ChE), which are enzymes from the nervous system, which control the impulses and transmissions of the nervous stimuli. Those can be obtained, respectively, from crude extracts of many tissues, like the fish's, mammal's and bird's cerebral and muscular tissue. This project objective was to immobilize in mesoporous silica SBA-15, ChE, from *Paralichthys patagonicus* (white sole), brains crude extract, rating the enzymatic activity without the presence of the Paraoxon-ethyl xenobiotic (similar to Sarin) inhibitor, and with its presence. Detect and quantify the Cholinesterase iodide substrate in potentiostat, utilizing the square wave voltammetry technique. As a result of the literature review, three articles used the mesoporous silica as immobilization matrix but were not identified in the searched literature, biosensors built with ChE immobilized in mesoporous silica SBA-15, utilized for the nervous agent Paraoxon-ethyl (similar to Sarin) detection. The mesoporous silica SBA-15 has shown to be a reliable and stable matrix for the immobilization by ChE adsorption, contained in the crude extract. The tests of  $IC_{50}$ , enzyme inhibition have detected the Paraoxon-ethyl in a  $2,18 \times 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup> concentration, showing how sensible can be the inhibitor detection in an aqueous medium. The method developed and applied in the potentiostat was effective for the detection and quantification in the  $1,25 \times 10^{-4}$   $1,32 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> rage of the enzymatic substrate in an aqueous medium, willing to be used for measure the ChE enzymatic inhibition, in the carbon glassy carbon electrode.

**Key words:** Biosensor. Cholinesterase. Chemical weapons. Paraoxon-ethyl (similar to Sarin).



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Tipos de Gases tóxicos utilizados em ataques químicos.....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura química dos organofosforados.....	16
<b>Figura 3.</b> Agentes neurotóxicos que podem ser usados como armas químicas. (A) Tabun, (B) Sarin, (C) Soman e (D) VX.....	17
<b>Figura 4 (A)</b> Reação de hidrólise da Acetilcolina.....	17
<b>Figura 4 (B).</b> Desenho esquemático do ciclo da acetilcolina.....	18
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de Hidrólise da Acetilcolina.....	19
<b>Figura 6.</b> Fosforilação da serina pelo organofosforado com posterior processo de envelhecimento da enzima.....	20
<b>Figura 6 (B).</b> Desenho esquemático de inibição da acetilcolinesterase.....	20
<b>Figura 7.</b> Esquema de funcionamento de um biossensor.....	21
<b>Figura 8.</b> Métodos de imobilização enzimática.....	24
<b>Figura 9.</b> Fluxograma mostrando o processo metodológico utilizado na revisão de literatura, elaborado nesta primeira fase da pesquisa.....	29
<b>Figura 10.</b> Fluxograma mostrando o processo utilizado na pesquisa experimental, elaborado na segunda fase da pesquisa.....	30
<b>Figura 12.</b> Potenciostato autolab.....	35
<b>Figura 13.</b> Eletrodos e célula eletroquímica usados na pesquisa.....	36
<b>Figura 14.</b> Matrizes para imobilização de AChE's e BuChE's em biossensores.....	40
<b>Figura 15.</b> Biossensores de inibição de AChE's e BuChE's imobilizadas em diferentes matrizes usados para detecção de agente nervoso GB ou análogo.....	41
<b>Figura 16.</b> Curva de substrato de iodeto de acetiltiocolina e obtenção dos parâmetros cinéticos ( $V_{max}$ e $K_m$ ) da ache livre.....	42
<b>Figura 17.</b> Gráfico do Duplo recíproco (lineweaver-burk).....	43
<b>Figura 18.</b> Atividade enzimática de AChE imobilizada em sílica mesoporosa.....	44
<b>Figura 19.</b> Grafico Duplo recíproco (Lineweaver-Burk), da enzima imobilizada.....	44
<b>Figura 20.</b> Atividade enzimática de AChE não testada (nova) imobilizada em sílica mesoporosa.....	45
<b>Figura 21.</b> Medição da absorvância de Ache já testada (reuso) imobilizada em sílica mesoporosa após 10 dias de armazenamento.....	45

<b>Figura 22.</b> Medição da absorvância de Ache já testada (reuso) imobilizada em sílica mesoporosa após 20 dias de armazenamento.....	46
<b>Figura 23.</b> Curva de temperatura.....	46
<b>Figura 24.</b> Curva de pH.....	47
<b>Figura 25.</b> Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g de sílica imobilizadas com AChE's, 0,5 mL de DTNB, 0,2 mL de paraoxon-etil (inibidor), 18,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5) e 0,6 mL de iodeto de acetiltiocolina (substrato). Frequência de 60 Hz, Amplitude de 20 mV e Step de 5 mV.....	48
<b>Figura 26.</b> Voltametria de Onda Quadrada de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 6,15 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de iodeto de acetiltiocolina, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.....	49
<b>Figura 27.</b> Voltametria de Onda Quadrada dos picos de maiores linearidades entre 0,35 e 0,50 V e entre 0,55 e 0,80 V, utilizando de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 6,15 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de iodeto de acetiltiocolina, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.....	50
<b>Figura 28.</b> Voltametria de Onda Quadrada dos picos de maiores linearidades entre 0,35 e 0,50 V, utilizando tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 6,15 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de iodeto de acetiltiocolina acrescidos após cada leitura, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.....	51
<b>Figura 29.</b> VOQ de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina nas frequências de 10, 20, 30, 40 e 50 Hz, step de 5 mV, amplitude de 20 mV em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5).....	52
<b>Figura 30.</b> VOQ de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, step de 5 mV e amplitude de 10, 50 e 100 mV, em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5).....	53
<b>Figura 31.</b> VOQ de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2, 5 e 10 mV em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5).....	54
<b>Figura 32.</b> Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g da sílica mesoporosa sem AChE's imobilizadas e sem (substrato) na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	55
<b>Figura 33.</b> Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g de AChE's imobilizadas em sílica mesoporosa sem substrato na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	56

<b>Figura 34.</b> Voltametria de Onda Quadrada do Paraoxon-etil sem substrato e sem AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	57
<b>FIGURA 35.</b> Voltametria de Onda Quadrada da concentração de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 1,32 x 10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	58
<b>Figura 36.</b> Reta de regressão do Iodeto de acetiltiocolina na concentração de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 1,32 x 10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	58
<b>Figura 37.</b> Corrente de pico da voltametria de onda quadrada em concentrações de 1,25 x 10 <sup>-4</sup> a 1,32 x 10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classes de biossensores.....	22
<b>Tabela 2.</b> Dosagem de proteínas, realizadas durante o processo de imobilização enzimática em sílica mesoporosa.....	43
<b>Tabela 3.</b> Inibição enzimática de AChE imobilizada em sílica mesoporosa.....	47
<b>Tabela 4.</b> Valores de altura de pico (média- $\mu\text{A}$ , desvio padrão- S e desvio padrão relativo- DPR) obtido para Iodeto de acetiltiocolina nas frequências de 10, 20, 30,40 e 50 Hz.....	52
<b>Tabela 5.</b> Valores de altura de pico (média- $\mu\text{A}$ , desvio padrão- S e desvio padrão relativo- DPR), obtido para Iodeto de acetiltiocolina nas amplitudes de 10, 50 e 100 mV.....	53
<b>Tabela 6.</b> Valores de altura de pico (média- $\mu\text{A}$ , desvio padrão- S e desvio padrão relativo- DPR), obtido para Iodeto de acetiltiocolina nos Steps de 2,5 e 10 mV...	54

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	26
Objetivo geral.....	26
Objetivos específicos.....	27
HIPÓTESES.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Delineamento experimental.....	28
Fluxograma mostrando o processo metodológico utilizado na revisão de literatura, elaborado nesta primeira fase da pesquisa.....	29
Fluxograma mostrando o processo utilizado na pesquisa experimental, elaborado na segunda fase da pesquisa.....	30
Coleta e eutanásia dos espécimes de <i>Paralichthys patagonicus</i> (linguado branco).....	31
Extração de colinesterase de cérebro de peixes da espécie <i>Paralichthys patagonicus</i> (linguado branco).....	31
Determinação da atividade enzimática da ChE.....	32
Parâmetros cinéticos da ChE livre e imobilizada.....	32
Imobilização enzimática em sílica mesoporosa SBA 15.....	32
Análise do teor das proteínas retiradas do sobrenadante durante o processo de imobilização em sílica mesoporosa pelo método de Peterson (1977).....	33
Atividade enzimática de ChE imobilizada em sílica mesoporosa nova e de reuso.....	33
Influência da temperatura na atividade enzimática de ChE imobilizada.....	34
Influência do pH na atividade enzimática de ChE imobilizada.....	34
Inibição enzimática com o agente neurotóxico Paraoxon-etil (análogo ao Sarin).....	34
Método voltamétrico de onda quadrada (VOQ).....	35
Limpeza dos eletrodos.....	36
Soluções e reagentes padrões.....	37

Voltametria de onda quadrada (VOQ) da Silica, ChE, DTNB, Iodeto de Acetiltioclina e paraoxon-etil e tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5).....	38
Voltametria de onda quadrada (VOQ) do Iodeto de acetiltiocolina e tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (pH 7,5).....	38
Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ).....	38
Frequência.....	38
Amplitude.....	38
Step.....	38
Ensaio utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ).....	38
Voltametria de onda quadrada (VOQ) da Sílica mesoporosa sem ChE imobilizada e sem substrato.....	39
Voltametria de onda quadrada (VOQ) de ChE imobilizada em sílica mesoporosa sem substrato.....	39
Voltametria de onda quadrada (VOQ) do Paraoxon-etil 0,001 mg.L <sup>-1</sup> em substrato e sem sílica mesoporosa imobilizada com ChE.....	39
Voltametria de onda quadrada (VOQ) da curva de calibração para Iodeto de Acetiltiocolina (AcSch).....	39
RESULTADOS.....	40
Da revisão bibliográfica.....	40
Da pesquisa experimental.....	41
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## INTRODUÇÃO

A guerra química quando comparada as guerras biológicas e nucleares é provavelmente uma das mais brutais. As armas químicas utilizadas, são consideradas armas de destruição em massa de relativo baixo custo e fáceis de se produzir (GANESAN *et al*, 2010). Devido a sua aplicação destrutiva, simples produção, alta toxicidade, ação rápida e letal, mesmo em baixas concentrações, vêm atraindo um amplo interesse de militares e grupos terroristas. No Brasil existem alguns estudos teóricos desenvolvidos pelo Exército Brasileiro, porém sem aplicação prática. Baseado na estrutura química, efeito fisiológico sobre o corpo e o seu propósito tático, os agentes químicos estão organizados em diferentes compostos (AHMADIAN *et al*, 2012). Dentre eles destacam-se o gás cloro, fosgênio, gás sarin, gás cianeto, gás mostarda e agente laranja (figura 1). Esses vem sendo utilizados desde a primeira guerra mundial (GANESAN *et al*, 2010).

**Figura 1.** Tipos de Gases tóxicos utilizados em ataques químicos, seus efeitos e fórmula estrutural.

Tipos	O que fazem?	Quem são?	Curiosidades	Estrutura química
<b>Sufocantes</b>	Lesionam toda a mucosa do nariz, traqueia e pulmão. Acabam provocando acúmulo de líquido no pulmão o que impede que o oxigênio seja absorvido causando sufocamento. A pessoa morre por falta de oxigênio.	Cloro, fosfagênio, difosfênio, óxido nítrico e PFIB	O gás cloro possui um cheiro que geralmente associamos a piscinas.	<p>Gás Cloro      Gás fosgênio</p>
<b>Hemotóxicos</b>	Impedem que as células utilizem o oxigênio que está no sangue. Quando falta oxigênio para órgãos vitais, como coração e cérebro, a pessoa acaba morrendo.	Cianetos	Esses compostos possuem cheiro de amêndoas.	<p>Gás Cianeto de Hidrogênio</p>
<b>Irritantes</b>	Provocam reações de irritação similar a queimaduras na pele, nas mucosas e nos olhos. A pessoa acaba morrendo por queimaduras na via respiratória.	Gás mostarda, lewisite e yperite de enxofre	O gás mostarda recebe esse nome por causa da sua cor.	<p>Gás mostarda</p>
<b>Neurotóxicos</b>	Agem nos nervos periféricos, aumentando a ação da acetilcolina (falamos dela aqui). Causam vômito, diarreia, alterações visuais, salivação e convulsões. A morte é causada por paralisia dos músculos da respiração.	Sarin, tabun, soman, VX e VG.	São parecidos com os agrotóxicos utilizados em plantações.	<p>GA    tabun    </p> <p>GB    sarin    </p> <p>GD    soman    </p> <p>VX    -    </p> <p>GF    ciclo-sarin    </p> <p>VR    -    </p>

Durante a primeira guerra mundial em 22 de abril de 1915, na batalha de Ypres, a Alemanha, foi o primeiro país a introduzir em larga escala o uso de gás cloro contra as forças aliadas, porém não foram considerados eficientes em combate e foram substituídos por agentes mais letais como o cloreto de carbonila (fosgênio) e o agente mostarda (BOOT, 2007).

Entre 1937 e 1944, na segunda guerra mundial, milhões de civis inocentes foram mortos pelos nazistas com o gás Zyklon B (gás de cianeto de hidrogênio) (HARRIS, 2007). Químicos alemães descobriram neurotoxinas adequadas para o uso militar, os organofosforados (OP's) que foram classificados como agentes do tipo G ou V. A letra G representa o país de origem "Germany" e a letra V denota "Venomous". São eles: GA (tabun) GB (sarin), GD (soman), VR ou VX Russo {N,N-dietil-2-[metil-(2-metilpropoxi) fosforil] sulfaniletanamina} e VX {S-[2-(disopropilamino) etil]-O-etil metilfosfonotioato}. Esses ofereciam vantagens táticas como facilidade de transporte e dispersão, alta letalidade em curtos períodos de tempo, seguidos de rápida degradação ambiental. Essas propriedades permitiram a ocupação de territórios em prazos relativamente curtos (SCHWARTZ, 2006).

Na guerra do Vietnã durante a década de 1950, os Estados Unidos usaram um herbicida, o agente laranja, que é a mistura de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T). O impacto na saúde em veteranos militares dos EUA e em civis vietnamitas foram graves (HAINES e FOX, 2014).

Dresch (2000), relatou o uso de gás mostarda e fosgênio pelas forças egípcias no norte do Iêmen na guerra civil entre 1963 a 1967, resultando em aproximadamente 4.000 vítimas sendo metade delas fatais.

Duas décadas depois entre 1980-1988, na guerra Irã – Iraque, os iraquianos utilizaram grandes quantidades de gás mostarda e outros agentes neurotóxicos, levando milhares de pessoas a morte (DANZIG, 2011).

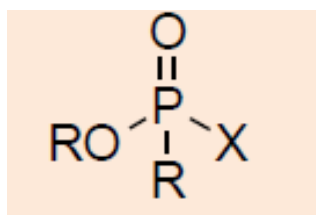
Em 1994 na cidade de Matsumoto, e em 1995 no metrô em Tóquio, um grupo terrorista japonês utilizou gás Sarin, causando 12 mortes e 5.500 feridos (GANESAN *et al*, 2010). Recentemente em 2013, um ataque químico com gás Sarin ocorreu na Síria matando 1.429 civis, 426 deles crianças (SYDNES, 2013).



As forças do governo sírio realizaram entre os meses de novembro e dezembro de 2016, oito ataques químicos com agentes neurotóxicos durante a batalha por Aleppo, resultando em nove mortes e ferindo cerca de 200 civis. (HESS, 2017).

Alguns agentes neurotóxicos, são compostos organofosforados (OP's) que tem como estrutura básica um átomo de fósforo central ligado a um átomo de oxigênio, a um grupo "abandonador (X)", a um radical alquila (R) e a um grupo OR (Figura. 2), semelhantes a muitos pesticidas comercialmente disponíveis. Os OP's são considerados armas de destruição em massa, pois são simples e facilmente fabricados, dispersam-se com facilidade na atmosfera, são de difícil detecção e têm potencial para matar centenas de pessoas em um único ataque (ALVIM *et al*, 2014).

**Figura 2.** Estrutura química dos organofosforados

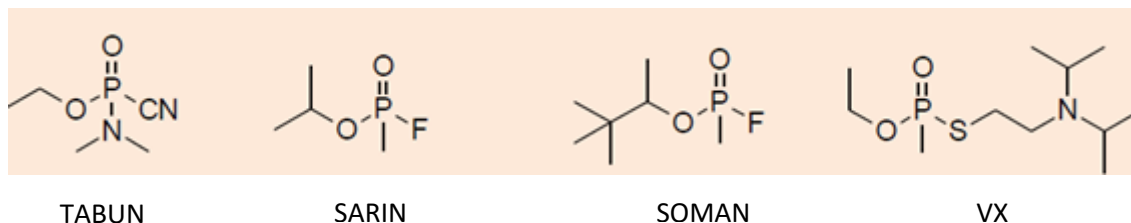


Fonte: Alvim *et al* (2014).

Os organofosforados, são amplamente usados como praguicidas, inibindo as enzimas colinesterases nos sistemas nervosos de vertebrados e de invertebrados. Sua interação com a acetilcolinesterase, interrompe a transmissão dos impulsos elétricos que ocorrem nas fendas sinápticas dos neurônios colinérgicos, levando a paralisia e morte. Estas enzimas estão presente nos mamíferos, peixes e insetos (SANTOS *et al*, 2007).

Com base na estrutura química, agentes neurotóxicos derivados dos OP's, como Tabun (B), Sarin (C), Soman (D) e VX (E) estão representados na figura 3 (ALVIM *et al*, 2014).

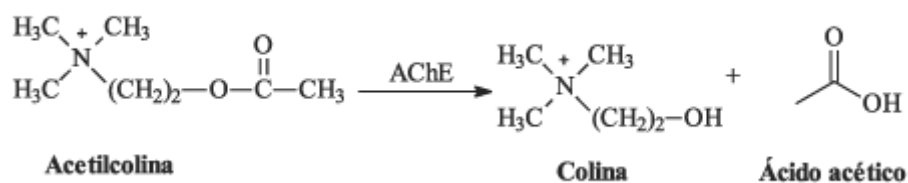
**Figura 3.** Agentes neurotóxicos que podem ser usados como armas químicas, Tabun, Sarin, Soman e VX.



Fonte: Alvim *et al* (2014).

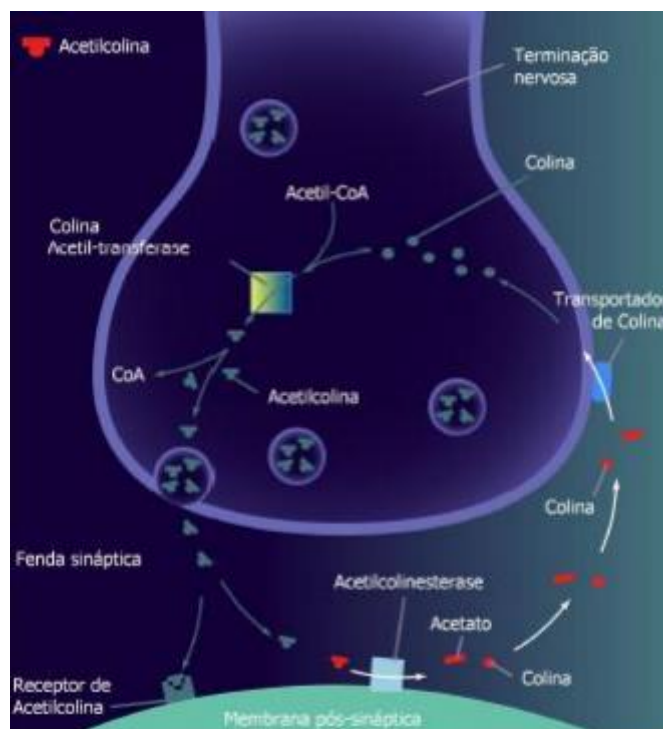
Dentre os agentes citados acima, o sarin ( $C_4H_{10}FO_2P$ , O-isopropil Metilfosfonofluoridato) é o mais visado para uso em ataques de destruição em massa devido a sua maior volatilidade a  $25^{\circ}C$ . Este organofosforado é altamente tóxico, induzindo a depressão respiratória rápida, convulsões e morte dentro de poucos minutos após a inalação. O Sarin quando purificado possui características singulares, é incolor, inodoro, solúvel em água e facilmente disseminado (TAN *et al*, 2013). Atua inibindo as colinesterases (ChE), enzimas do sistema nervoso que controlam impulsos e transmissões dos estímulos nervosos. Os vertebrados possuem dois genes para esta enzima. Um produtor da Acetilcolinesterase (AChE) e outro para a butirilcolinesterase (BChE) (PEZZEMENTI & CHATONNET, 2010), que podem ser obtidas respectivamente de extratos brutos de vários tecidos, como tecido cerebral e muscular de peixes, mamíferos e aves (NUNES, 1996). A acetilcolina, que é o substrato destas enzimas, em condições normais, é hidrolisada e convertida a colina e ácido acético, conforme a reação que segue (SANTOS *et al*, 2007) demonstrado na figura 4 A e 4B.

**Figura 4 (A).** Reação de hidrólise da Acetilcolina.



Fonte: Santos *et al* (2007).

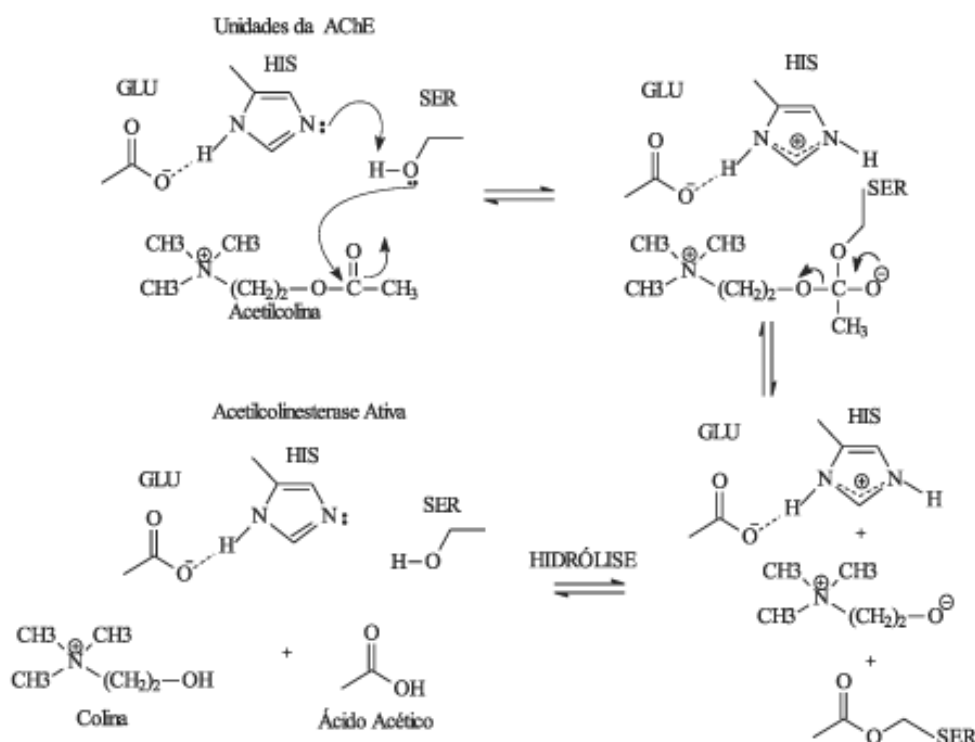
**Figura 4 (B).** Desenho esquemático do ciclo da acetilcolina.



Fonte: Adaptado de CNSforum.com

A AChE possui subunidades catalíticas com aminoácidos que são fundamentais para sua atividade. Os resíduos de histidina e serina são importantes para a hidrólise da Acetilcolina. Dois pontos são essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há uma interação entre a carga positiva do nitrogênio da Acetilcolina e a carga negativa produzida pelo resíduo de glutamato da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o grupo éster da Acetilcolina sofre ataque nucleofílico do resíduo de serina da AChE. A hidrólise da Acetilcolina no sítio ativo da AChE depende dos resíduos de histidina, que funciona como um catalisador ácido-base, e de Tirosina, que age como um nucleófilo (figura 5). Na verdade, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, levando a histidina a exercer um papel importante na catálise (ARAÚJO *et al*, 2016).

**Figura 5.** Mecanismo de Hidrólise da Acetilcolina.

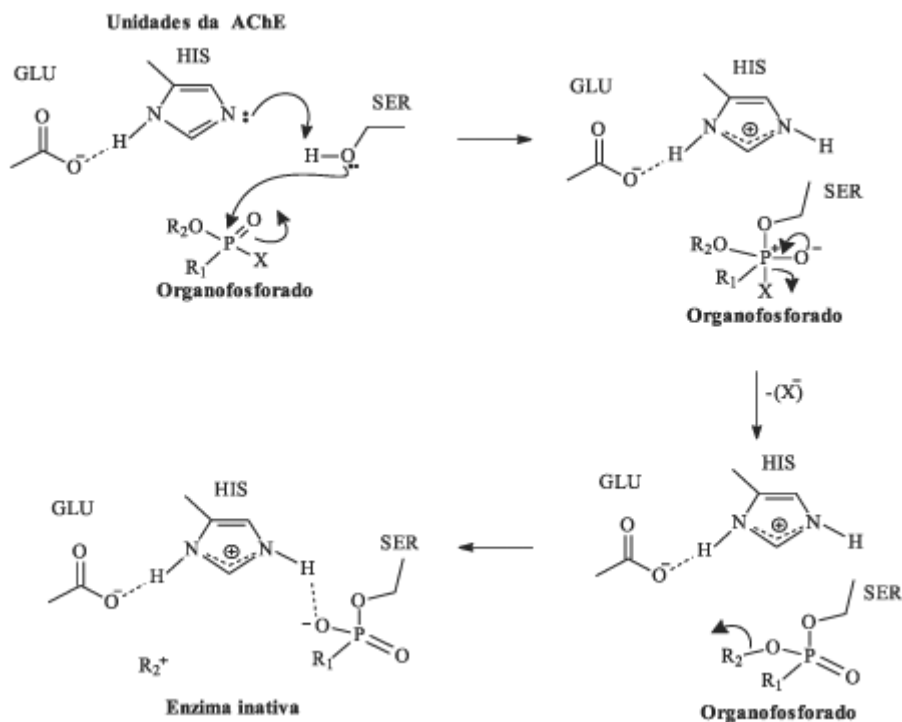


Fonte: Santos *et al* (2007)

A figura 6 (A) demonstra, que na presença de organofosforados, este resíduo da serina é prontamente fosforilado. Ao contrário da enzima acetilada, a enzima fosforilada reage lentamente com água, o que permite a desalquilação do substituinte alcoxila ligado ao átomo de P. Este processo é conhecido como "envelhecimento" (Aging), que muda a inibição do OP de reversível para irreversível, mostrando que o paraoxon-etil, pode ser utilizado como uma substância análoga ao Sarin, que é uma arma química.

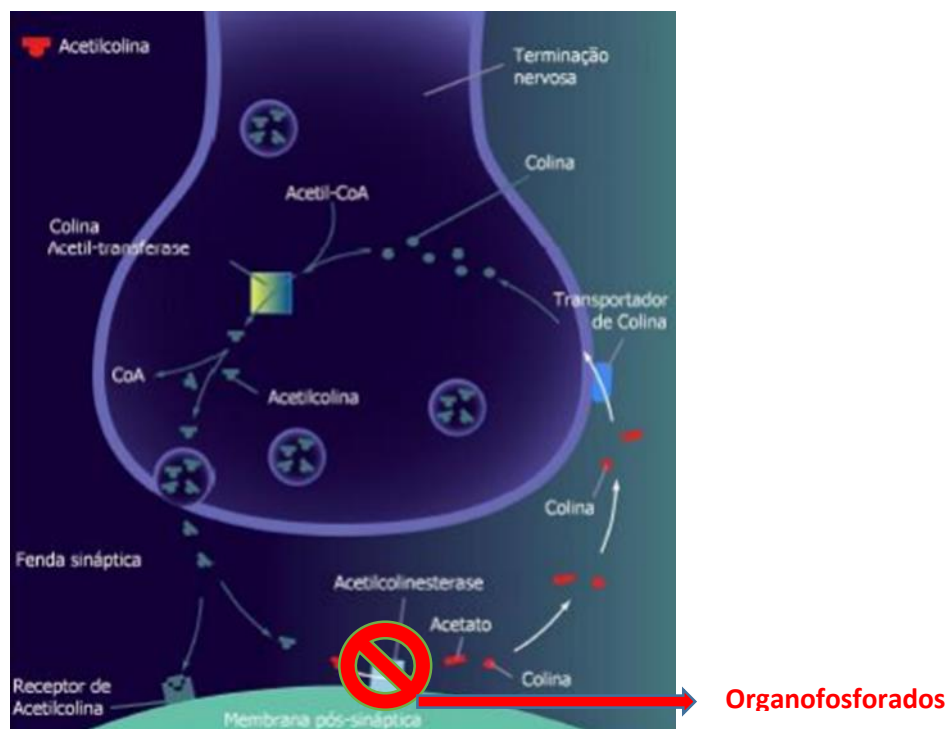
Os compostos organofosforados inativam a acetilcolinesterase pela fosforilação no sítio ativo da enzima (Figura 6 B). O resultado é o surgimento de uma forte ligação entre um resíduo da histidina protonada do sítio catalítico e o átomo de oxigênio negativamente carregado do inibidor. A histidina protonada não pode funcionar como um catalisador básico geral para a hidrólise da enzima fosforilada, necessária para a reativação da AChE (SANTOS *et al*, 2007). Portanto provoca acúmulo de acetilcolina levando a respostas repetidas e descontroladas nas células nervosas estimuladas (sinapses químicas) que podem, por fim, levar à convulsão seguida de morte (NUNES *et al*, 2004).

**Figura 6.** Fosforilação da serina pelo organofosforado com posterior processo de envelhecimento da enzima.



Fonte: Santos *et al* (2007).

**Figura 6 (B).** Desenho esquemático de inibição da acetilcolinesterase.

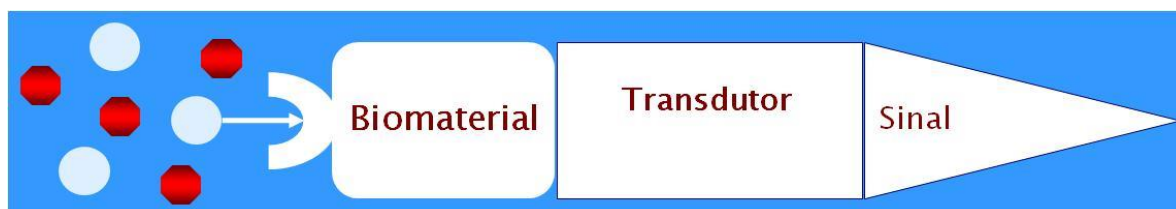


Fonte: Adaptado de CNSforum.com

Na literatura encontram-se numerosos métodos para detecção de compostos sintetizados a partir dos organofosforados (GA, GB, GD e VX). Esses métodos incluem, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), métodos colorimétricos, eletroquímicos, por fluorescência e eletroforese (TAN *et al*, 2013). Esses, devem fornecer boa sensibilidade, seletividade e portabilidade. O CG-EM, CLAE e os instrumentos de fluorescência proporcionam boa sensibilidade para detectar níveis traços de agentes nervosos. Infelizmente, o custo da manutenção do equipamento, compra dos padrões, reagentes analíticos e mão de obra especializada, impõe limitações. Porém, são métodos validados muito sensíveis e cada vez mais utilizados em análises químicas (LARTIGES, 1995). Em contraste, os métodos eletroquímicos aparecem como técnicas alternativas e complementares para o desenvolvimento de dispositivos de detecção (biossensores de ChE's) de baixo custo, construção relativamente simples, baixo consumo de energia, boa sensibilidade, seletividade e portabilidade (YAN *et al*, 2016).

O conceito de biossensor diz respeito a um eletrodo que pode ser modificado com material biológico intimamente ligado a superfície de um transdutor, que irá monitorar uma reação biológica, traduzindo este sinal analítico, em mensurável. O processo reacional é utilizado para reconhecimento de elementos e moléculas específicas que apresentam relação ou interação com a reação biológica, aliando-se seletividade biológica com sensibilidade analítica (FATIBELLO-FILHO, 1992). O esquema a seguir apresenta o princípio de funcionamento de um biossensor (Figura 7).

**Figura 7.** Esquema de funcionamento de um biossensor.



Fonte: Marques; Yamanaka, 2008.

Existem várias classes de biossensores (Tabela 1). Dentre outras, destaca-se a classe dos biossensores eletroquímicos, que são divididos em:

amperométricos, potenciométricos e os condutimétricos. Os amperométricos, baseiam-se na medida de intensidade de corrente resultante dos processos redox em uma superfície eletródica, a qual se submete uma diferença de potencial. Como vantagem, tem-se uma relação direta entre a intensidade de corrente obtida do processo com a concentração da espécie eletroativa, de forma independente do volume (THÉVENOT *et al*, 2001; WANG *et al*, 2008). Já os potenciométricos, são baseados na determinação da diferença do potencial entre o eletrodo indicador e o de referência (THÉVENOT *et al*, 2001), enquanto que os condutimétricos baseiam-se na medição de mudanças na condutância devido ao uso de materiais biológicos que produzem ou consomem espécies iônicas, alterando a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito (WANG *et al*, 2008).

**Tabela 1.** Classes de biossensores.

BIOSSENSORES	SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO	MEDIÇÃO	APLICAÇÕES TÍPICAS
Eletroquímicos	Amperométrico	Corrente	Substratos enzimáticos e antígenos ou anticorpos
	Potenciométrico	Voltagem	Íons, gases, espécies redox
	Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
	Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Acústicos	Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Ópticos	Optoeletrônicos, fibras ópticas, equipamentos de ondas guiadas	Variação de luminosidade, índice de refração	pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos
Calorimétricos	Termistores, diodos	Calor	Enzima, organela, vitaminas, analitos imunológicos

Fonte: Silva 2011.

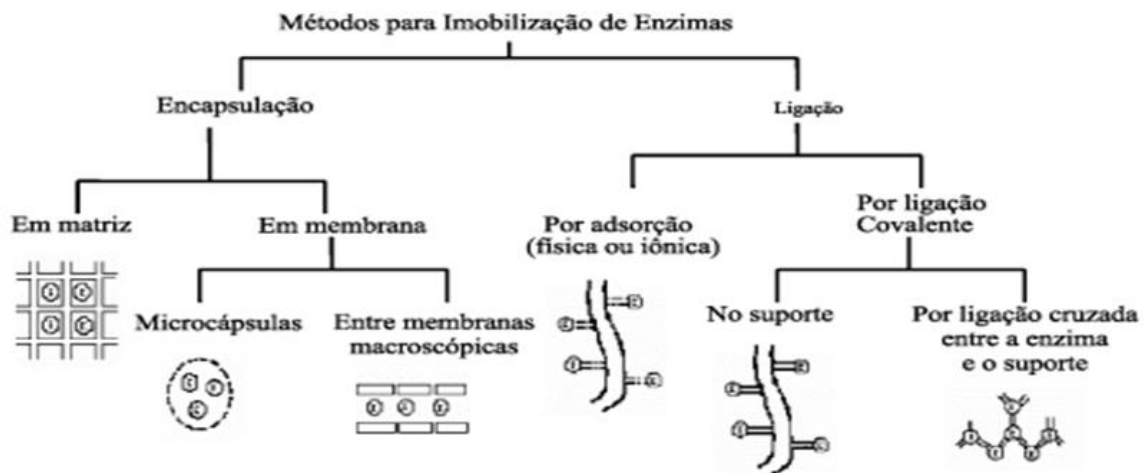
As técnicas eletroanalíticas para determinação de organofosforados merecem atenção, pois geram informações através de uma superfície eletródica, que deve apresentar elevada razão sinal-ruído e boa reprodutibilidade. O eletrodo de trabalho a ser utilizado depende de dois fatores: do comportamento redox do analito e das correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Também se deve considerar a janela de potencial de trabalho, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, as propriedades

mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e toxicidade. A importância da escolha do material do eletrodo de trabalho também se deve ao fato de que as respostas obtidas são relacionadas às reações redox que ocorrem em sua superfície ou na interface eletrodo-solução. Desta forma, o analito de interesse pode interagir com a superfície eletródica, resultando na transferência de elétrons. Entretanto, se a transferência é muito lenta, não ocorre, ou ocorre em um valor de potencial fora da janela de potencial do eletrodo, é possível realizar uma modificação na superfície eletródica a fim de melhorar a resposta final, onde o analito irá interagir diretamente com o agente modificante. (WANG, 1985).

Diferentes técnicas de imobilização de ChE's são empregadas para a construção de biossensores de detecção de agentes nervosos como GB ou análogos. Técnicas de sol-gel, meso-tetrafenilporfirina, nanoporos, copolimerização da colinesterase com reagentes aplicados diretamente na superfície do eletrodo e aprisionamento em estruturas com Albumina sérica bovina (BSA), usando glutaraldeído como reagente de reticulação (POHANKA, 2009). Atualmente usa-se nanoporos de sílica (STOILOVA *et al*, 2010), nanopartículas magnéticas (KOSTELNIK *et al* (2017), grafite-epoxi (MONTES *et al*, 2017), cristal fotônico de hidrogel (XU *et al*, 2017).

Uma das etapas mais críticas para construção de biossensores é o processo de imobilização enzimática. Esse processo é baseado na retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico aumentando o tempo de vida e estabilidade da biomolécula em relação à temperatura, ao pH e aos solventes orgânicos, utilizando pequenos volumes de amostras (CARDOSO *et al*, 2009). Marques e Yamanaka (2008), relatam que várias técnicas de imobilização são empregadas, baseadas nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. Dentre as mais utilizadas estão: adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada (figura 8).



**Figura 8.** Métodos de imobilização enzimática

Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004.

A adsorção física da enzima é o modo mais simples e rápido de imobilização, pois a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel (ANDREESCU E MARTY 2006). A técnica de encapsulação é baseada no confinamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. Esta membrana retém a enzima, apresentando porosidade controlada, de maneira a permitir a livre difusão do substrato e dos produtos da reação através da mesma. Já nas ligações covalentes, a retenção da enzima na superfície do suporte é efetuada por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. E por fim a ligação covalente cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas as outras, ou a proteínas inativas (albumina ou gelatina), formando uma estrutura tridimensional complexa (MARQUES E YAMANAKA 2008).

Além do processo de imobilização enzimática, outra lacuna existente é o alto custo da enzima purificada, que poderá ser minimizado utilizando-se extratos enzimáticos brutos de AChE, que por sua vez foi uma das motivações desta pesquisa, pois há poucos estudos relativos à imobilização realizada com extratos brutos de AChE. Este extrato bruto pode ser uma alternativa viável para a diminuição do custo efetivo desta enzima, tornando-a mais atrativa para a construção e comercialização de biossensores de inibição enzimática identificadores de organofosforados como o paraoxon-etil (análogo ao Sarin), que são classificados como agentes neurotóxicos.

Materiais mesoporosos como a sílica, vêm ganhando destaque nas pesquisas, justamente pela sua gama de aplicações, pois apresentam áreas de superfície elevada, acima de  $1000 \text{ g/m}^2$  e mesoporos que variam de 2,0 nm a várias dezenas de nanômetros, dependendo das condições de síntese (SOUSA; SOUSA, 2005).

O desenvolvimento da sílica SBA-15 (tamanho dos poros: 5-13nm) resolveu um problema crítico na imobilização de enzimas de determinados tamanhos. Pequenas modificações na sua estrutura, como o alargamento dos poros, aceleram a adsorção destas enzimas (KIM *et al*, 2006).

Cardoso (2009), observando estas características, imobilizou a AChE em capilares de sílica fundida, onde a enzima foi ligada covalentemente à parede do capilar, utilizando glutaraldeído como espaçador. Além do glutaraldeído, outro ligante químico, o éster de succinimida Ng-maleimidobutiriloxi (GMBS) pode ser usado para imobilização por ligação covalente cruzada de AChE em sílicas porosas e não porosas (SINGH *et al*, 1999).

Segundo Vamvakaki e Chaniotakis (2007), a sílica mesoporosa tem provado ser muito útil na adsorção e na estabilização da AChE, justamente pela presença de mesoporos de determinados tamanhos que desempenham um papel importante e talvez essencial na estabilização da enzima.

Os biossensores eletroquímicos de ChE's detectores de agentes nervosos (organofosforados) destaca-se por várias razões, entre elas, o baixo custo (especialmente nos casos dos eletrodos impressos), resposta rápida, miniaturização e uso também no caso de soluções com colorações (ARDUINI *et al*, 2010).

Para obtenção de biossensores de AChE extremamente sensíveis, diferentes técnicas de construção estão sendo utilizadas pela comunidade científica. Montes *et al* (2017) utilizaram uma composição de grafite-epoxi-AChE que permitiu melhoria das propriedades eletroquímicas tais como alta taxa de transferência de elétrons, alta relação sinal-ruído e sensibilidade adequada.

Jun *et al* (2017) construíram um sensor baseado em uma estrutura tubular de óxido de estanho ( $\text{SnO}_2$ ) e polipirrol polimerizado por deposição de vapor, formando uma fina camada no tubo que era altamente sensível e seletivo para dimetil metilfosfonato (DMMP) um organofosforado análogo ao Sarin.

Xu *et al* (2017), utilizaram esferas de poliestireno sintetizadas por polimerização em emulsão com sódio-dodecil sulfato que foram injetados entre dois discos de quartzo formando o biossensor para identificação do agente nervoso Sarin.

Um novo biossensor potenciométrico em forma de tatuagem não permanente associado a uma polianilina sensível ao pH, foi desenvolvido por Mishea *et al* (2018) e permite um monitoramento em tempo real de agentes nervosos do tipo GB.

Pitschmann *et al* (2018), criaram um biossensor a partir de uma tira de plástico com 10 cm de comprimento e 1 cm de largura. Em uma extremidade do plástico foi colocado um papel de indicação (1 cm<sup>2</sup>) feito com nanofibras de vidro com ChE's imobilizadas junto com o substrato. Com o uso deste biossensor, a detecção é simples, rápida e sensível.

Os biossensores que utilizam a AChE's ou BuChE's são sistemas rápidos, seletivos, sensíveis, de fácil uso, com tempo de resposta bastante curto e necessitando de mínimo tratamento da amostra, além das possibilidades de efetuar análises quantitativas e qualitativas em tempo real. A facilidade de obtenção das enzimas na forma comercial e ou a partir de extratos brutos, torna-se um grande atrativo para sua construção, merecendo atenção por parte da comunidade científica (MARQUES; YAMANAKA, 2008; LIU *et al*, 2008).

É crescente os estudos relacionados à detecção rápida e precisa de agentes neurotóxicos usados como armas químicas, visto os recentes ataques que vem assolando o planeta.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Imobilizar em sílica mesoporosa SBA-15, ChE, de extrato bruto de cérebros de *Paralichthys patagonicus* (linguado branco), avaliando a atividade enzimática) pelo método de Ellman (1961), a inibição enzimática resultante do xenobiótico Paraoxon-etil (análogo ao Sarin) e detectar e quantificar o substrato de Iodeto de Acetilcolina através de voltametria de onda quadrada.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar testes de imobilização enzimática por adsorção (Kennedy & White, 1986), do extrato bruto de ChE, produzido com cérebros de peixes *Paralichthys patagonicus* (linguado branco), avaliando a matriz de sílica mesoporosa SBA-15.

Avaliar o tempo de reutilização da enzima baseado na atividade enzimática pós imobilização na matriz citada acima.

Realizar testes de inibição enzimática (IC-50) através da técnica de Ellman (1961) adaptado, com agente nervoso Paraoxon-etil (análogo ao Sarin) na enzima imobilizada.

Avaliar a aplicação da técnica de Voltametria de onda quadrada (VOQ) (RAMALEY; KRAUSE, 1969), para detecção e quantificação do substrato de Iodeto de Acetilcolina.

## 3. HIPÓTESES

O extrato enzimático bruto produzido a partir de cérebros de peixes *Paralichthys patagonicus* (linguado branco), contém ChE ativa, com atividade enzimática em relação à cinética enzimática, reuso, imobilização e estocagem.

Haverá inibição de ChE imobilizada, pelo agente neurotóxico paraoxon-etil (análogo ao Sarin).

A técnica aplicada na Voltametria de onda quadrada (VOQ), será capaz de detectar e quantificar o substrato de Iodeto de Acetilcolina, que poderá ser utilizado em uma pesquisa posterior, para analisar a inibição enzimática da ChE causada pelo Paraoxon-etil.

O biossensor, capaz de identificar o agente nervoso Paraoxon-etil, será construído com baixo custo, boa sensibilidade, seletividade e portabilidade.

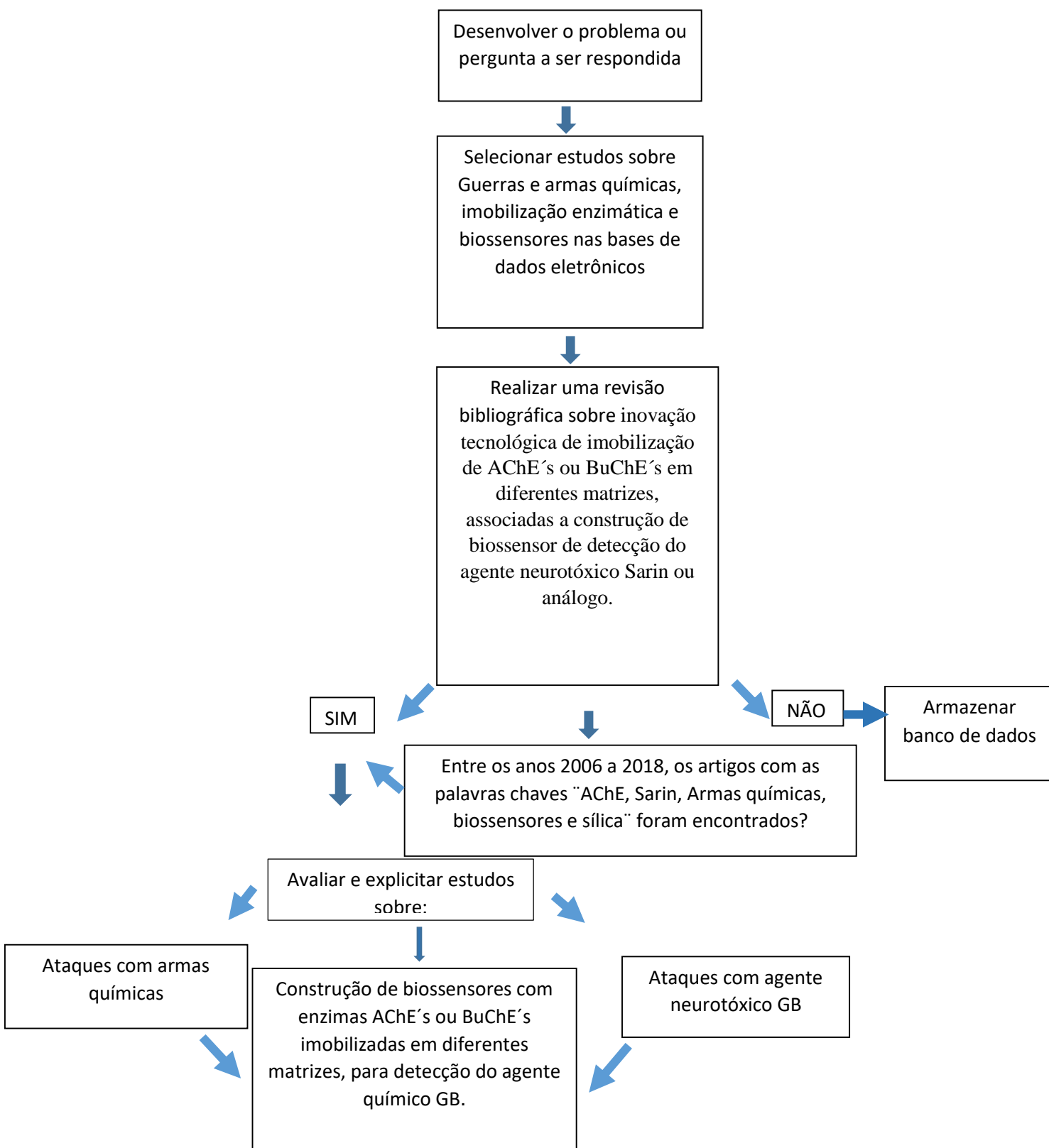
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental (LEMAN)- IFF Campus Cabo Frio, Laboratório de Instrumentação em Química – UFRJ Campus Macaé e no Instituto de estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM).

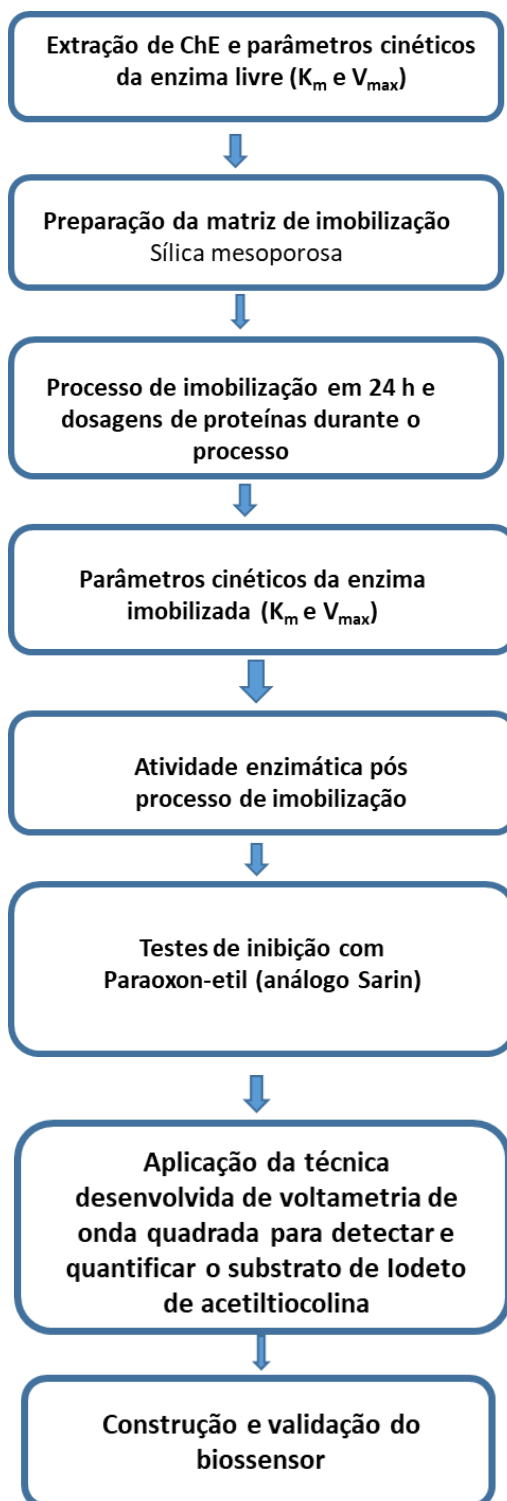
#### 4.1 Delineamento experimental

Esta pesquisa, na primeira fase, foi baseada em revisões de literaturas e a segunda fase foi experimental. A revisão de literatura baseia-se, inicialmente, na formulação de uma pergunta ou problema. Nesta primeira fase, a questão a ser respondida envolveu um mapeamento de estudos sobre inovação tecnológica de imobilização de AChE's ou BuChE's em sílicas mesoporosas, associadas a construção de biossensor de detecção do agente neurotóxico Sarin ou análogo Paraoxon-etil, usados como armas químicas. Após, foram selecionados 52 artigos científicos publicados, nacionais e internacionais. Destes, foram escolhidos 30 artigos para posteriormente serem analisados. A avaliação destes estudos se deu com os seguintes quesitos: critérios de inclusão (artigos científicos sobre ataques com armas químicas, ataques com agente neurotóxico GB, construção de biossensores com enzimas AChE's ou BuChE's imobilizadas em diferentes matrizes, que podem ser utilizadas para construção de biossensores de detecção do agente neurotóxico citado anteriormente, conforme é demonstrado na figura 9, e exclusão (dados não publicados em periódicos, revisões, livros). Os artigos foram coletados entre 2006 e 2018 nas bases de dados: Scopus, Web of Science, Scielo, Google Acadêmico, Periódico CAPES e revistas científicas eletrônicas como Chemical & Engineering News e Nature). A segunda fase (figura 10), foi experimental, onde um conjunto de variáveis foi mantido constante (Tampão fosfato pH 7,5, DTNB e sílica imobilizada com ChE), enquanto outro conjunto de variáveis (substrato e inibidor) foram dosados.

**Figura 9.** Fluxograma mostrando o processo metodológico utilizado na revisão de literatura, elaborado nesta primeira fase da pesquisa.



**Figura 10.** Fluxograma mostrando o processo utilizado na pesquisa experimental, elaborado na segunda fase da pesquisa



#### **4.2 Coleta e eutanásia dos espécimes de *Paralichthys patagonicus* (linguado branco)**

A coleta foi realizada na Prainha no município de Arraial do Cabo, RJ, na latitude 22°57'30,30" e longitude de 42°01'30,38". Após mergulho em apnéia com o auxílio de arpão de pesca submarina (Apache 75). Os espécimes eram arpoados, levados a superfície e colocados dentro de uma caixa de Isopor de 20 litros que continha gelo seco para congelamento e preservação dos cérebros. Em seguida foram levados ao laboratório de recursos marinhos (LAREMAR) do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) Marinha do Brasil para extração dos cérebros posterior produção do extrato bruto de ChE. A escolha dos espécimes de *Paralichthys patagonicus* se deu após consulta do artigo de Oliveira *et al*, (2006) que dosou AChE de 20 espécies de peixes, encontrando uma das maiores concentração da enzima e conseqüentemente uma das maiores atividades enzimáticas na espécie citada acima.

#### **4.3 Extração de acetilcolinesterase de cérebro de peixes da espécie *Paralichthys patagonicus* (linguado branco)**

Após extração de 15 g de cérebros de linguado branco, homogeneizou-se o tecido nervoso em 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5, através de 20 passagens em aparelho homogeneizador de tecidos (Bunker NT 136). Em seguida, esse extrato bruto foi centrifugado (Centrífuga NT 825) a 20000 RPM por duas horas, a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 5 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 e 3 mL de Triton X-100 a 0,5% (que é caracterizado como um detergente utilizado na lise de células para obtenção de extratos proteicos) e novamente homogeneizado através de cinco passagens no aparelho homogeneizador de tecidos para uma melhor extração de ChE. Após 30 minutos, sob agitação constante (Vortex Lab dancer Ika) a 2.800 RPM, esse material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante ficou estocado a - 20°C em freezer vertical (Brastemp frost free 228 litros) para as análises da ChE livre e imobilizada em sílica mesoporosa SBA-15.



## **4.4 ENSAIOS DA COLINESTERASE (ChE) EM ESPECTROFOTÔMETRO**

### **4.4.1 Determinação da atividade enzimática da ChE livre e imobilizada**

A atividade da colinesterase foi avaliada pelo método de Ellman (1961) adaptado, no Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental (LEMAN) Campus Cabo Frio. O meio reacional de 2000  $\mu\text{L}$  foi constituído de: 1890  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5, 50 $\mu\text{L}$  de DTNB (6,4 mol/L de concentração final), 50  $\mu\text{L}$  substrato de Iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Audrich) na concentração final de 1,875 mol.L<sup>-1</sup> e 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto (ChE). A atividade enzimática foi quantificada através de ensaio cinético, que foi realizado de 60 em 60 segundos até atingir 360 s a 412 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP 22), sendo determinada através da formação do ácido tionitrobenzóico (TNB) utilizando, nos cálculos, a absorvidade molar de 14.150 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. As experimentações foram feitas em triplicata

### **4.4.2 Parâmetros cinéticos da AChE livre e imobilizada**

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  aparente (porque a enzima não é purificada e sim obtida de um extrato bruto) e  $V_{\text{Max}}$  da acetilcolinesterase livre e imobilizadas foram ensaiados em triplicata pelo método de Ellman (1961) adaptado. O meio reacional de 2000  $\mu\text{L}$  foi constituído de volumes entre 1790  $\mu\text{L}$  a 1930  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5, 50  $\mu\text{L}$  de DTNB, 10  $\mu\text{L}$  a 90  $\mu\text{L}$  substrato de Iodeto de acetiltiocolina e 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto de ChE. As experimentações foram feitas em triplicatas.

### **4.4.3 Imobilização enzimática em sílica mesoporosa SBA 15**

Foram pesadas em balança de precisão (SKU 4171) 10 g de sílica mesoporosa. Estas foram colocadas em um becker contendo 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,5 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto. Sob agitação em agitador magnético (Solab SL-91 A) a 600 RPM e temperatura ambiente, retirou-se alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de 1 em 1 h, durante as 4 primeiras horas, para avaliar se ocorreu a imobilização das enzimas nos poros da sílica mesoporosa, porém o processo de imobilização continuou por mais 20 h. Posteriormente, as alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram

usadas nos testes de dosagens de proteínas e as ChE's immobilizadas foram utilizadas para testes posteriores.

#### **4.4.4 Análises do teor de proteínas retiradas do sobrenadante durante o processo de imobilização em sílica mesoporosa pelo método de Peterson (1977)**

As alíquotas do sobrenadante, retirados durante o processo de imobilização nas quatro primeiras horas, foram realizadas pelo método de Peterson (1977), e o teor de proteínas foi analisado em espectrofotômetro a 750 nm. Estas, foram colocadas em tubos de ensaio. Para um volume final de reação de 2000  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  da alíquota imobilizada retirada do sobrenadante de 1 em 1 h, foram adicionadas em 790  $\mu\text{L}$  de água deionizada, 800  $\mu\text{L}$  do reativo A (solução de sulfato de cobre 0,1 %, tartarato de sódio e potássio 0,2 % e carbonato de sódio 10 % e uma solução de Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$  0,8  $\text{mol.L}^{-1}$ ) e 5 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), agitando por 30 segundos em vortex (Lab dancer Ika), deixando em repouso por 10 minutos, posteriormente foi adicionando 400  $\mu\text{L}$  do reativo B (que é uma solução de Follin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich) diluída cinco vezes com água deionizada, agitando em vortex (Lab dancer Ika), e deixando repousar por mais 20 minutos, realizando a leitura em espectrofotômetro a. Os testes foram realizados em unicata.

#### **4.4.5 Atividade enzimática de ChE imobilizada em sílica mesoporosa nova e de reuso.**

A atividade enzimática da ChE imobilizada em sílica mesoporosa, foi realizada pelo método de Ellman (1961) adaptado. O meio reacional de 2000  $\mu\text{L}$  foi constituído de: 1890  $\mu\text{L}$  de solução tampão de ensaio (fosfato de sódio 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , pH 7,5), 50 $\mu\text{L}$  de DTNB, 60 $\mu\text{L}$  substrato de Iodeto de acetiltiocolina e 0,002g de sílica mesoporosa imobilizada com ChE. Estes reagentes foram colocados em tubos plásticos (Eppendorf) de 2 mL, agitados no vortex (Lab dancer Ika) por 10 minutos, sendo posteriormente centrifugados a 4°C por 3 minutos à 5000 RPM. Depois o sobrenadante foi retirado e realizado a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. As análises foram realizadas em unicata.

#### **4.4.6 Influência da temperatura na atividade enzimática de ChE imobilizada**

Para a análise da curva de temperatura da ChE imobilizada, foi utilizado o método de Ellman (1961) adaptado. Para um volume final de reação de 2000  $\mu\text{L}$  acrescentou-se, para medir a atividade enzimática: 1880  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5), 50 $\mu\text{L}$  de DTNB, 60 $\mu\text{L}$  substrato de Iodeto de acetiltiocolina. Para medição da temperatura foi utilizado um banho maria (Mylabor SSD) com variação de temperatura entre 10°C a 80°C aumentando de 10 em 10° C. Em todos os casos a formação do produto (TNB) foi medida pela absorção contínua em ensaio cinético, durante 360 s consecutivos a 412 nm, em espectrofotômetro Biospectro SP-22. Os testes foram realizados em triplicatas.

#### **4.4.7 Influência do pH na atividade enzimática de ChE imobilizada**

O teste padrão de curva do pH da enzima imobilizada foi ensaiado pelo método de Ellman (1961) adaptado. Para um volume final de reação de 2000  $\mu\text{L}$  acrescentou-se, para medir a atividade enzimática: 1880  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 e 9,5), 50 $\mu\text{L}$  de DTNB, 60 $\mu\text{L}$  substrato de Iodeto de acetiltiocolina. Para ajustar o pH abaixo de 7,5, foi acrescentado uma solução de 10 em 10  $\mu\text{L}$  de HCl 0,01 mol/L até atingir o pH desejado e para ajuste do pH acima de 7,5 acrescentou-se também 10 em 10  $\mu\text{L}$  NaOH 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, até atingir o pH desejado. As experimentações foram feitas em triplicatas.

#### **4.4.8 Ensaios sobre inibição enzimática com o Paraoxon-etil (análogo ao Sarin)**

Os ensaios de inibição da enzima imobilizada foram realizado pelo método de Ellman (1961) adaptado. 100 mg de padrão de Paraoxon-ethyl (PESTANAL-Aldrich) foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico com capacidade de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada obtendo a concentração de Paraoxon-etil em água de 10 mg.L<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$ , desta solução foi transferida para outro balão volumétrico com capacidade de 1000 mL, que teve seu volume completado novamente com água deionizada obtendo-se uma nova solução de concentração de 0,001 mg.L<sup>-1</sup>

1. A partir desta última foram retiradas alíquotas de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu\text{L}$ , que ficaram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho maria (Mylabor SSD) por 2 horas para posterior teste de inibição da enzima ( $\text{IC}_{50}$ ). Os testes foram realizados em unicata.

## 4.5 ENSAIOS DE VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

### 4.5.1 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

Os experimentos voltamétricos foram realizados no Laboratório de Instrumentação em Química da UFRJ Campus Macaé, utilizando potenciostato Autolab - Metrohm Autolab, PGSTAT128N (figura 12), acoplado a um computador, com o objetivo de realizar análise quantitativa e qualitativa do substrato de Iodeto de Acetilcolina. Para isto, foram utilizados os seguintes parâmetros eletroanalíticos: frequência de 60 Hz, amplitude de 20 mV e step de 5 mV. Os softwares NOVA 2.1.3, Oringin 8.0 e Excel foram empregados para tratamento dos dados obtidos através das análises realizadas em triplicata. Em uma célula eletroquímica de vidro, foram dispostos um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um contra eletrodo de fio de platina e um eletrodo de referência de calomelano saturado (Figura 13).

**Figura 12.** Potenciostato Metrohm Autolab, PGSTAT128N.



**Figura 13.** Disposição dos eletrodos de trabalho de carbono vítreo, contra eletrodo de fio de platina, eletrodo de referência de calomelano saturado e célula eletroquímica usados na pesquisa (A) e eletrodo de trabalho de carbono vítreo (B).



(A)



(B)

#### 4.5.2 Limpeza dos eletrodos

A limpeza do eletrodo de carbono vítreo, foi realizada através do polimento mecânico com o auxílio de um pano apoiado numa superfície plana com alumina granulada  $1\ \mu\text{m}$  ao decorrer de 1 minuto. Posteriormente, o mesmo foi lavado com água deionizada por 1 minuto e posto em um banho de ultrassom (Q335D, QUIMIS) por 1 minuto novamente. A limpeza do eletrodo de referência de calomelano saturado e do contra eletrodo de platina, foi realizada utilizando água deionizada. Estes procedimentos foram realizados antes de cada análise. As vidrarias foram lavadas primeiramente com água e detergente, e posteriormente foram banhados 3 vezes em água deionizada.

#### 4.5.3 Soluções e reagentes padrões

O tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,5), foi previamente preparado antes da realização de cada experimento. Para 500 mL de tampão utilizou-se 0,19 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 3,73 g KCl. Em cada análise realizada, empregou-se 60 mL desta solução. Todos os ensaios foram realizados utilizando soluções e reagentes padrões.

O ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) na concentração final de  $6,4 \text{ mol/L}$ , foi adquirido na empresa Sigma-aldrich.

O Iodeto de acetiltiocolina na concentração final de  $1,875 \text{ mol.L}^{-1}$ , foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich, juntamente com o Inibidor Paraoxon-etil (PESTANAL-Aldrich >90%).

As enzimas AChE's foram obtidas a partir do extrato bruto de cérebros de peixes *Paralichthys patagonicus*.

A sílica mesoporosa SBA-15, foi cedida pelo Instituto de Química do Instituto Federal Fluminense Campus Cabo Frio, RJ.

#### 4.5.4 Voltametria de onda quadrada (VOQ) da Silica, AChE's, DTNB, Iodeto de Acetiltiocolina e paraoxon-etil e tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,5)

Para realização do VOQ com o intuito de analisar qual analito apresentava sinal eletroanalítico para execução das análises, foram utilizados as seguintes concentrações para a solução eletrolítica de 20 mL: 0,5 mL de DTNB, 0,2 mL de paraoxon-etil, 0,6 mL de iodeto de acetiltiocolina, 0,002 g de sílica mesoporosa imobilizada com AChE's e 18,7 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,5). Os voltogramas foram obtidos utilizando os seguintes parâmetros; Frequência de 60 Hz, Amplitude de 20 mV e Step de 5 mV.

#### 4.5.5 Voltametria de onda quadrada (VOQ) do Iodeto de acetiltiocolina e tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,5)

A VOQ foi realizada pelo método (RAMALEY; KRAUSE, 1969), usando uma solução eletrolítica de 60 ml de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,5) adicionado a célula eletroquímica, posteriormente inseriu-se concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $6,15 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  de Iodeto de acetiltiocolina. Os parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foram: Step: 5 mV; Amplitude do pulso: 20 mV, Frequência: 10 Hz.

#### **4.5.6 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ)**

Para a otimização dos parâmetros da técnica de VOQ, um meio reacional com 60 mL de tampão fostato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5) e uma concentração de 1,25 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina foram acrescentados a uma célula eletroquímica de vidro. A partir desta análise univariada, realizou-se as seguintes variações no equipamento: Frequência entre 10 Hz a 90 Hz com um acréscimo de 10 Hz a cada leitura, step de 1 a 10 mV, com a adição de 1 mV no início de cada análise e a amplitude entre 10 a 100 mV, com um aumento de 10 mV no início de cada leitura.

##### **4.5.6.1 Frequência**

Utilizou-se frequências entre 10 e 90 Hz com step de 5 mV e amplitude de 20 mV (pois estes parâmetros, amplitude e step, eram padrões da técnica) para otimização do parâmetro citado, verificando ainda o desvio padrão relativo que foi utilizado para corroborar a escolha do melhor sinal eletroanalítico obtido.

##### **4.5.6.2 Amplitude**

Para este parâmetro foi empregado variações na amplitude em 10, 50 e 100 mV, utilizando a frequência de 10 Hz (melhor sinal eletroanalítico obtido anteriormente) e step de 5 mV, apurando também o desvio padrão relativo.

##### **4.5.6.3 Step**

Variou-se o step entre 1 e 10 mV, com frequência 10 Hz (melhor sinal eletroanalítico obtido) e amplitude de 10 mV (melhor sinal eletroanalítico obtido). Verificou-se a análise de três valores 2, 5 e 10 mV, investigando o desvio padrão relativo.

#### **4.5.7 Voltametria de onda quadrada (VOQ) da Sílica mesoporosa sem AChE's immobilizadas e sem substrato**

O ensaio foi realizado a partir da voltametria com pulso de onda quadrada (RAMALEY; KRAUSE, 1969), para sílica mesoporosa sem AChE's immobilizadas e sem substrato. Em uma solução de 60 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH

7,5), adicionou-se 0,002 g de sílica mesoporosa sem AChE's immobilizadas. Os parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foram: Step: 2 mV, Amplitude do pulso: 10 mV, Frequencia: 10 Hz, Potencial inicial: +0,3 V, Potencial final: 0,6 V.

#### **4.5.7.1 Voltametria de onda quadrada (VOQ) de AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa sem substrato**

O ensaio deu-se através da voltametria com pulso de onda quadrada (RAMALEY; KRAUSE, 1969) para AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa, sem substrato. Em uma solução de 60 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5), adicionou-se 0,002 g de sílica mesoporosa immobilizada com AChE's. Os parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foram: Step: 2 mV, Amplitude do pulso: 10 mV, Frequencia: 10 Hz, Potencial inicial: +0,3 V, Potencial final: 0,6 V.

#### **4.5.7.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ) do Paraoxon-etil 0,001 mg/L em substrato e sem sílica mesoporosa immobilizada com AChE's**

A realização do ensaio se deu através da voltametria com pulso de onda quadrada (RAMALEY; KRAUSE, 1969) para o inibidor Paraoxon-etil (0,001 mg/L) sem AChE's immobilizadas em sílica e sem substrato. Em uma solução de 60 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5), acrescentou-se 1000 µl de Paraoxon-etil na concentração de 275,19 g.L<sup>-1</sup>. Os parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foram: Step: 2 mV, Amplitude do pulso: 10 mV, Frequencia: 10 Hz, Potencial inicial: +0,3 V, Potencial final: 0,6 V.

#### **4.5.8 Voltametria de onda quadrada (VOQ) da curva de calibração para Iodeto de Acetilcolina (AcSch).**

Este ensaio demonstra a resposta voltamétrica do Iodeto de acetilcolina (AcSch). Em uma solução de 60 ml de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5), agregou-se concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,35 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de AcSch. Os parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foram: Step: 2 mV, Amplitude do pulso: 10 mV, Frequencia: 10 Hz, Potencial inicial: +0,3 V, Potencial final: 0,6 V.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Da Revisão bibliográfica

Dos 30 artigos pesquisados, dez citaram matrizes de imobilização de AChE's e BuChE's, destacando-se a sílica mesoporosa com três artigos. Os outros sete utilizaram matrizes diferentes (Fig. 14). Atualmente, materiais mesoporosos como a sílica, vêm ganhando destaque nas pesquisas, justamente pela sua gama de aplicações, pois apresentam áreas de superfície elevada, acima de  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$  e mesoporos que variam de 2,0 nm a várias dezenas de nanômetros, dependendo das condições de síntese (SOUSA; SOUSA, 2005).

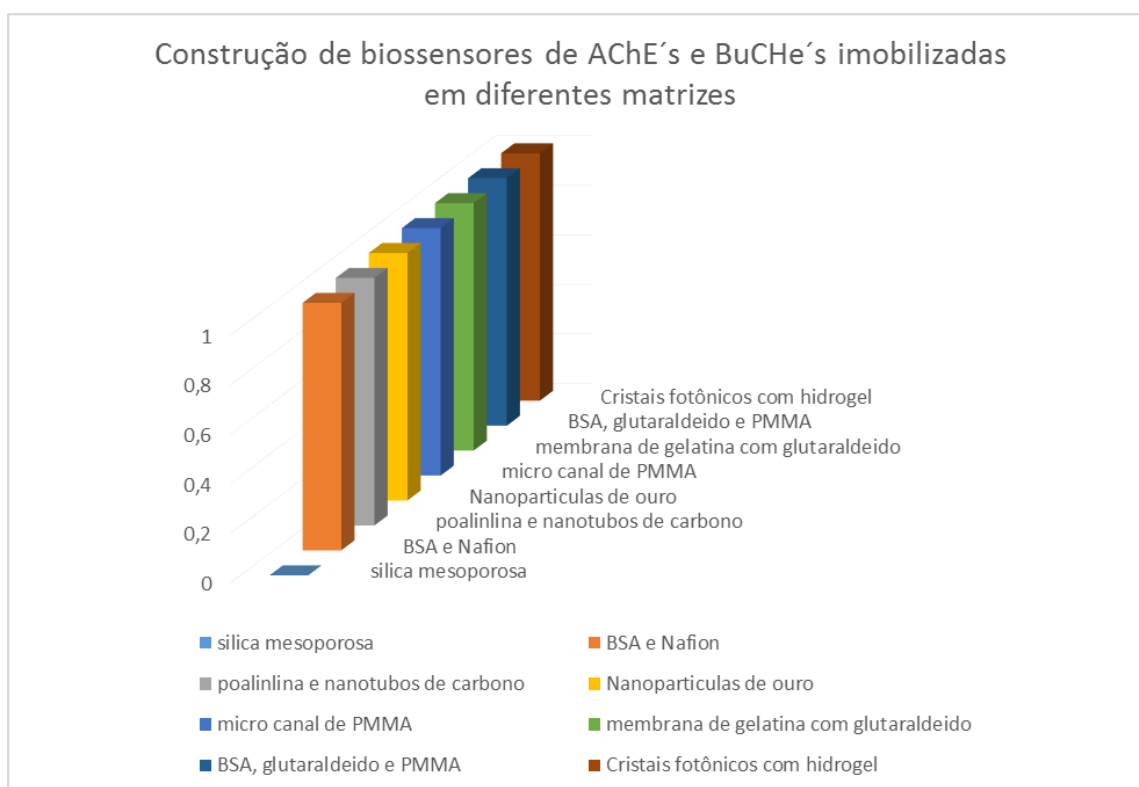
**Figura 14.** Matrizes para imobilização de AChE's e BuChE's em biossensores.



Ao analisar os tipos de matrizes utilizadas para imobilização de AChE's e BuChE's associadas a construção de biossensores capazes de detectar o agente nervoso GB ou análogo, foi observado uma diversidade de resultados, ou seja, cada artigo explorou uma matriz específica, porém nenhum artigo

analisado descreveu a construção de biossensores associados a matriz de sílica mesoporosa imobilizada com AChE's e BuChE's (Fig. 15). Segundo Vamvakaki e Chaniotakis (2007), a sílica mesoporosa tem provado ser muito útil na adsorção e na estabilização da AChE, justamente pela presença de mesoporos de determinados tamanhos que desempenham um papel importante e talvez essencial na estabilização da enzima.

**Figura 15.** Biossensores de inibição de AChE's e BuChE's imobilizadas em diferentes matrizes usados para detecção de agente nervoso GB ou análogo.

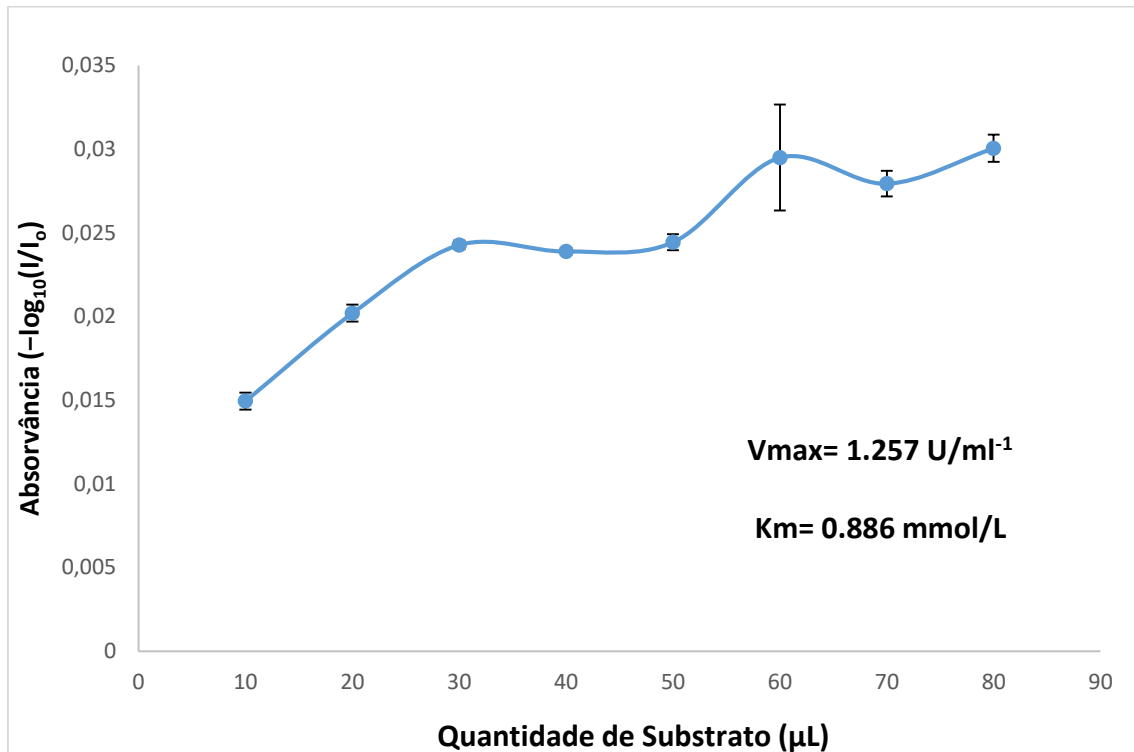


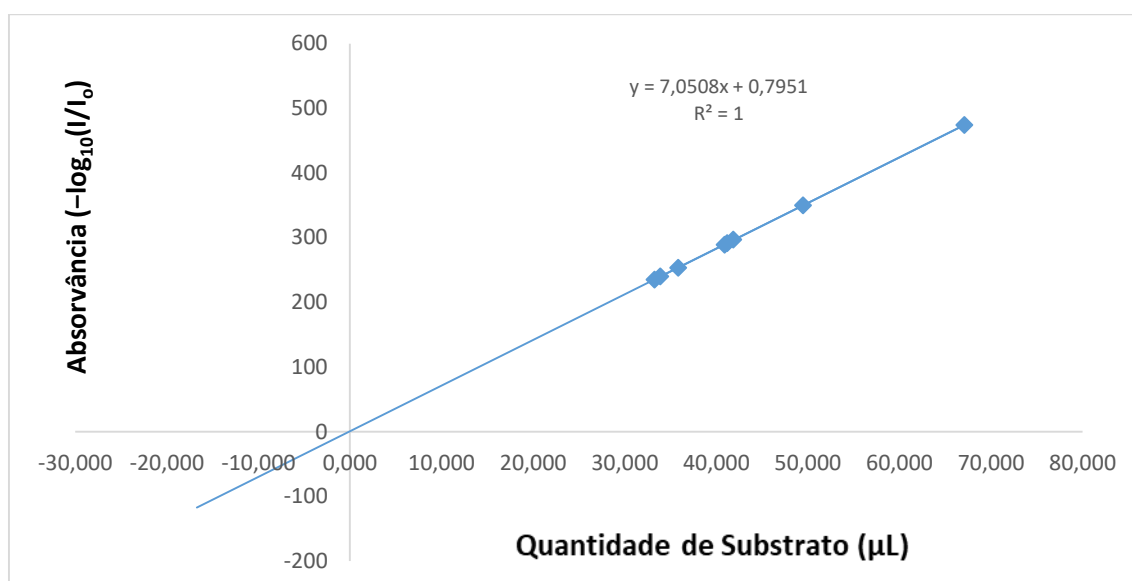
## 5.2 Dá pesquisa experimental

. A curva de substrato de iodeto de acetiltiocolina da enzima livre, determinando os parâmetros cinéticos da mesma (Constante de Michaelis-Menten,  $K_M$  aparente, e a velocidade máxima de reação,  $V_{MAX}$ ), baseando-se na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de ChE cerebral, retirados do peixe (*Paralichthys patagonicus*), está representado na figura 16. E o Duplo recíproco (Lineweaver-Burk) encontram-se na figura 17. Para os cálculos da atividade enzimática foram usados o coeficiente de extinção molar de  $14.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o ácido tionitrobenzóico (TNB) formado. Para o cálculo do duplo

recíproco foi utilizado a seguinte equação:  $Y = bX + a$ , onde  $b$  = coeficiente angular da inclinação da reta e  $a$  = coeficiente linear, que é a ordenada do ponto em que a reta corta o eixo de  $y$ . Já para o cálculo do  $V_{max}$ , a equação utilizada foi:  $1/a$  e para a  $K_m$ , foi,  $b \times V_{max}$ .

**Figura 16.** Curva de substrato de iodeto de acetilcolina e obtenção dos parâmetros cinéticos ( $V_{max}$  e  $K_m$  aparente) da ChE livre.



**Figura 17.** Gráfico do Duplo recíproco (lineweaver-burk).

A comparação das dosagens de proteínas (método de Peterson Lowry, 1977) das alíquotas coletadas durante o processo de imobilização de ChE, em sílica mesoporosa está representada na tabela 1. Testes foram realizados durante as quatro primeiras horas em intervalos de uma em uma hora, demonstrando, que quanto menor for a dosagem de proteínas no sobrenadante maior é a imobilização de ChE por adsorção nos nanoporos das sílicas mesoporosas.

**Tabela 2.** Dosagem de proteínas, realizadas durante o processo de imobilização enzimática em sílica mesoporosa.

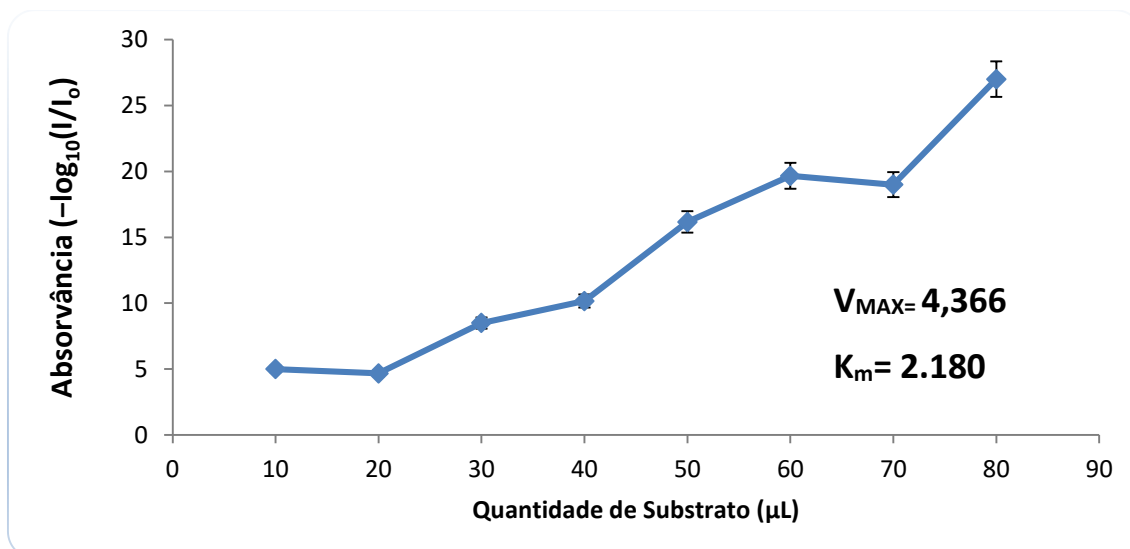
	1 h	2 h	3 h	4 h
Sílica mesoporosa	0,106	0,103	0,094	0,088

Absorvância  $-\log_{10}(I/I_0)$ .

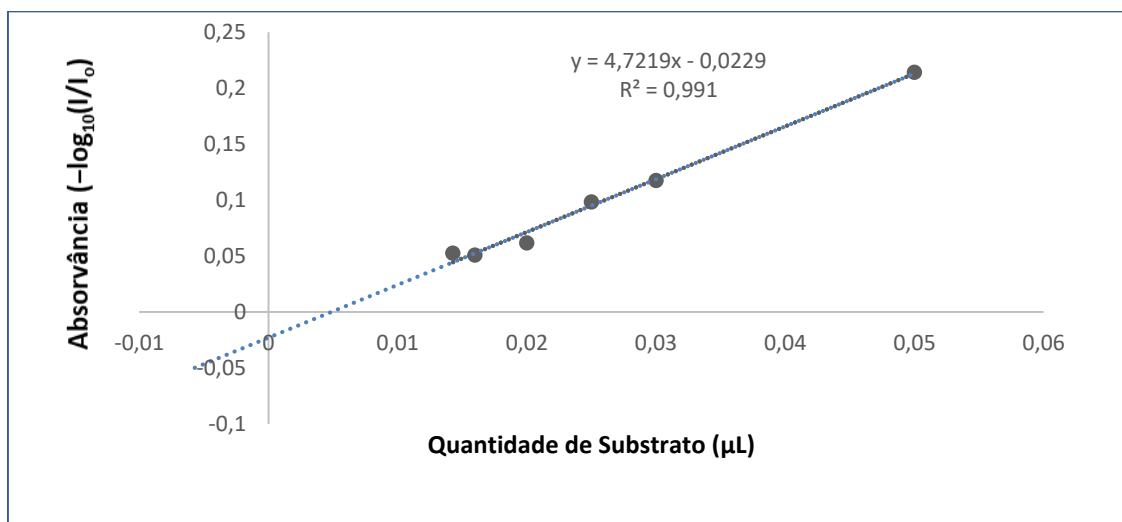
A curva de substrato do Iodeto de acetiltiocolina da enzima imobilizada em sílica mesoporosa, determinando os parâmetros cinéticos, foram ensaiadas através da análise da atividade enzimática do extrato enzimático bruto de ChE cerebral, retirados do peixe (*Paralichthys patagonicus*), conforme representada pela figura 18. Para os cálculos da atividade enzimática foram usados o coeficiente de extinção molar de  $14.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o ácido tionitrobenzóico (TNB) formado. Para os cálculos da Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), a

velocidade máxima de reação ( $V_{MAX}$ ) (figura 18) e o Duplo recíproco (Lineweaver-Burk) (figura 19), foram utilizados as mesmas equações empregadas nos cálculos da enzima livre.

**Figura 18.** Atividade enzimática da ChE immobilizada em sílica mesoporosa.



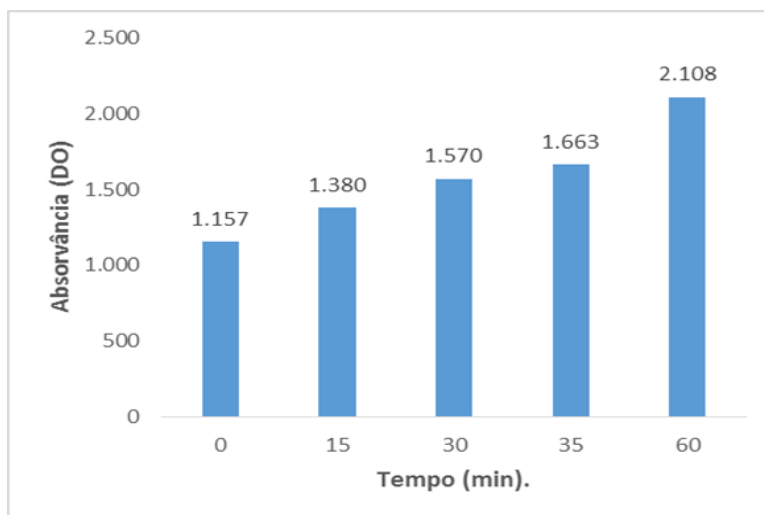
**Figura 19.** Grafico Duplo recíproco (Lineweaver-Burk), da enzima immobilizada.



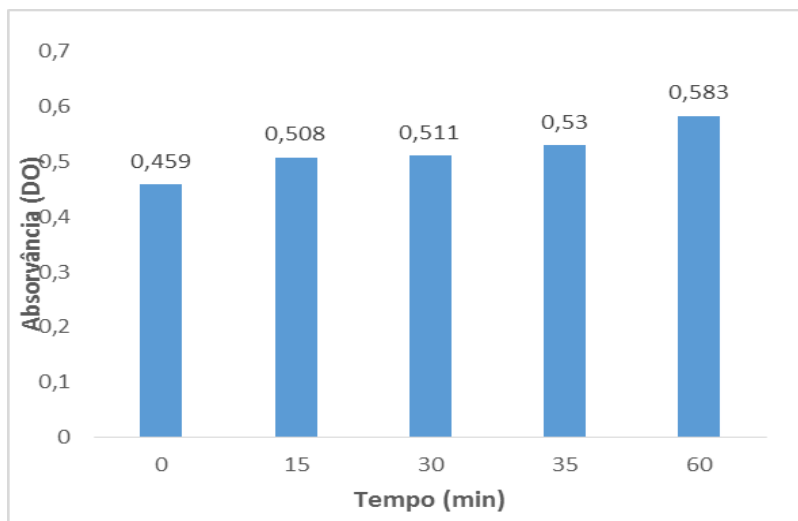
A atividade enzimática da ChE immobilizada em sílica mesoporosa já testada anteriormente (reuso) e uma não testada (nova), foi ensaiada pelo método de Ellman (1961) adaptado. Constatou-se no processo de imobilização de ChE no suporte sílica mesoporosa, um aumento linear da atividade enzimática, tanto na sílica nova quanto a de reuso, conforme as figuras 20, 21 e

22, o que faz dessa matriz um suporte promissor para imobilização e estabilização de ChE.

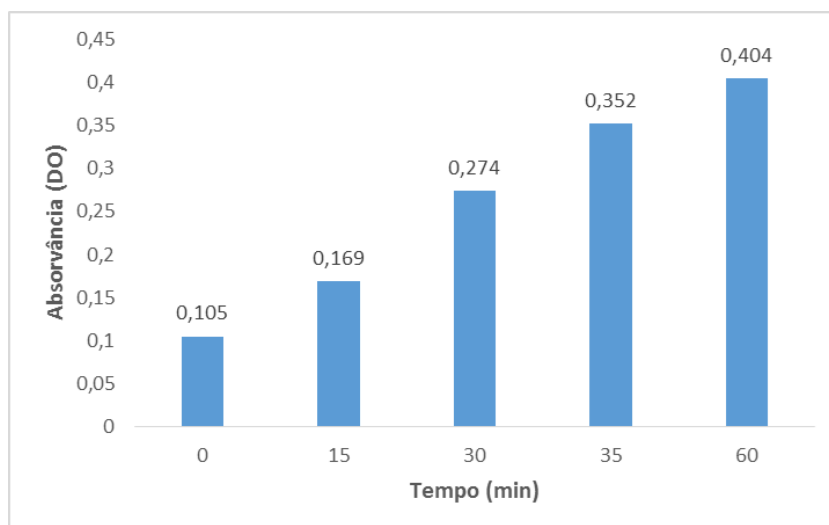
**Figura 20.** Atividade enzimática de ChE não testada (nova) imobilizada em sílica mesoporosa.



**Figura 21.** Atividade enzimática de ChE já testada (reuso) imobilizada em sílica mesoporosa após 10 dias de armazenamento.

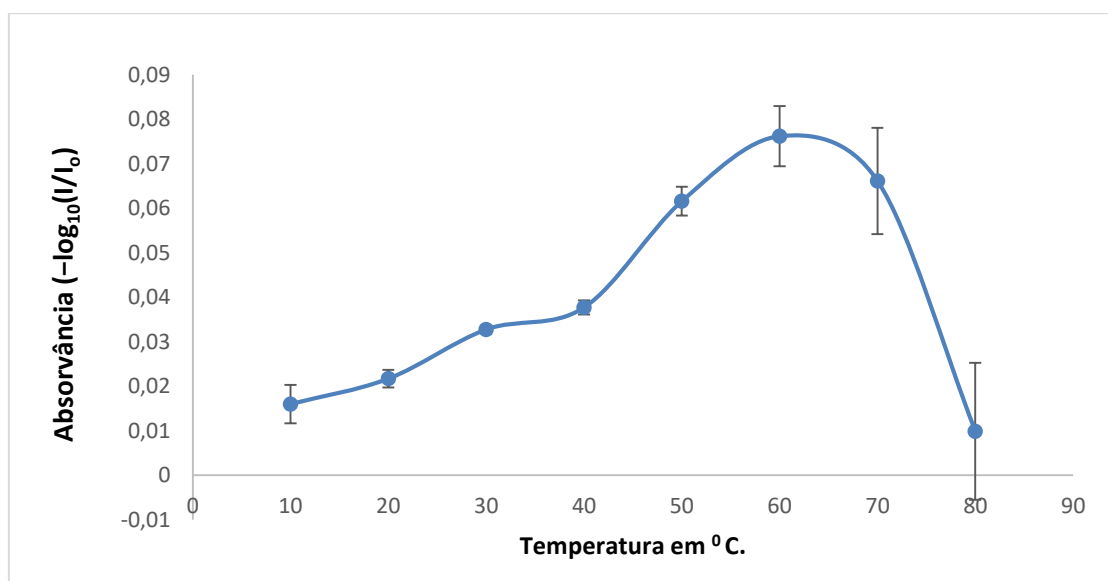


**Figura 22.** Atividade enzimática da ChE já testada (reuso) imobilizada em sílica mesoporosa após 20 dias de armazenamento.



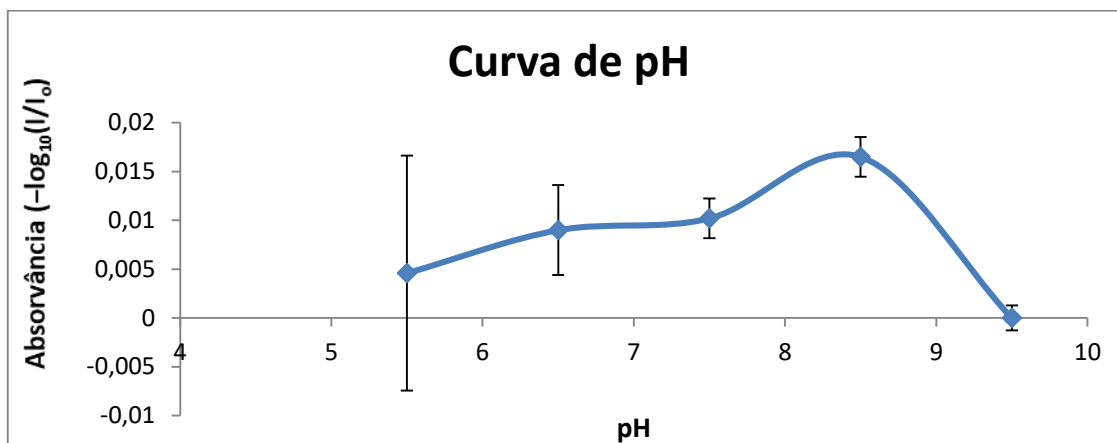
A temperatura de desnaturação da enzima ChE imobilizada, foi de 80°C conforme demonstrado na figura 23. Este extrato bruto de ChE, merece atenção, pois poderá ser utilizado para imobilização e aplicação na construção de biossensores detectores do agente nervoso Paraoxon-etil (Análogo ao Sarin), devido sua alta resistência a temperaturas elevadas, podendo ser armazenado em qualquer local entre 10 e 70°C. Nota-se que, à medida que a temperatura se eleva, ocorre um aumento da atividade enzimática, porém a ChE foi desnaturada a 80°C inibindo sua atividade.

**Figura 23.** Curva de temperatura.



O ensaio da curva de pH, demonstrou conforme figura 24, que houve atividade enzimática em todos os pHs testados com exceção do pH 9,5 onde a atividade foi a zero inibindo a enzima. Embora o pH ótimo para a enzima seja 8,5, foi escolhido o pH de 7,5 para os ensaios pois este é o mais próximo ao pH fisiológico, seguindo a metodologia utilizada por Ellman (1961) adaptado.

**Figura 24.** Curva de pH.



A inibição enzimática da ChE imobilizada em sílica mesoporosa, foi investigado através do IC<sub>50</sub> conforme tabela 2, indicando, que a concentração inibitória da enzima analisada foi de  $2,18 \times 10^{-4} \text{ mmol.L}^{-1}$ .

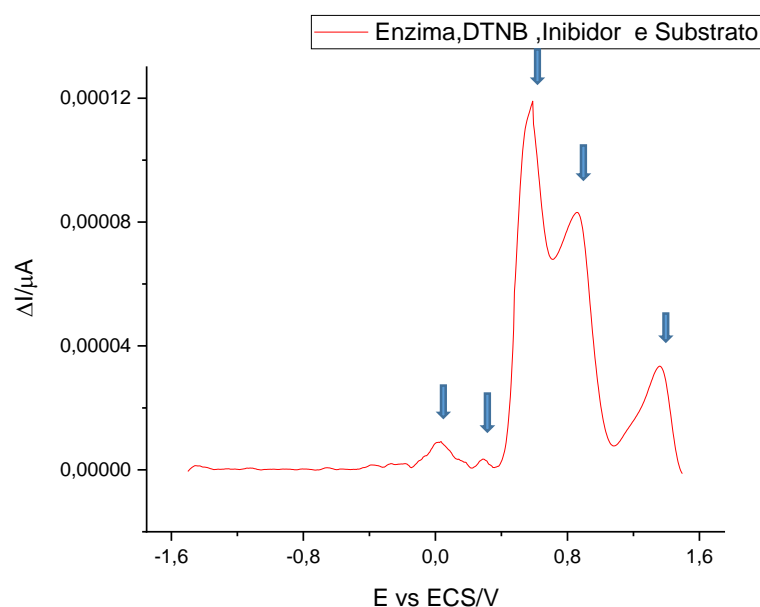
**Tabela 3.** Inibição enzimática de AChE imobilizada em sílica mesoporosa.

Concentração inibitória (IC <sub>50</sub> )	
AChE Inibida em sílica mesoporosa	$2,18 \times 10^{-4} \text{ mmol.L}^{-1}$

Após análises realizadas em espectrofotômetro, ensaios de VOQ em uma célula eletroquímica, foram executados. Frente a isso 5 sinais eletroanalíticos foram obtidos: o primeiro em 0 V e sucessivamente em 0,4 V, 0,8 V, 1,0 V e 1,5 V conforme demonstrado na figura 25.



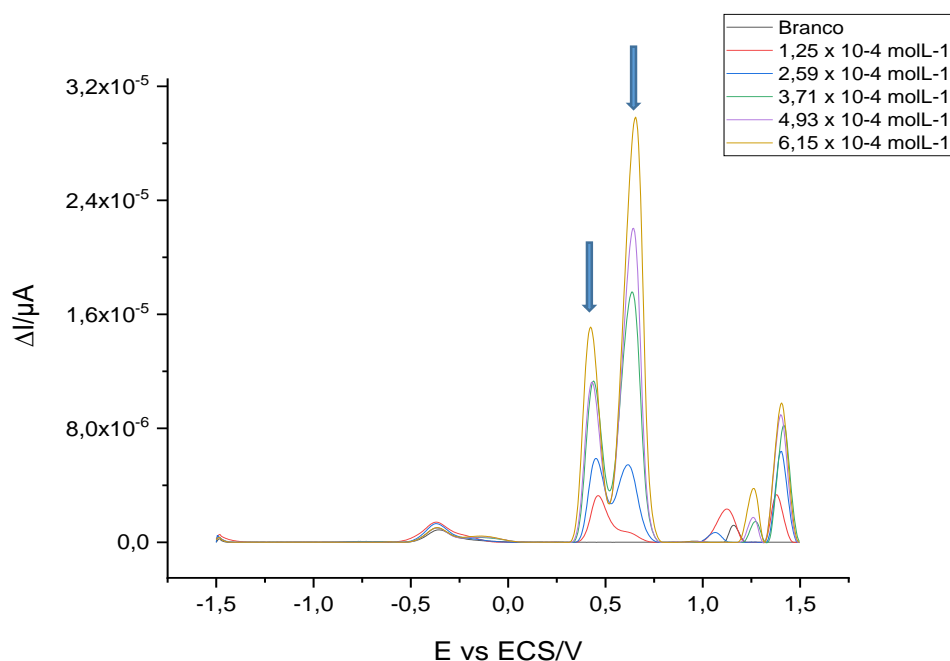
**Figura 25.** Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g de sílica imobilizadas com AChE's, 0,5 mL de DTNB, 0,2 mL de paraoxon-etil (inibidor), 18,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5) e 0,6 mL de iodeto de acetiltiocolina (substrato). Frequência de 60 Hz, Amplitude de 20 mV e Step de 5 mV.



Para as análises posteriores retirou-se o DTNB dos ensaios, pois a técnica utilizada não contemplava, visto que o mesmo por ser reagente de cor, poderia interferir na leitura e obtenção dos dados.

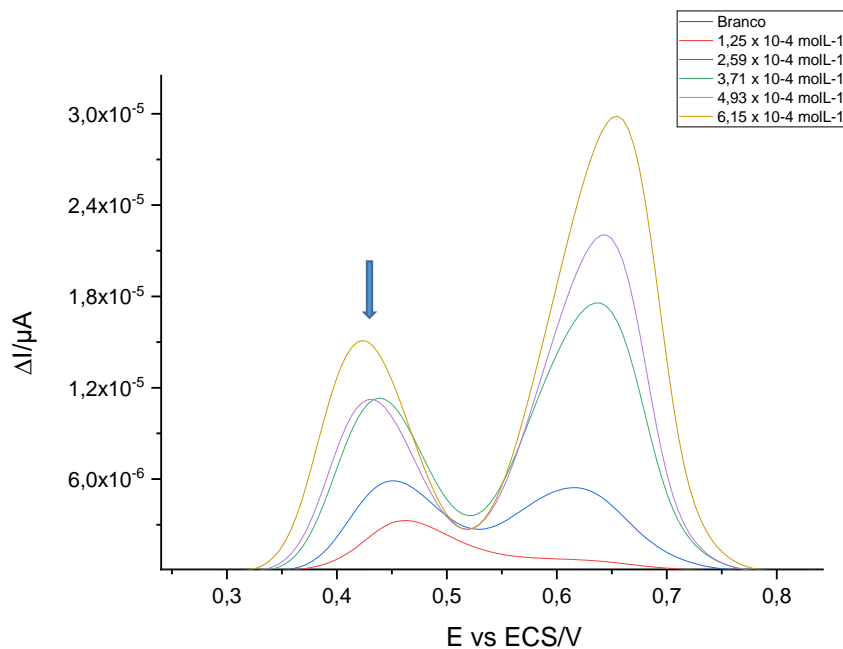
Contudo, foram realizadas novas experimentações afim de determinar qualitativamente o substrato de Iodeto de Acetiltiocolina. Conforme figura 26, observou-se sinais eletroanalíticos lineares entre 0,35 e 0,50 V e outros entre 0,55 e 0,80 V, por outro lado foram encontrados picos sem linearidade em -0,4 V, 1,0 V, 1,2 V e 1,4 V.

**Figura 26.** Voltametria de Onda Quadrada de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações de 1,25 x 10<sup>-4</sup> a 6,15 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de iodeto de acetilticolina, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.



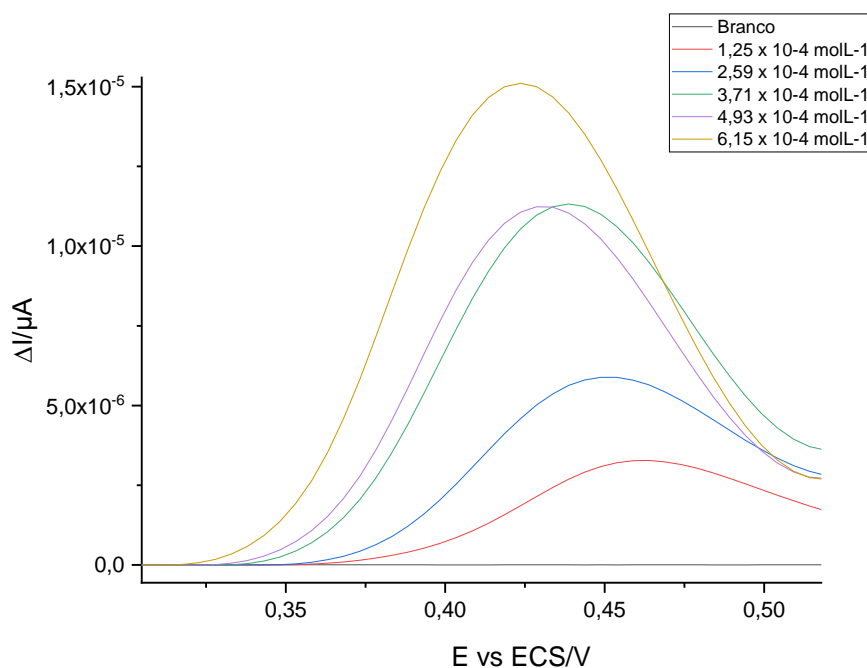
No ensaio subsequente os sinais eletroanalíticos de maiores linearidades foram isolados e analisados, porém notou-se conforme figura 27, que na concentração de  $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  não ocorreu sinal entre 0,55 e 0,80 V, sugerindo que o sinal encontrado entre 0,35 e 0,50 V é do iodeto de acetilticolina (substrato) que foi o analito de interesse. Desta forma, as análises indicaram que os outros sinais eletroanalíticos estavam relacionados ao tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5.

**Figura 27.** Voltametria de Onda Quadrada dos sinais eletroanalíticos encontrados entre 0,35 e 0,50 V e entre 0,55 e 0,80 V, utilizando de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações 1,25 x 10<sup>-4</sup> a 6,15 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de iodeto de acetilticolina, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.



Posto isso, selecionou-se os sinais eletroanalíticos lineares entre 0,35 e 0,50 V que solidificaram a tese que o analito de interesse é o substrato de iodeto de acetilticolina, conforme atestado pela figura 28.

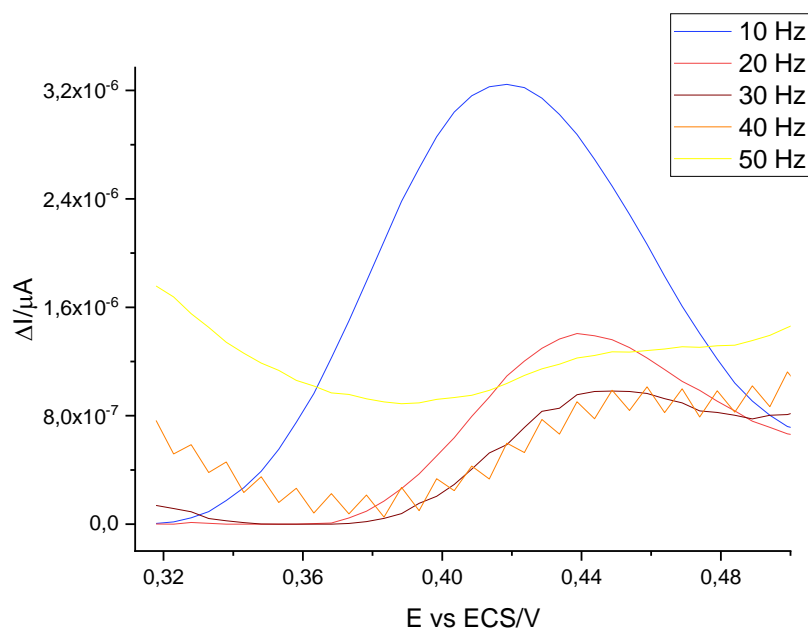
**Figura 28.** Voltametria de Onda Quadrada dos sinais eletroanalíticos encontrados entre 0,35 e 0,50 V, utilizando tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 e concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $6,15 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de iodeto de acetilcolina acrescidos após cada leitura, na frequência de 10 Hz, amplitude 20 mV e step de 5 mV.



Posteriormente aos resultados encontrados no voltamograma no intervalo de 0,35 a 0,50 V a partir de concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $6,15 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> do substrato, realizou-se a otimização dos parâmetros da voltametria, para posterior detecção e quantificação do substrato de iodeto de acetilcolina.

A frequência e a amplitude relaciona-se à altura do sinal eletroanalítico. Para a otimização da frequência, intervalos de 10 Hz a 90 Hz, foram selecionados, juntamente com step de 5 mV e amplitude 20 mV. A figura 29 demonstra as frequências de 10, 20, 30, 40 e 50 Hz. As frequências de 60 a 90 Hz, apresentaram grandes ruídos nas correntes resultantes e por isso foram retiradas da figura.

**Figura 29.** VOQ de  $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de Iodeto de acetiltiocolina nas frequências de 10, 20, 30, 40 e 50 Hz, step de 5 mV, amplitude de 20 mV em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,5).



Para corroborar a escolha do parâmetro frequência, verificou-se o desvio padrão relativo conforme disposto na tabela 3. A frequência de 10 Hz foi selecionada por apresentar o menor valor de DPR e maior sinal eletroanalítico em relação ao substrato. Notou-se a partir desta análise que com o aumento dos valores de frequência ocorreu uma maior alteração da corrente gerando maiores ruídos, no sentido anódico.

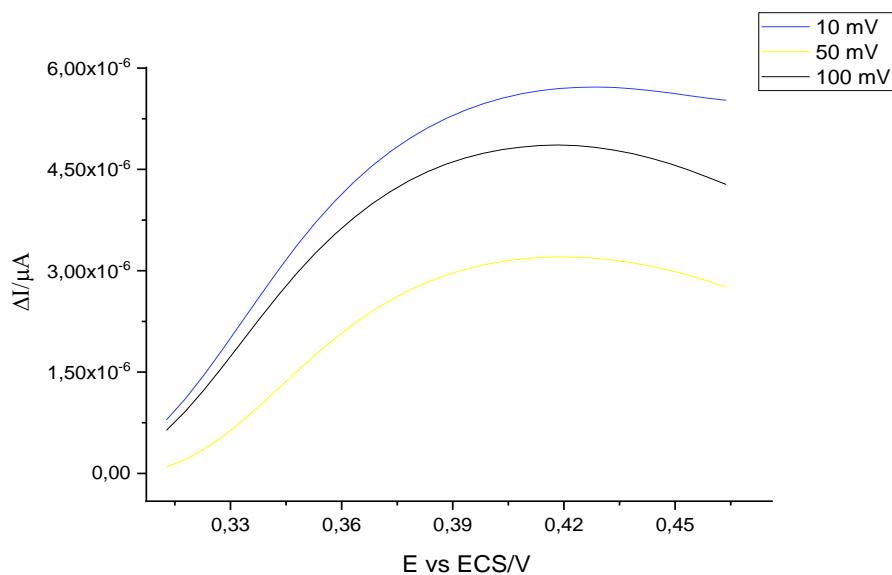
**Tabela 4.** Valores de altura de pico (média-  $\mu\text{A}$ , desvio padrão- S e desvio padrão relativo- DPR) obtido para Iodeto de acetiltiocolina nas frequências de 10, 20, 30,40 e 50 Hz.

	10Hz	20 Hz	30 Hz	40Hz	50Hz
<b>(<math>\mu\text{A}</math>)</b>	$2,449 \times 10^{-6}$	$9,502 \times 10^{-7}$	$3,163 \times 10^{-7}$	$1,38 \times 10^{-7}$	$-9,01 \times 10^{-8}$
<b>S(<math>\pm\mu\text{A}</math>)</b>	$4,428 \times 10^{-7}$	$1,876 \times 10^{-7}$	$2,209 \times 10^{-7}$	$2,59 \times 10^{-7}$	$2,393 \times 10^{-7}$
<b>(%)</b>	18,080	19,745	69,823	187,729	-265,447

Para encontrar a amplitude necessita-se de um equilíbrio entre sensibilidade e resolução. Ficou explícito na figura 30, que na amplitude de 10

mV o substrato demonstrou maior sinal eletroanalítico e menor abertura angular, apresentando conjuntamente menor valor de desvio padrão relativo, o que vai de encontro com a tabela 4. Sendo este selecionado para análises posteriores.

**Figura 30.** VOQ de  $1,25 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, step de 5 mV e amplitude de 10, 50 e 100 mV, em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5).

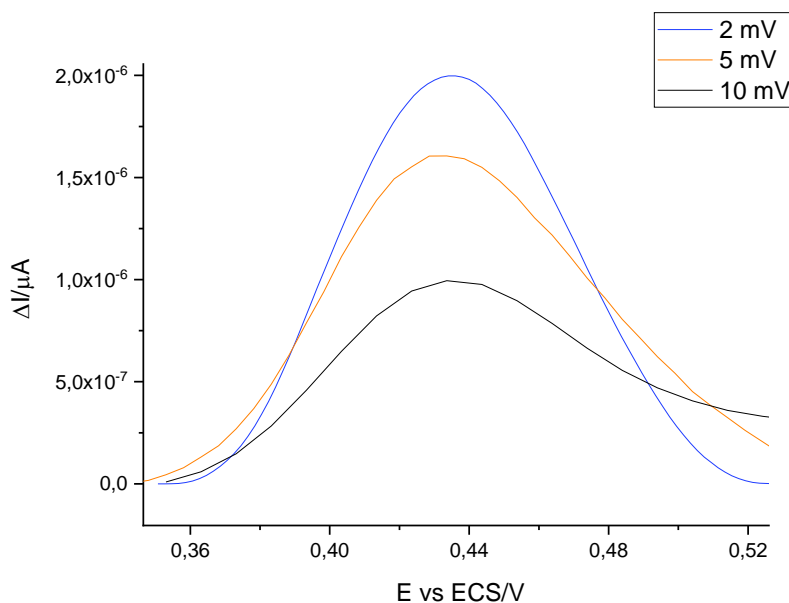


**Tabela 5.** Valores de altura de pico (média-  $\mu$ A, desvio padrão- S e desvio padrão relativo- DPR), obtido para Iodeto de acetiltiocolina nas amplitudes de 10, 50 e 100 mV.

	10 mV	50 mV	100 mV
( $\mu$ A)	$1,625 \times 10^{-6}$	$1,106 \times 10^{-6}$	$4,227 \times 10^{-7}$
S( $\pm \mu$ A)	$1,036 \times 10^{-6}$	$9,083 \times 10^{-7}$	$3,343 \times 10^{-7}$
(%)	63,757	82,129	79,086

Realizou-se a análise de três valores do step: 2, 5 e 10 mV, em que foi possível notar que a altura do sinal eletroanalítico, alcança um valor máximo em 2 mV. Esse, apresenta um sinal mais simétrico, gaussiano, quando comparado aos outros valores. Notou-se também que em 5 e 10 mV, ocorreu um deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos (sentido anódico), como apresentado na figura 31.

**Figura 31.** VOQ de  $1,25 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2, 5 e 10 mV em uma solução de 60 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,5).



Para auxiliar na tomada de decisão, em relação a qual valor de step seria selecionado para subseqüentes análises, realizou-se também o desvio padrão relativo que confirmou a escolha de 2 mV, pois apresentou menor desvio padrão relativo, como apresentado na tabela 5.

**Tabela 6.** Valores de altura de pico (média-  $\mu\text{A}$ , desvio padrão-  $S$  e desvio padrão relativo- DPR), obtido para Iodeto de acetiltiocolina nos Steps de 2,5 e 10 mV.

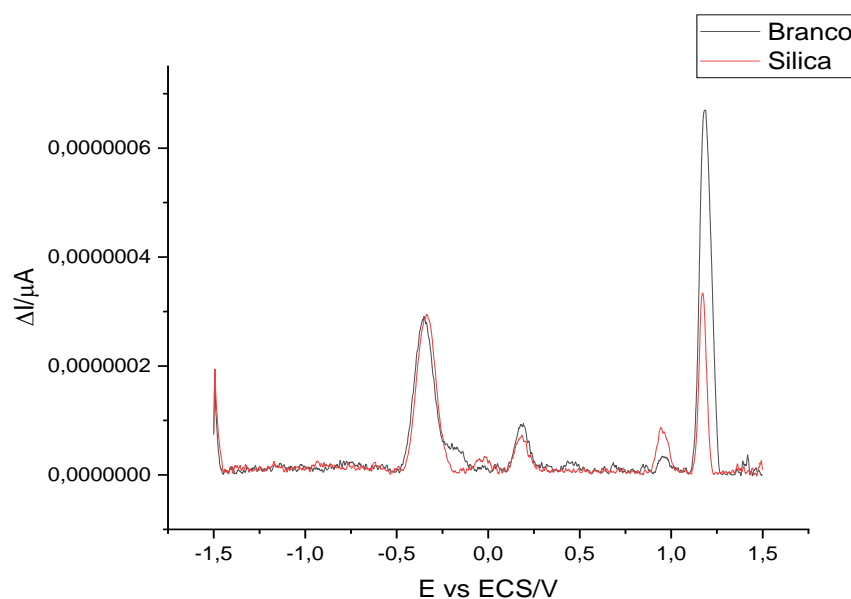
	<b>2 mV</b>	<b>5 mV</b>	<b>10 mV</b>
<b>(<math>\mu\text{A}</math>)</b>	$1,621 \times 10^{-6}$	$1,309 \times 10^{-6}$	$5,777 \times 10^{-7}$
<b>S(<math>\pm\mu\text{A}</math>)</b>	$3,827 \times 10^{-7}$	$3,38 \times 10^{-7}$	$3,129 \times 10^{-7}$
<b>(%)</b>	23,605	25,827	54,168

Com os seguintes parâmetros otimizados: Frequência de 10 Hz, Amplitude do pulso 10 mV e Step de 2 mV, Potencial inicial: +0,3 V e Potencial final: 0,6 V, outros experimentos foram realizados.

Seguidamente à otimização dos parâmetros utilizados na VOQ de  $1,25 \times 10^{-4}$  mol/L de Iodeto de acetiltiocolina, outras análises foram efetuadas. Essas, visavam validar a tese apresentada anteriormente sobre o analito de interesse (substrato de Iodeto de Acetiltiocolina).

Posteriormente, um ensaio da sílica mesoporosa sem AChE's immobilizadas e sem substrato foi realizado, atestando que não ocorreu picos para sílica mesoporosa. Os picos demonstrados na figura 32, estão relacionados ao tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,5) com  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl.

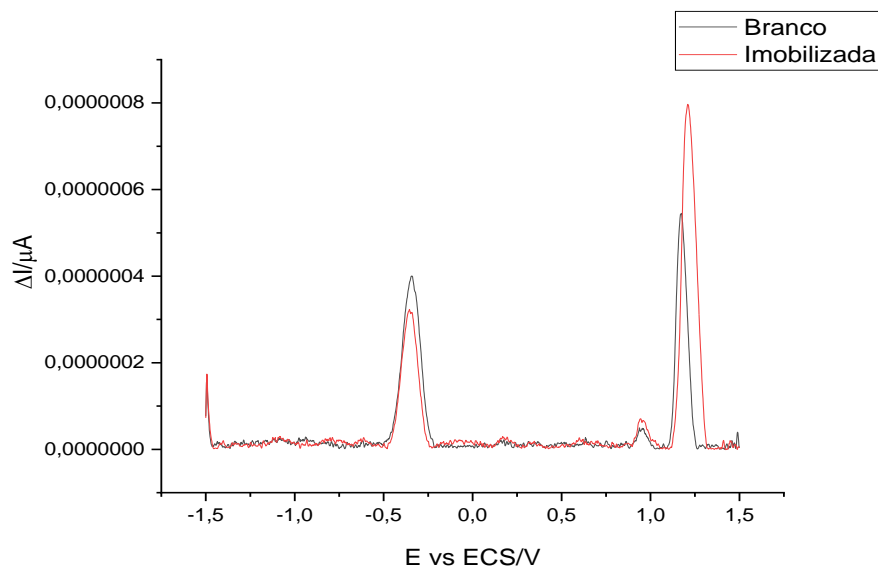
**Figura 32.** Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g da sílica mesoporosa sem AChE's immobilizadas e sem (substrato) na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .



Na experimentação realizada com AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa sem substrato, ficou constatado de acordo com a figura 33, que não houve sinal eletroanalítico relacionado a enzima immobilizada, corroborando que os picos encontrados são do tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,5).

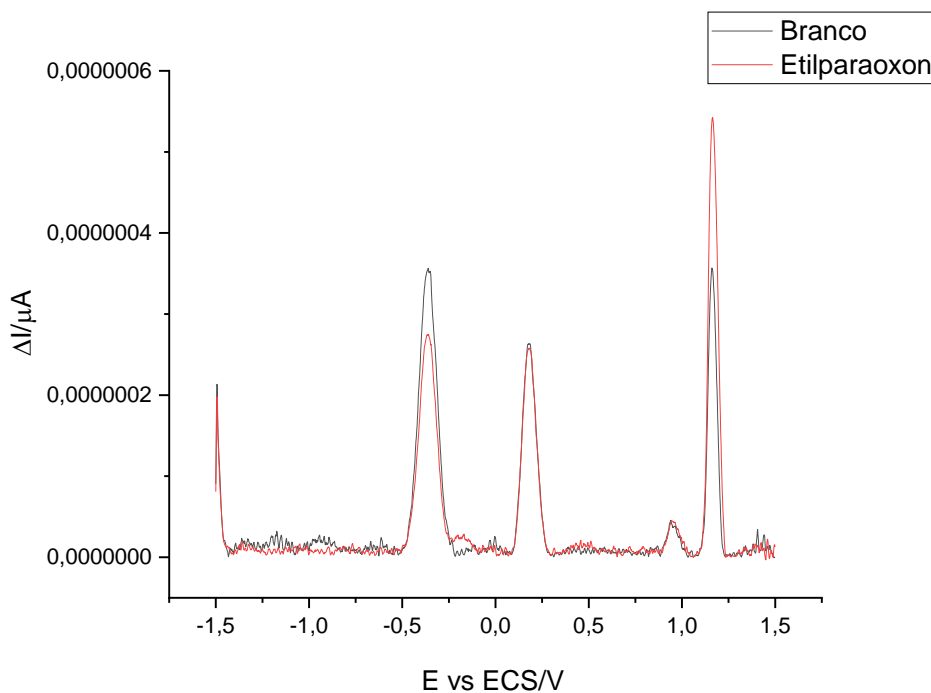


**Figura 33.** Voltametria de Onda Quadrada de 0,002 g de AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa sem substrato na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol/L.



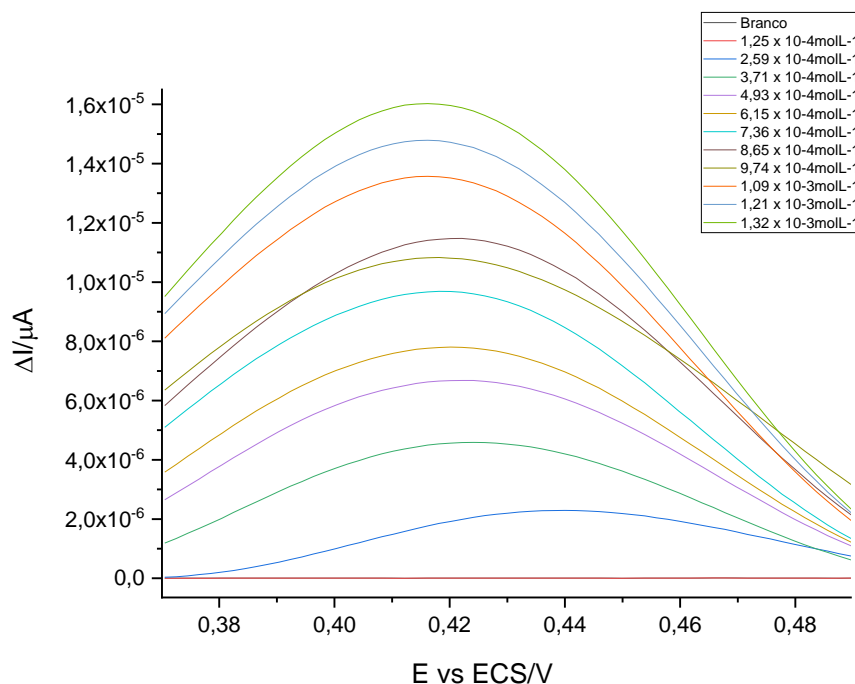
Em relação ao teste do inibidor (Paraoxon-etil,  $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sem substrato e sem AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa, certificou-se de acordo com a figura 34, que não houve pico para inibidor supra citado, determinando que os sinais eletroanalíticos descobertos são mesmo do tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,5). Porém o sinal encontrou-se elevado em 0,2 V pois houve preparação de uma nova solução de tampão fosfato utilizado nesse ensaio.

**Figura 34.** Voltametria de Onda Quadrada do Paraoxon-etil sem substrato e sem AChE's immobilizadas em sílica mesoporosa na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.



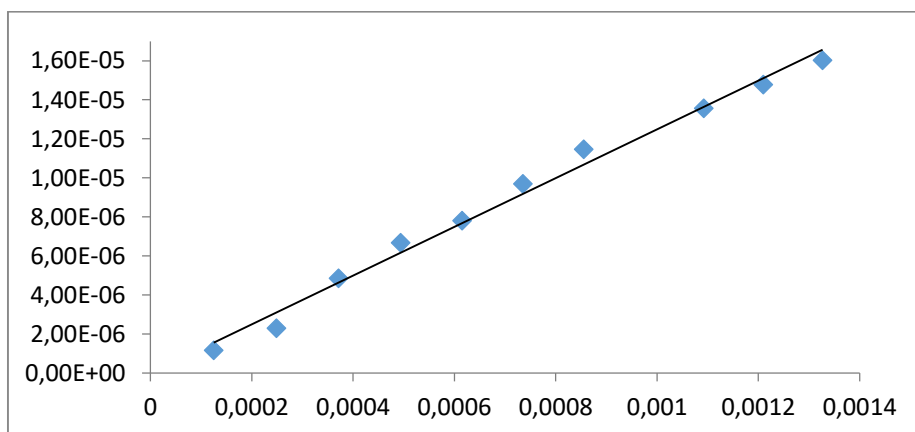
Por conseguinte, um experimento para determinar a curva de calibração do Iodeto de acetiltiocolina foi realizado, utilizando uma frequência de pulso de 10 Hz, step de 2 mV, amplitude de 10 mV, onde foi acrescentado concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina, como atestou os voltamogramas obtidos e expostos na figura 35.

**FIGURA 35.** Voltametria de Onda Quadrada da concentração de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .



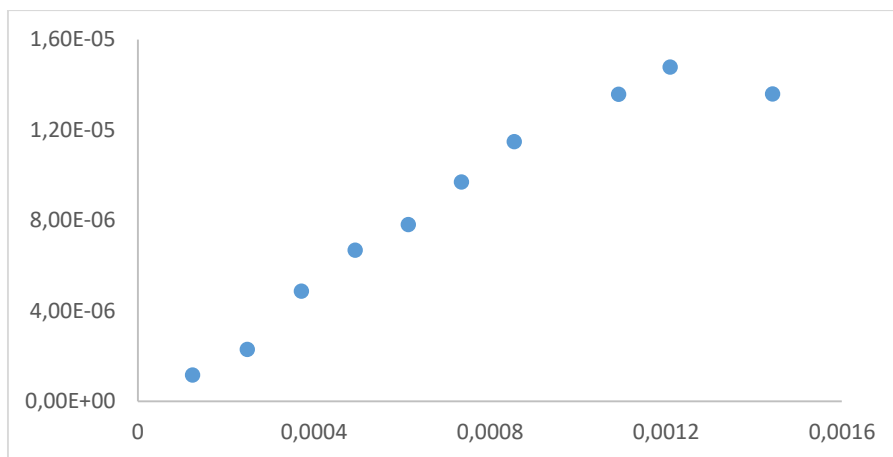
Não obstante, a equação da reta  $y = 0,0125x - 4.10^{-09}$  gerou um coeficiente de correlação de 0,9899, conforme figura 36.

**Figura 36.** Reta de regressão do Iodeto de acetiltiocolina na concentração de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .



Conseqüentemente, as correntes de pico perdem a linearidade em concentrações acima de  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , segundo figura 37.

**Figura 37.** Corrente de pico da voltametria de onda quadrada em concentrações de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , de Iodeto de acetiltiocolina na frequência de 10 Hz, amplitude de 10 mV e step de 2 mV em uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .



Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente,  $1,32 \times 10^{-4}$  e  $4,41 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de substrato de Iodeto de acetiltiocolina em solução aquosa.

Portanto a técnica desenvolvida apresentou-se eficaz para detecção e quantificação na faixa de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  deste substrato enzimático de Iodeto de acetiltiocolina em solução aquosa, podendo ser utilizado, após realização de testes (linearidade, análises de resíduos, sensibilidade LD e LQ, precisão, exatidão, robustez e faixa linear de trabalho) de comparação com outros métodos padrões de leitura. Podendo ser uma ferramenta viável que visará mensurar a inibição enzimática de AChE's, no eletrodo de carbono vítreo.

## 6. DISCUSSÃO

O agente neurotóxico GB é uma arma química utilizada como um potente inibidor da enzima AChE, que é uma proteína que degrada a acetilcolina, o principal neurotransmissor do sistema nervoso periférico. (SANTOS *et al*, 2007). Por ser inodoro, incolor, diluível em água e altamente volátil (25°C), pode ser utilizado para ataques terroristas em reservatórios de águas ou liberados como gás contaminando milhares de pessoas por sua alta toxicidade (TAN *et al*, 2013). A construção de um biossensor amperométrico para identificação deste agente neurotóxico em concentrações traços em meio aquoso (*in loco*), é uma ferramenta importante quando se pretende detectar precocemente esta toxina, minimizando os efeitos colaterais a exposição e preservando vidas.

Assim sendo, foram realizadas análises dos parâmetros cinéticos da ChE. No intuito de verificar se a imobilização alterou os parâmetros cinéticos da mesma, analisou-se a velocidade máxima ( $V_{MAX}$ ) enzimática da ChE livre e imobilizada, que foram respectivamente, 1,257 U.mL<sup>-1</sup> e 4.366 U.mL<sup>-1</sup> em concentrações de 0,886 mmol.L<sup>-1</sup> e 2,180 mmol.L<sup>-1</sup> de substrato de Iodeto de acetiltiocolina como a Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$  aparente). Informação esta, que vai de encontro com o trabalho realizado por Gabrovska *et al* (2008), no qual, descreveram, que o valor de  $K_M$  parece ser fortemente afetado pelo processo de imobilização, pois o valor encontrado da  $K_M$  da ChE imobilizada foi de 3 mmol.L<sup>-1</sup> e o  $K_M$  da AChE livre que foi de 0,9 mmol.L<sup>-1</sup>. Em outro estudo realizado por Joshi *et al* (2018), ficou demonstrado que o processo de imobilização de ChE também interferiu no aumento do valor da  $K_M$ , onde atingiu a concentração de 13 mmol.L<sup>-1</sup>.

Após análises dos parâmetros cinéticos, uma matriz inorgânica foi utilizada para realizar o processo de imobilização enzimática da acetilcolinesterase. Matrizes inorgânicas e orgânicas são utilizadas no processo de imobilização, sendo as primeiras mais empregadas (DOMINGUES-RENEDO *et al.*, 2012; STOYLOVA *et al.*, 2010; MILKANE *et al.* 2010). Portanto uma matriz de sílica mesoporosa SBA-15 foi utilizada nos experimentos realizados por esta pesquisa.

Cardoso *et al* (2009), imobilizaram AChE em capilares de sílica fundida, no qual a enzima foi ligada covalentemente à parede do capilar, utilizando glutaraldeído como espaçador. Esta abordagem não requer enzimas altamente

purificadas ou uma grande quantidade de proteínas, porém aumenta a estabilidade enzimática contra calor, solventes orgânicos e pH, sem muita perda de atividade. As suas aplicações em diferentes áreas de pesquisa como a biotecnologia e a química medicinal, vem sendo amplamente discutidas como no tratamento de portadores de Alzheimer, que apresentam baixos níveis de acetilcolina que estão relacionados com o desenvolvimento da doença. Assim, inibidores de AChE são atualmente utilizados no tratamento da doença, favorecendo o aumento dos níveis da acetilcolina nos pacientes, o que torna essa enzima um ótimo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessa doença.

Singh *et al* (1999), imobilizaram AChE em sílicas mesoporosas a partir de dois ligantes covalentes diferentes, o glutaraldeído – previamente imobilizado à sílica por um composto amino-sililado (aminopropiltrimetóxisilano – APTS), e o éster de N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)-succinimida (GMBS) – imobilizado à sílica por um composto sulfo-sililado (mercaptopropiltrimetóxisilano – MPTS). O uso destas matrizes porosas associadas aos compostos citados acima, não só adsorveu maiores quantidades de enzimas, mas também melhorou significativamente a estabilidade a longo prazo da atividade enzimática.

Em um estudo realizado por Vamvakaki e Chaniotakis (2007), materiais nanoporosos com diferentes tamanhos foram utilizados como matrizes de imobilização e estabilização de AChE para futuros estudos de desenvolvimento de biossensores altamente estáveis e sensíveis. O método utilizado pelos autores, foi a imobilização de enzimas em sílica mesoporosa através de adição de 0,5 g de sílica com nanoporos de 10 nm e 30 nm em 500  $\mu$ l da enzima acetilcolinesterase. A adsorção foi realizada a 4°C por 24 h e, em seguida, a suspensão foi filtrada através de filtros de 0,2 nm. Os grânulos com a enzima imobilizada foram cuidadosamente lavados com tampão, à temperatura ambiente e manteve-se a -20°C para posterior utilização. A taxa de lixiviação das AChE's nos nanoporos de 30 nm foi 1,1 vezes maior do que nos nanoporos de 10 nm evidenciando que a correspondência entre o tamanho dos poros das matrizes e o tamanho molecular das enzimas é essencial para a imobilização e desenvolvimento a longo prazo de biossensores. Este método foi adaptado e aplicado neste estudo.

Os resultados obtidos através das dosagens de aliquotas de proteínas retiradas do sobrenadante de uma em uma hora durante as quatro primeiras horas do processo de imobilização, mostraram uma diminuição progressiva na dosagem de proteínas, indicando que, quanto menor for a dosagem, melhor será o processo de imobilização enzimática, conforme demonstrado na tabela 1.

Constatou-se posteriormente ao processo de imobilização de ChE no suporte sílica mesoporosa, um aumento linear da atividade enzimática, o que faz dessa matriz um bom suporte para imobilização de ChE, sendo estável nos testes de atividade catalítica.

Esses resultados estão de acordo com Cardoso *et al* (2009), que imobilizaram AChE em capilar de sílica fundida em que a mesma mostrou boa estabilidade e atividade enzimática. Kim *et al* (2006), consideram a sílica mesoporosa uma eficiente matriz para fins de imobilização e estabilização. Sendo assim, neste estudo, a sílica mesoporosa SBA-15 mostrou ser uma matriz eficiente para adsorção de AChE, conforme tabela 1.

Uma crescente e constante atividade enzimática também foi observada (figura 20), o que vai ao encontro com estudos realizados por Singh *et al* (1999), que mediram a atividade enzimática de AChE imobilizada em sílica mesoporosa durante um período de 1 ano, observando pouca perda da atividade enzimática ao longo do tempo.

Stoilova *et al* (2010), mediram semanalmente a atividade de AChE purificada de mamíferos, imobilizadas em microfibras e armazenadas em tampão fosfato a 4°C durante um período de 60 dias. Constatando que a AChE imobilizada obteve boa estabilidade e atividade enzimática. Estes resultados vão de encontro com o experimento envolvendo sílica nova e de reuso (10 e 20 dias), realizado por esta pesquisa, que apresentou uma atividade enzimática linear, conforme figuras 20, 21 e 22.

De acordo com Tunç *et al* (2015) a temperatura, a matriz e a técnica de imobilização são fatores importantes que afetam a estabilidade, atividade e a taxa da reação enzimática. Contudo AChE de mamíferos purificadas foram imobilizadas em polianilina e testadas entre 20 e 60°C. A melhor atividade encontrada foi entre 50 e 60°C. Posteriormente a essa temperatura, a enzima foi desnaturada.

Kestwal *et al* (2015), testaram a atividade, sensibilidade e estabilidade da AChE imobilizada em hidrogel de agarose associado a nanopartículas de ouro, entre a faixa de temperatura de 10 a 100°C. Os melhores resultados para os parâmetros citados anteriormente foram acima dos 40°C, podendo atingir um patamar entre 50 e 60°C sem desnaturar. As altas temperaturas aumentam a atividade da enzima aumentando a taxa de difusão de substratos e produtos.

Não obstante, a presente pesquisa imobilizou ChE em sílica mesoporosa SBA-15 que foram testadas entre 10°C e 80°C. Obtendo-se uma atividade enzimática crescente de acordo com o aumento de temperatura, atingindo a melhor atividade entre 60°C e 70°C. Posteriormente a essa temperatura, a enzima foi desnaturada, conforme demonstrado na figura 23. Portanto esta enzima é de fundamental importância para imobilização e aplicação na construção de biossensores detectores de Paraoxon-etil (análogo Sarin), devido sua alta resistência a temperaturas elevadas, que aumentam a atividade enzimática, facilitando a identificação do agente nervoso, podendo ser armazenada em qualquer local entre 10°C e 70°C. A diferença de 10°C em relação a resistência e atividade enzimática obtida neste estudo, pode estar associado a utilização do extrato bruto do peixe (*Paralichthys patagonicus*) e ou do tipo de matriz utilizada, vez que nos estudos de Tunç *et al*, 2015 e Kestwal *et al*, 2015 foram utilizadas enzimas purificadas comerciais e diferentes matrizes.

Em um estudo realizado por Sari *et al* (2016), enzimas imobilizadas em polímeros sintéticos 4BoBPS-Sch (I), 4BoBPS-Sch-Pt (II) e 4BoBPS-Sch-Pt (IV) foram incubadas em diferentes temperaturas variando de 20 a 90°C, medindo a atividade residual da enzima após incubação por 30 minutos. A temperatura ótima para AChE imobilizada nos polímeros sintéticos foram de 40°C, 80°C e 60°C, respectivamente, o que vai de encontro com os estudos citados anteriormente.

O pH é um dos parâmetros importantes capazes de alterar as atividades enzimáticas em solução aquosa (SARI *et al*, 2016).

Kestwal *et al* (2015) em seu estudo, testaram a atividade de AChE imobilizada em hidrogel de agarose associado a nanopartículas de ouro nos pH's de 3,0 a 10,0. Relatando que embora o pH ótimo da enzima seja 8,0, as atividades enzimáticas de AChE melhoraram significativamente em pH 6,0, 7,0 e 9,0.



Sari *et al* (2016), realizaram experimentos com AChE imobilizada em polímeros sintéticos variando o pH entre 3,0 e 9,0. Os resultados mostraram que as melhores atividades enzimáticas foram registradas entre pH 7,0 a 8,0

Em um estudo realizado por Tümtürk e Yükksekdağ (2014), enzimas AChE's foram imobilizadas em nanopartículas de sílicas e incubadas em diferentes pH's (6,0 a 10,0) por 20 minutos a 30°C. A melhor atividade enzimática encontrada foi em pH 8,0, corroborando os resultados do presente estudo que testou ChE imobilizada em sílica mesoporosa nos pH's 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 e 9,5. Notou-se que as melhores atividades enzimáticas ocorreram nos pH's 7,5 e 8,5 conforme figura 17. Embora o ótimo pH seja 8,5, foi escolhido o pH 7,5 por ser mais próximo ao pH fisiológico.

Inibidores enzimáticos, como determinadas drogas e poluentes, estão intimamente correlacionados com a saúde humana e ambiental, portanto, seu monitoramento é de suma importância. Biossensores enzimáticos representam dispositivos econômicos, miniaturizados e fáceis de usar. Principalmente os biossensores baseados em inibição enzimática que são ferramentas analíticas úteis para triagem rápida e monitoramento de inibidores (AMINE *et al*, 2016).

Pascual *et al* (2015), imobilizaram AChE em nanocompostos de sílica para detectarem a presença de inibidores enzimáticos. Para realizar o experimento o inibidor utilizado dentre outros, foi o paraoxon-etil a 2 nM. A taxa de inibição foi de  $1,3 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Yağmurođlu e Diltemiz (2020), imobilizaram AChE em nanofibras de poliestireno maleico anidro (PSMA) para detecção de paraoxon-etil na concentração de 2 ppm. O limite de detecção foi de  $4,57 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Em uma pesquisa realizada por Jouni *et al* (2018) a AChE foi incubada na presença de paraoxon-etil durante 30 minutos a 25°C. A taxa de inibição, IC<sub>50</sub> de AChE foi de  $1,81 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>. Resultado esse que vai de encontro a este estudo, no qual AChE imobilizada em sílica mesoporosa foram incubadas a 37°C por duas horas em uma solução preparada de Paraoxon-etil na concentração de 0,001 mg.L<sup>-1</sup>. A taxa de inibição de AChE, IC<sub>50</sub>, foi de  $2,18 \times 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup>, conforme descrito na tabela 2.

Yoon *et al* (2014) desenvolveram um chip microfluídico com sensor eletroquímico integrado, imobilizando AChE em albumina sérica bovina por ligação cruzada com glutaraldeído, alocadas dentro de microcâmaras

enzimáticas de polimetilmetacrilato (PMMA) e testaram sua sensibilidade para detecção do agente nervoso GB. A combinação de métodos de fabricação sofisticados, garantem uma fabricação rápida e econômica do dispositivo. O chip microfluídico é adequado para a detecção de outros inibidores além dos agentes nervosos e sua miniaturização expandirá a possibilidade de construção de biossensores portáteis.

Isto posto, Pitschmann *et al* (2018), determinaram o limite de detecção de determinadas amostras de agentes nervosos (GB, GD, GF, VX) ou análogos, através de um biossensor construído a partir de uma tira de plástico com 10 cm de comprimento e 1 cm de largura. Em uma extremidade do plástico foi colocado um papel de indicação (1 cm<sup>2</sup>) feito com nanofibras de vidro com ChE imobilizada junto com o substrato. O resultado mostrou que o biossensor é capaz de detectar concentrações inferiores a 0,001 g.mL<sup>-1</sup>. Esses valores são aceitos dentro dos padrões militares de acordo com a norma Nato (2013), que permite uma concentração máxima de agentes nervosos em água potável de 0,012 g.mL<sup>-1</sup> para consumo de 5 Litros por dia (isto é, uma dose de 60 g).

Para Arduini *et al* (2007) detectarem o agente GB na forma gasosa, uma diferente técnica de imobilização das enzimas (BuChE ou AChE) aplicadas na superfície do biossensor foi realizada. Uma mistura de BSA, enzima e Nafion. A mistura foi obtida através de 25 µl de BSA (5% p / v preparado em Água), 25 µl de Nafion (0,1% v / v diluído em água) e 25 µl de uma solução enzimática com uma concentração variando de 1,5 a 150 U ml<sup>-1</sup>. Este método se mostra bastante eficaz, conseguindo detectar o agente GB em uma concentração de 0,1 mg/m<sup>3</sup>.

Viswanathan *et al* (2009) mesclaram polianilina depositada verticalmente em nanotubos de carbono para imobilizar AChE. Os nanotubos foram acoplados de forma vertical em filme de polianilina ligada a enzima e depositado sobre os mesmos. O bloqueio da superfície não modificada foi efetuado com Albumina sérica bovina (BSA) e o biossensor testado para metil paration (análogo ao sarin) e clorpirifós. O limite de detecção do biossensor para ambos os organofosforados foi de  $1 \times 10^{-12}$  mol.L<sup>-1</sup> obtendo boa reprodutibilidade e estabilidade.

Em um método empregado por Zangh *et al* (2012), a AChE foi imobilizada através de um agente ligante em nanopartículas de ouro (AU). Ao invés de realizarem um teste de inibição, um novo tipo de nanobiossensor fluorescente

foi fabricado para detectar metil paration, demonstrando uma alta sensibilidade com limites de detecção tão baixos quanto  $0,4 \mu\text{M}$ . Esse método pode ser aplicado a outras proteínas através de alterações no ligante de afinidade.

Um biossensor eletroquímico metalorgânico modificado de alta sensibilidade (MOF construído a partir de Zircônio e ácido tereftálico com elevada área superficial e alta estabilidade térmica) associado com óxido de grafeno, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e AChE, foi desenvolvido por Mahmoudi *et al* (2019). Esse biossensor, em condições ideais, realizou uma detecção rápida e sensível de paraoxon-ethyl com um limite de detecção de  $0,004\text{nM}$ . Como resultado, o biossensor poderá ser empregado em experimentos de laboratório e de campo.

Tan *et al* (2013), compararam o desempenho de um biossensor amperométrico e um óptico ambos com micro canais de PMMA como matriz de imobilização de AChE para detecção do agente nervoso GB. Os resultados demonstraram que o desempenho da detecção amperométrica foi mais sensível quando comparado com a detecção óptica, conseguindo detectar a presença de GB em uma concentração de  $1 \text{ nM}$ , demonstrando que este método tem um bom potencial para aplicações em campo.

Experimentações realizadas por Pohanka *et al* (2013), geraram um novo procedimento de imobilização baseado na captura de AChE por uma membrana de gelatina, estabilizada pelo glutaraldeído e colocadas sobre um eletrodo de trabalho de platina. Esta técnica identificou os agentes nervosos GB, GD e GA. O melhor limite de detecção foi do GB  $7,41 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ . Assim concluiu-se que o biossensor construído é confiável, tem baixa sensibilidade à interferências externas e é adequado para um ensaio de campo rotineiro, não havendo necessidade de realizar qualquer manipulação elaborada das amostras. No ensaio, os custos globais foram baixos e o biossensor parece ser acessível à produção em grande escala.

Yan *et al* (2016), imobilizaram BuChE em cristais fotônicos (PhC's) com hidrogel, desenvolvendo uma nova técnica para imobilização. Esta técnica associada a construção de biossensores, são capazes de detectar GB em um limite de  $1 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$  e vem atraindo a atenção da comunidade científica.

Qi *et al* (2019) desenvolveram um biossensor de cristal fotônico com AChE's imobilizadas em hidrogel para detecção dos agentes nervosos da série

G, como GB, GA e GD. A faixa de detecção da concentração de GB ocorreu entre  $7,1 \times 10^{-17}$  a  $7,1 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. O Biossensor foi construído com baixo custo, boa sensibilidade, seletividade podendo ser uma ferramenta de detecção rápida, auxiliando no monitoramento de outros agentes nervosos da série G.

Matějovský e Pitschmann (2019), desenvolveram um biossensor colorimétrico indicador com AChE e BuChE imobilizados em nanofibras de vidro para a detecção agentes nervosos GA, GB, GD, VX, usando um indicador constituído por uma mistura de dois corantes trifenilmetano (Fucsina/ Verde Guiné B). Os componentes indicadores são altamente compatíveis e provavelmente tem um efeito sinérgico. O biossensor permite a detecção rápida, simples e robusta desses agentes nervosos em concentrações inferiores a 0,001 µg.L<sup>-1</sup> com sua característica mudança de cor azul-vermelho, benéfico para avaliação visual (olho nu). Os resultados mostraram que o biossensor indicador pode melhorar a qualidade da análise in situ de agentes nervosos, especialmente em condições extremas de campo.

Mahmoud *et al* (2019), utilizaram AChE imobilizada em uma matriz metal orgânica modificada. Um potenciostato ligado a um sensor de Carbono Vítreo como eletrodo trabalho, um eletrodo de platina como auxiliar e um eletrodo de prata como referência foram imersos em uma célula eletroquímica contendo: tampão fosfato salino (pH 7,5) e substrato de Iodeto de acetilticolina. Aplicou-se um potencial voltamétrico que gerou picos entre 0,35 e 0,60 V com um ótimo em 0,52 V. Não foram encontrados sinais eletroanalíticos de AChE e da matriz citada acima, sendo detectado somente o pico relacionado ao substrato. A resposta amperométrica aumentou linearmente quando acrescido concentrações  $6,5 \times 10^{-5}$  a  $3,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de substrato, atingindo um estado estacionário acima desta concentração. Este resultado vai de encontro com a pesquisa realizada, onde utilizou-se um potenciostato interligado um sensor de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, fio de platina como contra eletrodo e o eletrodo calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência. Aplicou-se um potencial voltamétrico que produziu picos entre 0,35 e 0,50 V com um ótimo em 0,43 V (figura 21) e também não foram encontrados sinais eletroanalíticos de AChE e nem da matriz de sílica mesoporosa SBA-15. Porém concentrações entre  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetilticolina (figura 28) foram adicionadas, acima desta concentração perdeu-se a linearidade.

Em um estudo realizado por Kostelnik *et al* (2017), AChE foi imobilizada em nanopartículas magnéticas. Utilizou-se para mensurar o substrato de Iodeto de acetiltiocolina, um sensor de Carbono Vítreo utilizado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência de prata e um eletrodo auxiliar de Carbono Vítreo. Foi aplicado um potencial voltamétrico que promoveu sinais eletroanalíticos entre 0,20 a 0,60 V em uma célula eletroquímica, contendo: tampão fosfato salino (pH 7,4) e concentrações entre  $1,25 \times 10^{-7}$  a  $4,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> de Iodeto de acetiltiocolina. Este, perdeu linearidade acima desta concentração. Este resultado corrobora que, o potencial voltamétrico utilizado nesta pesquisa, gerou sinais entre 0,35 e 0,50 V, com um ótimo em 0,43 V, sendo esta técnica eficaz, para detecção e quantificação do substrato de Iodeto de acetiltiocolina, sendo uma ferramenta importante que poderá ser utilizada para mensurar a inibição da enzima supra citada.

## 7. CONCLUSÃO

Não foram identificados na literatura pesquisada, biossensores construídos com ChE imobilizada em Sílica mesoporosa SBA-15, utilizados para detecção do agente nervoso Paraoxon-etil (análogo ao Sarin).

O extrato enzimático bruto produzido a partir de cérebros do peixe *Paralichthys patagonicus* (linguado branco), demonstrou ser um extrato que contém ChE ativa com atividade enzimática progressiva e constante por mais de 20 dias de armazenamento.

A sílica mesoporosa SBA-15, mostrou ser uma matriz confiável, estável e eficiente para imobilização por adsorção de ChE, contida no extrato bruto.

Os testes de inibição da enzima ChE IC<sub>50</sub>, detectaram o Paraoxon-etil em uma concentração de  $2,18 \times 10^{-4}$  mmol/L, demonstrando quanto sensível pode ser a detecção do inibidor em meio aquoso.

A técnica voltamétrica aplicada, mostrou-se eficiente para detecção e quantificação do substrato enzimático de Iodeto de acetiltiocolina em solução aquosa na faixa de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $1,32 \times 10^{-3}$  mol/L, podendo ser utilizado, após realização de testes de comparação com outros métodos padrões de leitura (linearidade, análises de resíduos, sensibilidade LD e LQ, precisão, exatidão, robustez e faixa linear de trabalho) como uma ferramenta viável que visará mensurar a inibição enzimática de ChE, no eletrodo de carbono vítreo.

O biossensor não foi construído, devido a paralisação das atividades acadêmicas causadas pela pandemia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN, N.; GANJI, M. D.; LAFFAFCHY, M. Theoretical investigation of nerve agent DMMP adsorption onto StoneeWales defected single-walled carbon nanotube. *Materials Chemistry and Physics*, v. 135, p. 569-574, 2012.

ALVIM, R. S.; VAISS, V. S.; LEITÃO, A. A.; BORGES JR., I. A Química Teórica a Serviço da Defesa Química: Degradação de Agentes Neurotóxicos em Superfícies de Óxido e Hidróxido de Magnésio. *Revista Virtual de Química*, v. 6, p. 687-723, 2014.

AMINE, A.; ARDUINI, F.; MOSCONE D.; PALLESCHI, G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010.

ANDREESCU, S.; MARTY, J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, v. 23, p. 1–15, 2006.

ARAÚJO, C. R. M.;; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico *Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (6), 1818-1834, 2016.

BOOT M: *War Made New: Weapons, Warriors, and the Making of the Modern World*; Gotham Books: New York, NY, p. 245–250; 2007.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 32, p. 175-187, 2009.

CASTRO, A. A. (2001). Revisão sistemática e meta-análise. Acessado em 19 de julho de 2017 de <http://metodologia.org/wp-content/uploads/2010/08/meta1.PDF>

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imbolizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DANZIG R, SAGEMAN M, LEIGHTON T, HOUGH L, YUKI H, KOTANI R, HOSFORD Z. M: Aum Shinrikyo: Insights Into How Terrorists Develop Biological and Chemical Weapons. Center for a New American Security: Washington, DC, 2011.

DOMÍNGUEZ. R. O., ALONS, L, M. A.; RECIO, C. P.; ARCOS, M. M. J. Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin. *Science of the Total Environment* . v.426, p. 346–350. 2012.

DRESCH P: A History of Modern Yemen; Cambridge University Press: Cambridge, UK; 2000.

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

GABROVSKA, K.; MARINOV, I.; GODJEVARGOVA, T.; PORTACCIO, M.; LEPORE, M.; GRANO, V.; DIANO, N.; MITA, D.G. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008, 43, 339–345.

GANESAN, K.; RAZA, S.K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Chemical warfare agentes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, v. 2, p. 166-178, 2010.

GOOGLE MAPS. Acessado em 10 de junho de 2020. <https://www.google.com.br/maps/place/Prainha,+Arraial+do+Cabo+-+RJ,+28930-000/@-22.9628942,-42.0299291>.

HAINES, D. D.; FOX, S. C. Acute and Long-Term Impact of Chemical Weapons: Lessons from the Iran-Iraq War. *Forensic Science Review*, 2014.

HARRIS R, PAXMAN J: A Higher Form of Killing: The Secret History of Chemical and Biological Warfare; Random House: New York, NY, 2007.



HESS, G. Syria accused of using chlorine gas as weapon. *Chemical & Engineering*, v. 95, p. 17, 2017.

JIAYU, X; CHUNXIAO, Y; CHAO, L; CHAOHUA, Z; XIAOCHUN, H; FENGLIAN, Q. Photonic crystal hydrogel sensor for detection of nerve agente IOP Conference Series. *Materials Science and Engineering*, 2017.

JOUNI, F; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C; MAZZIA, C; JOBIN, M; CAPOWIEZ, Y; RAULT, M. Interspecific differences in biochemical and behavioral biomarkers in endogeic earthworms exposed to ethyl-parathion. *Chemosphere*, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.060.

JUN, J; LEE, D. H; SHIN, J. O; KIM, W; JANG, J. Fabrication of a One-dimensional Tube-in-tube Polypyrrole/Tinoxide Structure for Highly Sensitive DMMP Sensor Applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2017. DOI: 10.1039/C7TA02725G.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Wiseman: New York, p. 147. 1986.

KESTWAL, R.M.; BAGAL-KESTWAL, D.; CHIANG, B.; FENUGREEK, H. hydrogel-agarose composite entrapped gold nanoparticles for acetylcholinesterase based biosensor for carbamates detection. *Analytica Chimica Acta* 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.06.004.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 1017 – 1026, 2006.

KOSTELNIK, A; KOPEL, P; CEGAN, A; POHANKA, M. Construction of an Acetylcholinesterase Sensor Based on Synthesized Paramagnetic Nanoparticles, a Simple Tool for Neurotoxic Compounds Assay. *Sensors*, 2017.

L. RAMALEY; M. S. KRAUSE JR. Analytical application of square wave voltammetry. *Analyse Chemistry*. 1969. DOI: 10.1021/ac60280a008.

LARTIGES, S. B.; GARRIGUES, P. Gás chromatographic analysis of organophosphorus and organonitrogen pesticides with different detectors. *Analisis*, v. 23, n. 8, p. 418-421, 1995.

LIU, S., YUAN, L., YUE, X., ZHENG, Z., TANG, Z. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate Pesticide Detection. *Advanced Powder Technology*, v.19 p. 419–441, 2008.

MAHMOUDI, E; FAKHRI, A; HAJIAN, A; AFKHAMI, A. High-performance electrochemical enzyme sensor for organophosphate pesticide detection using modified metal-organic framework sensing platforms. *Bioelectrochemistry*, 2019.

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

MATĚJOVSKÝ, L. M; PITSCHMANN, V. New Carrier Made from Glass Nanofibres for the Colorimetric Biosensor of Cholinesterase Inhibitors. *Biosensors*, 2018. DOI:10.3390/bios8020051

MATĚJOVSKÝ, L; PITSCHMANN, V. A Strip Biosensor with Guinea Green B and Fuchsin Basic Color Indicators on a Glass Nanofiber Carrier for the Cholinesterase Detection of Nerve Agents. *ACS Omega*, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.9b02153.

MILKANI, E; KHAING, A. M.; HUANG, F.; GIBSON, D. G.; GRIDLEY, S.; GARCEAU, N.; LAMBERT, C. R.; MCGIMPSEY, W. G. Immobilization of Acetylcholinesterase in Lipid Membranes Deposited on Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, V. 26, n. 24, p. 18884–18892. 2010.

MISHRA, R. K; BARFIDOKHT, A; KARAJIC, A; SEMPIONATTO, J. R; WANG, J; WANG, J. Wearable potentiometric tattoo biosensor for on-body detection of G-type nerve agents simulants. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2018.

MONTES, R; CÉSPEDES, F; GABRIEL, D; BAEZA, M. Electrochemical Biosensor Based on Optimized Biocomposite for Organophosphorus and Carbamates Pesticides Detection. *Hindawi Journal of Nanomaterials*, 2018.

NATO STANDARD AMEDP-4.9. Requirements for Water Potability during Field Operations and in Emergency Situations; Version 1; NATO Standardization Agency: Brussels, Belgium, 2013.

NUNES, G. S. Determinação de pesticidas utilizando biossensores à base de enzimas colinesterases: uma revisão. *Revista Técnico Científica, Curitiba*. v. 6, p. 13-30, 1996.

NUNES, G. S.; JEANTY, G., MARTY, J-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. *Analytica Chimica Acta*, v. 523, p. 107–115, 2004.

OLIVEIRA, M.M; FILHO, M. V. S; BASTOS, V. L. F. C; FERNANDES, F. C; BASTOS, J. C. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian Wshes. *Marine Environmental Research*, v. 63, p. 303–312, 2007.

PASCUAL, L. L; SAYED, S. MARCOS, D. M; MARTNES, R. M. SANCENON F. Acetylcholinesterase-capped Mesoporous Silica Nanoparticles Controlled by the Presence of Inhibitors. *Chemistry and Asian Journal*, 2017.

PASCUAL, L.; SAYED, S.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. COSTERO, A. M.; GIL, S.; GAVIÑA, P.; SANCENÓN, F. Acetylcholinesterase-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles That Open in the Presence of Diisopropylfluorophosphate (a Sarin or Soman Simulant). *Organic Letters*. v. 18, p. 5548–5551, 2016.

PEZZEMENTI, L; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chemico-biological interactions*, v. 187, n. 1-3, p. 27-33, 2010.

POHANKA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. An Acetylcholinesterase-Based Chronoamperometric Biosensor for Fast and Reliable Assay of Nerve Agents. *Sensors*, v. 13, 2013.

POHANKA, M.; DOBES, P.; DRTINOVA L.; KUCĀ, K. Nerve Agents Assay Using Cholinesterase Based Biosensor. *Electroanalysis*, v. 21, n. 10, p. 1177 – 1182, 2009.

QI, F; YAN, C; MENG, Z; LI, S; XU, J; HU, X; XUE, M. Acetylcholinesterase-functionalized two-dimensional photonic crystal for the sensing of G-series nerve agents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01700-w>.

RAMALEY, L. KRAUSE, L. Analytical application of square wave voltammetry. *Analysis. Chemistry.*, v. 41 p. 1365-1369, 1969.

SANTOS, V. M. R., DONICCI, 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*, 2007.

SARI, N.; ÖZKAN, E. H.; YETM, N. K.; Tümtürk, H. Immobilization of Acetylcholinesterase for the determination of pesticides, nanoparticles attached Pt(II) and Pt(IV). *Dalton Transactions*, 2015, DOI: 10.1039/C5DT03004H.

SCHWARTZ F: Neurosciences and research on chemical weapons of mass destruction in Nazi Germany; *J. History Neuroscience*. v, 15, p. 186, 2006.

SINGH, A.K.; FLOUNDERS, A.W.; VOLPONI, J. V. ASHLEY, C. S. WALLY, K. SCHOENIGER, J.S. Development of sensors for direct detection of

organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 14, p. 703-713, 1999.

SILVA, L. M. C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 154. 2011.

SOUSA, A.; SOUSA, E. M. B. Ordered Mesoporous Silica Carrier System Applied In Nanobiothechnology. *Brazilian archives of Biology and Technology an international Journal*, v. 48, p. 243-250, 2005.

STOIALOVA, O.; IGNATOVA, M.; MANOLOVA, N.; GODJEVARGOVA, T.; D.G.MITA, D.G.; Functionalized electrospun mats from styrene–maleic anhydride copolymers for immobilization of acetylcholinesterase. *European Polymer Journal*, v. 46, p. 1966–1974, 2010.

STOIALOVA, O.; IGNATOVA, M.; MANOLOVA, N.; GODJEVARGOVA, T.; MITA, D.G.; Functionalized electrospun mats from styrene–maleic anhydride copolymers for immobilization of acetylcholinesterase. *European Polymer Journal*, v. 46, p. 1966–1974, 2010.

SUSSMAN, L.; HAREL H.; FROLOW F.; OEFNER C.; GOLDMAN A.; TOKER L.; SILMAN I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, v. 253, p. 872–879, 1991.

SYDNES, L. K. Police: Update the Chemical Weapons Convention Bring biological threats into the treaty and make chemists more aware of the dark side of their research, says. *Nature*, v. 496, 2013.

TAN, H. Y.; LOKE, W. K.; NGUYEN, N. T.; TAN, S. N.; TAY, N. B.; WANG, W.; NG, S. H. Lab-on-a-chip for rapid electrochemical detection of nerve agent Sarin. *Biomed Microdevices*, 2013.

THÉVENOT, D. R. TOTH, K DURST, R. WILSON W. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v.16, p.121-131, 2001.

TUMTURK, H.; YÜKSEKDAG, H. Acetylcholinesterase immobilized onto PEI-coated silica nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016. DOI: 10.3109/21691401.2014.962742

TUNÇ, A. T.; KOYUNCU, E. A.; ARSLAN, F. Development of an acetylcholinesterase–choline oxidase based biosensor for acetylcholine determination. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2015.

VAMVAKAKI, N.; CHANIOTAKIS, N. A.; Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 2650–2655, 2007.

VISWANATHAN, S., RADECKA, H., RADECKI, J. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 2772–2777, 2009.

WANG J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev* 108: 814-825, 2008.

WANG, J. *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers: Deerfield Beach, 1985.

YAĞMUROĞLU, O; DILTEMİZ, S.E. Development of QCM based biosensor for the selective and sensitive detection of paraoxon. *Analytical Biochemistry* (2020), DOI: [https:// doi.org/10.1016/j.ab.2019.113572](https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113572).

YAN, C.; QI, F.; LI, S.; XU, J.; LIU, C.; MENG, Z.; QIU, L, XUE, M.; LU, WEI.; YAN, Z. Functionalized photonic Crystal for the sensing of Sarin agents. *C. Yanetal. Talanta* v. 159, p. 412–417, 2016.

YOON, Y. J.; LI, K. H. H.; LOW, Y. Z.; YOON, J.; NG, S. H. Microfluidics biosensor chip with integrated screen-printed electrodes for amperometric detection of nerve agents. *Sensors and Actuators* v. 198, p. 233–238, 2014.

ZHANG, Y; HEI, T; CAI, Y; GAO, Q; ZHANG, Q. Affinity binding-guided fluorescent nanobiosensor for acetylcholinesterase inhibitors via distance modulation between the fluorophore and metallic nanoparticle. *Analyses Chemical*. V. 84, p. 2830-2836, 2008.

ZHU, Y; CHENGA, Z; XIANGA, Q; CHENB, X; XUA, J. Synthesis of functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> with organic fluoroalcohol as high performance DMMP gas sensor, *Sensors and Actuators*, 2016.