



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

**BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS
UTILIZANDO EXTRATO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA (*Genyatremus
luteus*)**

São Luís-MA

2018

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

**BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS
UTILIZANDO EXTRATO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA (*Genyatremus
luteus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para a obtenção
do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Talita da Silva
Espósito.

São Luís-MA

2018

SILVA, ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO.
BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS
UTILIZANDO EXTRATO BRUTO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA
GENYATREMUS LUTEUS / ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA. - 2018.
55 p.
Orientador(a): TALITA DA SILVA ESPÓSITO.
Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2018.
1. ACETILCOLINESTERASE. 2. ENZIMAS. 3. HAEMULIDADE.
4. PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS. I.ESPÓSITO,
TALITA DA SILVA. II. Título.

ALLYSSON KAYRON DE CARVALHO SILVA

**BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS
UTILIZANDO EXTRATO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA (*Genyatremus
luteus*)**

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Talita da Silva Espósito (Orientadora)
Departamento de Oceanografia e Limnologia - UFMA

Prof^o. Dr^a. Alexandra Martins do Santos Soares
Departamento de Engenharia Química - UFMA

Prof^o. Msc. Laiane Araújo da Silva Souto
Faculdade Maurício de Nassau

*Aos meus pais: Eunice e Francisco;
As minhas irmãs Ellen e Elayne.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos meus familiares e principalmente aos meus pais, pelo apoio incondicional, conselhos, força diante das dificuldades e incentivo ao longo desta caminhada, amo muito vocês.

A professora Dra. Talita Espósito, pela orientação e pelos ensinamentos durante o período deste trabalho sempre incentivando cada vez mais a minha vontade de aprender, agradeço pela infinita paciência, dedicação e companheirismo durante os experimentos nos finais de semana e feriados, agradeço também por despertar uma grande paixão pela área de biotecnologia enzimática.

À minha querida amiga Fernanda Jeniffer, agradeço por estar sempre ao meu lado e me motivando, desejo-te toda a felicidade do mundo e que podemos estar sempre em parcerias em pesquisas futuras e que nossa amizade seja eterna.

A Dra. Gilvanda Nunes, pela aceitação de que os testes do biossensor fossem realizados nas dependências do NARP.

Aos meus amigos de laboratório, Marllen, Marcelo, Mônica, Jéssica, Suelma, Carmen Hellen, Isabela e Yohana pela amizade, risadas e convivência ao longo desses anos no BioAqua, vocês fizeram dos meus dias na UFMA mais prazerosos.

Aos meus amigos, Marlete, Marcleane, Amanda, Renata, Heloísa, Wanderson e Sandy.

Obrigado!

RESUMO

O peixe-pedra (*Genyatremus luteus*) encontra-se ao Atlântico ocidental, desde ao Sul do Caribe ao Brasil. É um importante recurso pesqueiro dos estados do Maranhão e Pará, esta espécie sobressai-se nas pescas artesanais realizadas no litoral maranhense, destacando-se entre várias espécies de importância econômica devido a sua grande abundância e apreciação. O alto consumo gera por consequência resíduos. Um dos subprodutos do processamento desta espécie foi utilizado para construção de um biossensor para a detecção de pesticidas, especialmente organofosforados, utilizando a inibição enzimática de acetilcolinesterase encontrada no extrato bruto do cérebro de peixe-pedra (ECP). Foi realizada a caracterização do ECP, temperatura e pH ótimo, estudos cinéticos com diferentes concentrações do substrato. Para construção do biossensor, o ECP foi adicionado a uma pasta de carbono grafite com o mediador tetracianoquinodimetano (TCNQ) e Meldola's Blue. Após o preparo dos sensores, iniciou a caracterização eletroquímica do sistema sensor-enzima imobilizada, os resultados foram registrados. A construção deste biossensor vem em substituição a acetilcolinesterase de Enguia Elétrica comercializado pela Sigma, de elevado preço e não produzido no Brasil, tornando-se uma alternativa mais barata para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos.

Palavras chave: *Enzima, acetilcolinesterase, pesticidas organofosforados, Haemulidade*

ABSTRACT

The stonefish (*Genyatremus luteus*) lies to the western Atlantic, from the South of the Caribbean to Brazil. It is an important fishing resource of the states of Maranhão and Pará, this species stands out in the artisanal fisheries carried out in the Maranhão coast, highlighting among several species of economic importance due to its great abundance and appreciation. The high consumption consequently generates waste. One of the byproducts of the processing of this species was used to construct a biosensor for the detection of pesticides, especially organophosphates, using the enzymatic inhibition of acetylcholinesterase found in crude fish-stone brain (ECPP) extract. The characterization of ECPP was performed, temperature and optimum pH, kinetic studies with different concentrations of the substrate. For construction of the biosensor, ECPP was added to a graphite carbon paste with the tetracyanidinedimethane mediator (TCNQ) and Meldola's Blue. After the sensors were prepared, started the electrochemical characterization of the immobilized sensor-enzyme system, the results were recorded. The construction of this biosensor comes in place of acetylcholinesterase of Electric Eel commercialized by Sigma, high price and not produced in Brazil, making it a cheaper alternative for the development of enzymatic biosensors.

Keywords: *Enzyme. Acetylcholinesterase. Organophosphate pesticides. Haemuldade.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Meio de contaminação dos pesticidas no meio ambiente.....	19
Figura 2: Mapa de contaminação por agrotóxicos no Brasil.....	20
Figura 3: Mecanismo de inibição da AChE por pesticidas organofosforados.....	21
Figura 4. Distribuição de enzimas utilizadas para construção de biossensores baseados em inibição.....	24
Figura 5: Peixe <i>Genyatremus luteus</i>	25

Artigo: Biossensor Enzimático para Detecção de Pesticidas Utilizando Extrato do Cérebro de Peixe Pedra (*Genyatremus luteus*)

Figura 1. Sensor serigrafado para o desenvolvimento do biossensor enzimático contendo ECPP rico em AChE.....	39
Figura 2. Preparação dos biossensores para os ensaios operacionais com a adição da pasta enzimática contendo ECPP nos sensores com mediadores TCNQ e Meldola's Blue em Solução tampão (PBS) 1,0 mol.L ⁻¹ , pH 7,2 e substrato iodeto de acetiltiocolina.....	40
Figura 3. Efeitos de diferentes pH sobre atividade enzimática do ECPP.....	42
Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial (E/V) potencial e (I/A) corrente gerados em testes de otimização do biossensor com ECPP imobilizado com e sem a presença de BSA e sem a presença de BSA em solução de substrato AcSh e tampão (PBS) (1,0mol.L ⁻¹).....	43
Figura 5. Voltamograma de pulso diferencial (E/V) potencial e (I/A) corrente usando o biossensor em condições operacionais em solução tampão (PBS) 1,0 mol.L ⁻¹ , pH 7,2, e iodeto de acetilcolina com o mediador TCNQ.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade enzimática do ECPP rico em AChE e AChE de enguia elétrica	41
Tabela 2 - Comparação de K_m , pH ótimo e temperatura ótima de AChE de outros peixes em diferentes órgãos com o ECPP rico em AChE.....	42

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AChE (EE) - Acetilcolinesterase extraída da enguia eléfrica

ACh – Acetilcolina

AcSCh – Iodeto de Acetilcolina

BSA – Albumina de Soro Bovino

DTNB – 5,5 - ditiobis (2 - ácido nitrobenzóico)

ECPP – Extrato do cérebro de peixe - pedra

G. luteus – *Genyatremus luteus*

HCl – Ácido clorídrico

HEC – Hidroxietil Celulose

OPs – organofosforados

PBS – Solução tampão fosfato

TCNQ – Tetracianoquinodimetano

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

TCh – tiocolina

VPD - Voltamograma de pulso diferencial

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos Específicos.....	16
3.REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Poluição das Águas.....	17
3.2 Pesticidas	17
3.2.1 Toxicidade dos Inseticidas Organofosforados.....	21
3.3 Biossensores Enzimáticos.....	22
3.3.1 Enzima acetilcolinesterase(AChE)	23
3.4 O Peixe - Pedra.....	24
4. REFERÊNCIAS.....	26
ARTIGO: BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO EXTRATO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA (<i>Genyatremus luteus</i>).....	32
5.ANEXO.....	48

1. INTRODUÇÃO

A água é um elemento fundamental para a existência de vida na terra, sem ela não existe a possibilidade de sobrevivência para qualquer ser. É por meio dela, que os relevos são modelados, os solos são formados, a fauna, a flora, o clima, a sociedade, enfim, seja de forma direta ou indireta ela se configura como um propulsor de vida. (SILVA, 2017). A contaminação da água é uma das mais preocupantes por ser um insumo indispensável não só aos organismos vivos, mas também à produção e ao desenvolvimento social e econômico (RIBEIRO, 2011).

Nos últimos anos, os impactos ambientais de origem antrópica têm aumentado consideravelmente a poluição dos recursos hídricos, afetando todo o ecossistema aquático. O crescimento industrial e populacional ocasionou um aumento da produção e emissão de poluentes nos corpos d'água (FERREIRA *et al.*, 2017). A contaminação do ambiente aquático, principalmente das águas superficiais, tem sido documentada no mundo todo e constitui uma das maiores preocupações que tem surgido no que diz respeito à escala local, regional e global (KONSTANTINO *et al.*, 2006). Se não removidas durante o processo de tratamento de água, esses contaminantes tóxicos podem causar a depreciação da qualidade das águas (CARLOS *et al.*, 2011), representando impactos negativos à ecologia dos ambientes aquáticos e riscos à saúde humana (DIAS *et al.*, 2016).

Os agrotóxicos, quando em contato com o solo, a água e o ar, podem persistir nesses compartimentos ambientais e também se acumular no solo e na biota. Os seus resíduos podem ser carregados para as águas superficiais por escoamento e para as águas subterrâneas por lixiviação (NUNES *et al.*, 2014).

Os pesticidas da última geração têm sido amplamente usados ao redor do mundo e são altamente tóxicos, permanecendo no ambiente e causando sérios problemas aos ecossistemas e à saúde humana. Entre os pesticidas, os inseticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs) representam importante classe de compostos tóxicos, sendo que sua toxicidade é baseada na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), responsável pelos impulsos nervosos (MENDONÇA *et al.*, 2012).

As acetilcolinesterases de organismos aquáticos são bastante utilizadas como biomarcadores e as razões de sua utilização se ligam ao fato de poluentes de diversas fontes chegarem aos recursos hídricos e também à sua alta posição nas cadeias alimentares o que aumenta detecção de anticolinesterásicos bioacumuláveis. Os critérios de escolha das

espécies se dão através de características como habitat, ecologia, hábitos alimentares, abundância e facilidade de captura (ASSIS, 2011).

As condições fisiográficas e geográficas da costa do Maranhão contribuem positivamente para a existência de ambientes favoráveis ao desenvolvimento de uma grande diversidade de peixes, rotulando assim, o Maranhão, como um dos principais produtores de pescado na região Nordeste do Brasil (NOLETO-FILHO *et al.*, 2012).

Nas pescas artesanais realizadas na Baía de São José destacam-se várias espécies de importância econômica. A espécie *Genyatremus luteus*, vulgarmente conhecida como peixe-pedra, sobressai-se devido a sua grande abundância e apreciação pela população da cidade de São José de Ribamar, onde ocupa as primeiras posições no “ranking” do consumo diário de pescado (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Um biossensor é definido como um tipo de dispositivo analítico que, incorporado a um material biológico, utiliza a seletividade e a sensibilidade do bioreceptor, conectado a um sensor base (transdutor) (MARTINEZ, 2011).

Os biossensores mais estudados nos últimos tempos, são os biossensores enzimáticos, utilizando a técnica de imobilização enzimática em um transdutor para a conversão de reações químicas em corrente, tensão, ou transformar em qualquer forma de energia mensurável (CAMARGO, 2017).

Nas últimas décadas, biossensores baseados na enzima acetilcolinesterase (AChE) têm emergido como uma técnica promissora para investigações de toxicidade, monitoramento ambiental, controle de qualidade de alimentos e investigações militares. A principal aplicação de biossensores baseados nas AChE's tem sido para detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos por inibição enzimática (SINHA *et al.*, 2010).

Estes dispositivos são projetados para complementar ou substituir os métodos analíticos de referência existentes (cromatográficos), simplificando ou eliminando a preparação da amostra, diminuindo assim o tempo de análise e os custos (SINHA *et al.*, 2010). Os biossensores representam, portanto, uma alternativa viável a ser utilizada durante estudos envolvendo monitoramento ambiental, porque sua execução inclui relativamente uma alta sensibilidade e seletividade, rápida resposta, baixo custo, além de um fácil manuseio (DONDOI, 2006).

Os biossensores têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à sua capacidade de portabilidade, miniaturização e rapidez de resposta (LEITE, 2013). Na maioria dos casos, para a sua utilização não são necessários técnicos ou especialistas, podendo, em alguns casos, dispensar o uso de reagentes. Podem ser confeccionados para uso contínuo, em linha no processo, ou como descartáveis. Portanto, representam uma

ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas existentes (NUNES *et al*, 2014).

Sendo assim, os biossensores são materiais de baixo custo, versáteis, de fácil síntese e com grande potencial analítico, sendo considerados dispositivos promissores, devido sua facilidade de manipulação e simplicidade, sendo alvo cada vez mais de pesquisas em diferentes áreas (CAMARGO, 2017).

Devido ao fato do extrato do cérebro de peixe pedra ser uma fonte rica em acetilcolinesterase, ser de fácil extração e de baixo custo de produção, sugere-se que esta enzima possa ser empregada como biossensor para detecção de pesticidas organofosforados em matrizes ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Construir um biossensor a partir do extrato do cérebro do peixe *G. luteus* para detecção de pesticidas.

2.2 Específicos

- Determinar e comparar a atividade enzimática do extrato de cérebro do peixe-pedra e da enzima comercial;
- Preparar uma pasta sensível da enzima, contendo o mediador eletroquímico;
- Construir um biossensor do tipo serigrafado contendo enzima e mediador, a partir do preparo de uma pasta;
- Estudar e otimizar as melhores condições de trabalho (potencial de trabalho, pH, tipo de mediador eletroquímico, etc) para o sistema biossensor;
- Comparar atividade enzimática do extrato bruto com a acetilcolinesterase de enguia elétrica (enzima comercial);

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Poluição das águas

A água é um recurso natural essencial à vida e ao desenvolvimento das comunidades humanas. Entretanto, não basta que as populações apenas disponham de água, é necessário também que essa água se caracterize por um mínimo de qualidade (AMARAL *et. al.*, 2003).

A poluição de águas doces é um problema para metade da população mundial. O aumento das atividades humanas e industrialização têm elevado os níveis de poluentes físicos, químicos e biológicos em mananciais. Além disso, a população mundial aumenta em um ritmo acelerado. Agricultura, indústria e cidades estão utilizando mais água. A demanda por água está dobrando a cada 21 anos, e isso acontece mais rapidamente em algumas regiões específicas (ANIRUDDHA e KUMAR, 2015; AHUJA, 2014; ZINI, 2016).

A escassez e o uso intensivo da água resulta na necessidade do gerenciamento dos recursos hídricos com o controle ambiental, de forma a impedir que problemas decorrentes de poluição da água venham comprometer seu aproveitamento múltiplo e integrado. Dessa forma os dados obtidos em atividades de monitoramento, por meio da utilização de indicadores físicos, químicos, microbiológicos e de pesticidas, são características ou componentes específicos da água e podem indicar quanto os ecossistemas aquáticos podem estar sendo afetados (VASCO *et al.*, 2011).

Na região amazônica, o comprometimento da qualidade da água, de uma forma global, está diretamente relacionado à possibilidade do avanço da agricultura com uso mais intensivo de agroquímicos, principalmente na cultura da soja. Ainda não existem estudos ou qualquer tipo de monitoramento que evidenciem uma situação preocupante na região (GOMES *et al.*, 2014).

3.2 Pesticidas

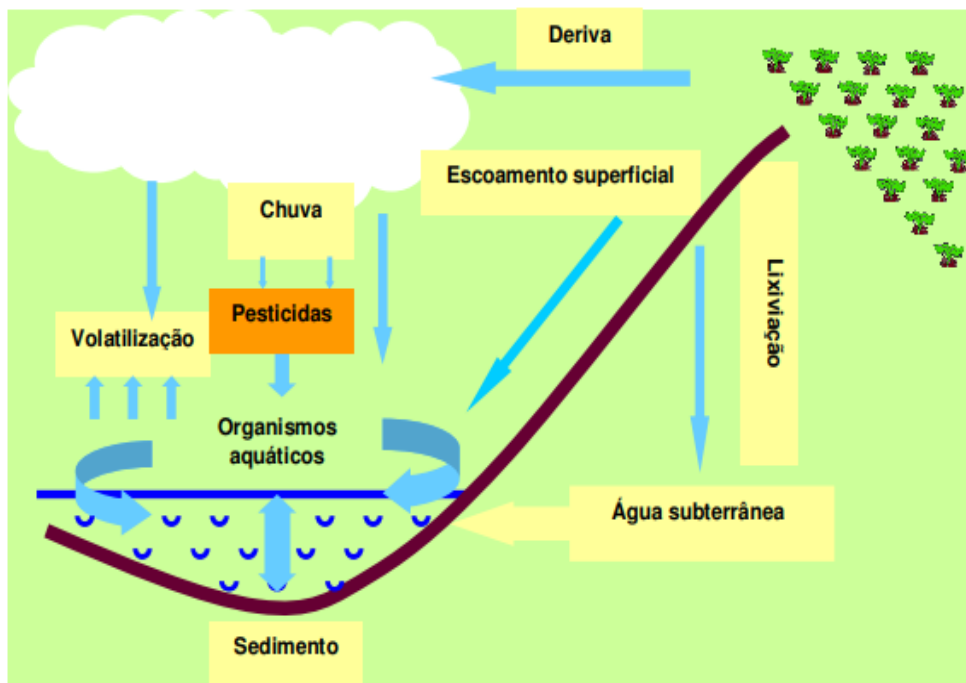
De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, pesticidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Ou seja, são substâncias que visam mudar a composição da fauna e flora para

preservá-las de ações danosas de seres vivos considerados nocivos, também são considerados pesticidas produtos desfolhantes, dessecantes, estimuladores, e inibidores de crescimento. Os pesticidas, também conhecido como agrotóxicos, podem ser classificados em duas formas diferentes, os agrícolas e os não-agrícolas (CARMAGO, 2017).

A produção agrícola brasileira tem tido grande destaque em um contexto mundial. O crescimento da produção é acompanhado pelo incremento da utilização de agrotóxicos, sem um controle mais efetivo do seu consumo. Isto pode implicar em um aumento dos impactos sobre os ecossistemas aquáticos e a biota do solo. A aplicação incorreta e excessiva de pesticidas pode causar desequilíbrios ambientais com efeitos agudos e crônicos nos organismos vivos. A magnitude dos efeitos depende da toxicidade da substância, da dose, do tipo de contato e do organismo. Alguns destes compostos são reconhecidamente persistentes, permanecendo no ambiente por muito tempo sem sofrer alteração. Assim, os dados referentes à qualidade da água nos rios brasileiros podem ser considerados críticos (CHIARELLO *et. al*, 2017).

A aplicação de pesticidas pode ocorrer por via sólida, líquida ou gasosa, sendo que a forma líquida é a maneira predominantemente utilizada, onde uma formulação é geralmente diluída em água formando a calda, a qual é aplicada na forma de gotas por meio de pulverização. Após a aplicação, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam o comportamento dos pesticidas no ambiente. O destino destes compostos no ambiente é governado por processos de retenção (adsorção e absorção), transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), além de interações destes processos (Figura 1) (SPADOTTO, 2006).

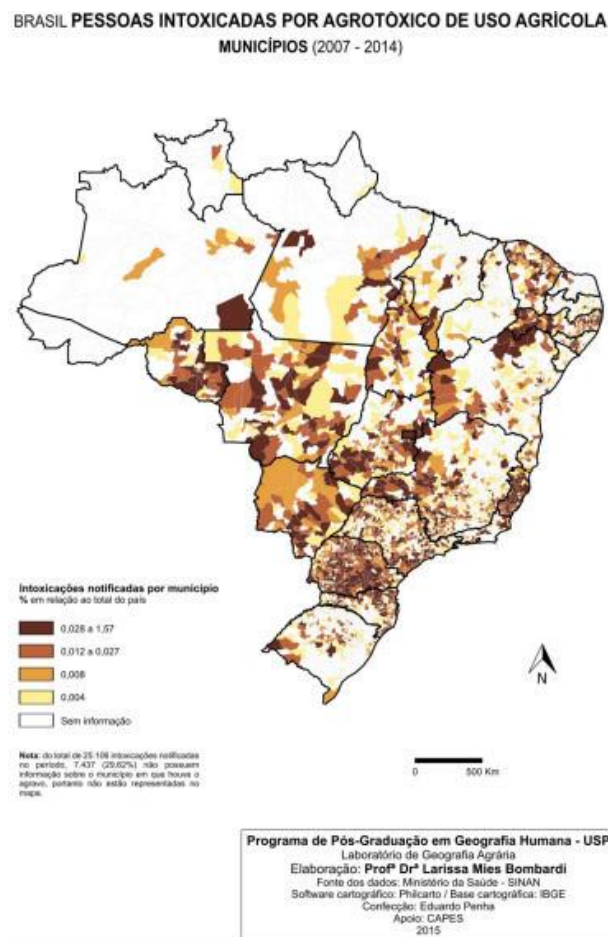
Figura 1. Meio de contaminação dos pesticidas no meio ambiente



Fonte: ASSIS (2008).

O Brasil assumiu, a partir de 2008, o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos. Além disso, dados coletados em 2011 pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (Para), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), mostraram que quase um terço dos alimentos consumidos pelos brasileiros estavam contaminados por esses produtos, apresentando resíduos de substâncias não autorizadas ou níveis de contaminação acima dos aceitáveis para aquelas de uso autorizado (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Entre os anos de 2007 e 2015, foram notificados 84.206 casos de intoxicação por agrotóxicos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), sendo que em 2014 foi identificada a maior incidência de casos, de 6,26 por 100 mil habitantes (Figura 2) (ENSP, 2017).

Figura 2. Mapa de contaminação por agrotóxicos no Brasil

FONTE: CFN (2016).

Segundo INPEV (2013) o Maranhão ocupa atualmente a nona posição entre os estados que mais utilizam agrotóxicos e o segundo do Nordeste que mais destinam corretamente as embalagens.

O Estado tem como principais atividades, a agricultura e a pecuária, predominando a agricultura familiar, com baixa produção de alimentos e caracterizada por pequenas propriedades rurais, mas que utiliza diversas classes de agrotóxicos para a proteção de suas lavouras (CENSO/IBGE, 2010).

No Estado do Maranhão, o uso de defensivos agrícolas tem crescido muito, sobretudo aqueles destinados à proteção de monocultivos, como a soja. Aliado a esse crescimento, há ainda a falta de conhecimento básico por parte dos trabalhadores rurais que utilizam esses compostos, o que tem ocasionado problemas sérios, não só no ponto de vista ambiental como de saúde pública (SHAMAGSUMOVA *et al*, 2015).

Assim como em várias regiões do Brasil, o uso de substâncias químicas constitui-se grave problema de saúde pública, necessitando urgentemente de intervenção, visto que

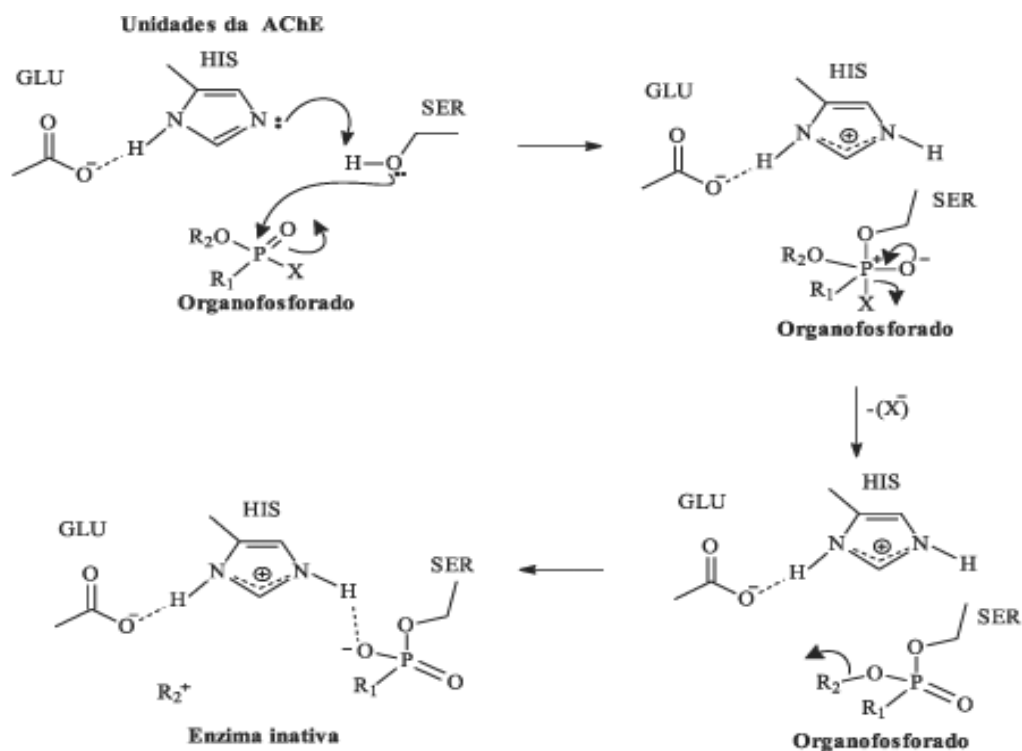
o uso inadequado dessas substâncias e a exposição da população pelo consumo de água e alimentos contaminados têm causado alterações do equilíbrio ecológico (SES/MA, 2014).

3.2.1 Toxicidade dos Inseticidas Organofosforados

Os inseticidas organofosforados estão entre os agrotóxicos de maior toxicidade aguda disponíveis no mercado e são usados em várias regiões do Brasil (NAKAGAWA *et. al.*, 2016). Embora não seja tão persistente no ambiente quanto os pesticidas organoclorados, sua utilização pode causar danos em longo prazo ao ambiente e à saúde humana, pois muitos dos princípios ativos apresentam efeito bioacumulativo e alta toxicidade (WEI e WANG, 2015).

Os organofosforados, como os carbamatos, são largamente usados como inseticidas, inibindo a enzima acetilcolinesterase nos sistemas nervosos de vertebrados e de invertebrados (FOURNIER *et. al.* 1994). A inibição da acetilcolinesterase é irreversível; desta forma, a acetilcolina é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo um acúmulo da mesma onde é normalmente liberada, resultando, toda a sintomatologia da intoxicação por acetilcolina ocasionada por compostos organofosforados (Figura 3) (SEGAL e CASIDA, 1983; SANTOS, 2007).

Figura 3. Mecanismo de inibição da AChE por pesticidas organofosforados



FONTE: SANTOS (2007).

Segundo Silva (2014) devido a sua menor persistência no ambiente, os OFs vieram substituir os inseticidas organoclorados (OCs); porém sua toxicidade a mamíferos é bem maior, o que justifica o controle desses compostos no campo.

3.3 Biossensores Enzimáticos

Um biossensor é definido como um tipo de dispositivo analítico que, incorporado a um material biológico, utiliza a seletividade e a sensibilidade do bioreceptor, conectado a um sensor base (transdutor) (MARTINEZ, 2011). Biossensores enzimáticas têm sido muito utilizadas para fins analíticos e de controle ambiental, pois oferecem baixa corrente de fundo, baixo ruído e baixo custo. Dentre os mais utilizados, destacam-se os biossensores voltados para a detecção de compostos organofosforados (PAULO *et al.*, 2017).

Os biossensores baseados em enzimas estão em contato com os transdutores (equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico quantificável e processável), onde muitas pesquisas centraram-se no desenvolvimento destes para a detecção dos seus substratos. A detecção de compostos com biossensores baseados na inibição enzimática é recente e vem tendo um crescente avanço. Estes biossensores são ferramentas confiáveis para a detecção de uma grande quantidade de compostos tóxicos (WANG; LU; CHEN, 2014; AMINE *et al.*, 2016).

Para Silva (2011) a vantagem do uso de enzimas é que são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. A maior desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentarem uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional. Isso pode ser contornada usando as condições adequadas de pH, temperatura e força iônica, de forma a garantir a manutenção da atividade enzimática.

Na construção de biossensores enzimáticos, a imobilização da enzima é uma etapa muito importante na concepção do biossensor e é a chave para a sua especificidade e desempenho global (SUN, X.; GONG, Z.; CAO, Y.; WANG, X. 2013). Como a boa operacionalidade, a estabilidade de armazenamento, a alta sensibilidade e seletividade, o curto tempo de resposta e a alta reprodutividade (SASSOLAS, A.; BLUM, L.; LECA-BOUVIER, B.2012).

3.3.1 Enzima acetilcolinesterase (AChE)

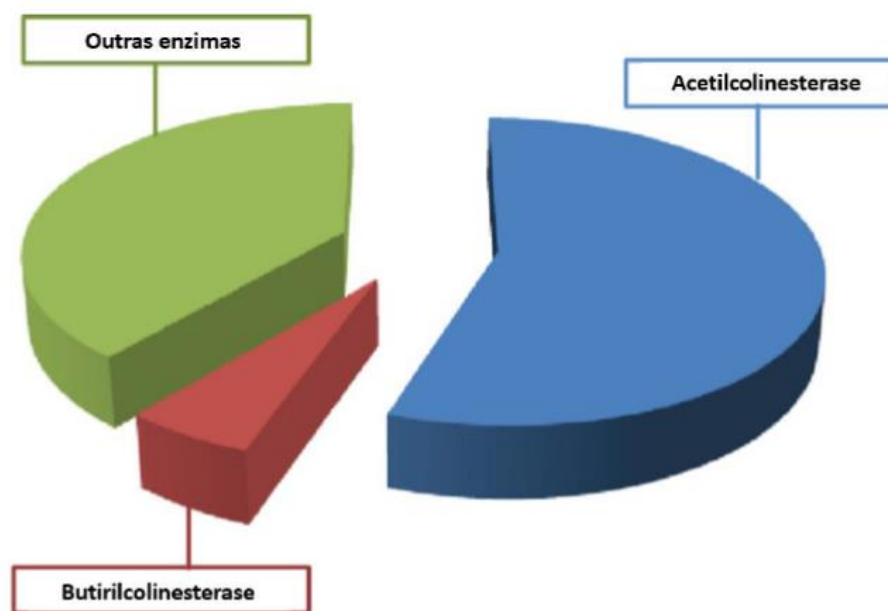
A AChE (figura 4) é frequentemente descrita como uma enzima perfeita porque suas propriedades catalíticas se conjugam para aproximar sua atividade do limite máximo de velocidade permitido pela própria difusão do substrato no meio circundante (TÕUGU, 2001; SILMAN E SUSSMAN, 2005). Uma molécula de acetilcolinesterase é capaz de degradar 300 mil moléculas de acetilcolina por minuto (SILVA, 2014).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas (ARAÚJO *et al.*, 2016).

A inibição deste mecanismo ocorre devido aos efeitos da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos, bem como a íons metálicos. A atividade da acetilcolinesterase de várias espécies de peixes tem sido utilizada como biomarcador em programas de monitoramento de recursos hídricos por ser um método diagnóstico informativo e efetivo, além de economicamente viável, visto que esta enzima está localizada e disponível de forma abundante num tecido descartado do peixe, o cérebro (ARAÚJO, 2015).

Entre as enzimas utilizadas para a construção de biossensores dedicado à análise de pesticidas, a enzima acetilcolinesterase (AChE) é a mais comumente utilizada (NUNES *et al.*, 2014). Devido as diversas aplicações, houve um grande aumento no número de publicações desde a década de 1990 até 2014 com tema de biossensores à base de inibição enzimática, no qual a maior parcela do design destes biossensores são de ChE (Figura 5) (AMIDE *et al.*, 2016).

Figura 4. Distribuição de enzimas utilizadas para construção de biossensores baseados em inibição.



FONTE: AMINE *et al.* (2016).

Biossensores eletroquímicos baseados na inibição da AChE têm mostrado resultados satisfatórios para análise de pesticidas, onde a atividade da enzima tem sido utilizada como um indicador de medição quantitativa de inseticidas (WANG *et al.*, 2011; LIU e LIN, 2006; MULCHANDANI, MULCHANDANI e KANEVA, 1998).

3. 4 O Peixe-Pedra

A costa Norte do Brasil, que compreende os estados do Amapá, Pará e Maranhão, é caracterizada por ser uma região muito produtiva do ponto de vista pesqueiro. Dentre os recursos capturados, encontra-se a espécie *Genyatremus luteus* (peixe-pedra) (FERNANDES *et al.*, 2015).

Para Marques (2016) a espécie *Genyatremus luteus* (Figura 6) ganha destaque entre os peixes de relevante potencial econômico, um teleósteo que pertence à ordem dos perciformes, sendo popularmente conhecido como peixe-pedra ou roncador. Este gênero monoespecífico pertence à família Haemulidae, que é caracterizada por peixes de águas marginais rasas e em sua maioria tropicais e subtropicais. Sua distribuição abrange desde abaixo das Antilhas passando pela costa norte da América do Sul, sendo encontrada na plataforma continental da Guiana Francesa entre 25 a 30 metros de profundidade e às vezes,

em águas marinhas do Atlântico Ocidental, mais precisamente entre a Colômbia e o Brasil, sob profundidade de até 40 metros.

Figura 5. Peixe *Genyatremus luteus*



FONTE: MELO (2012).

(CERVIGÓN 1966; ARTIGAS *et al.*, 2003; GIARRIZZO & KRUMME 2007) classificaram o peixe-pedra como uma espécie estuarino-marinha, com preferência por águas costeiras, especialmente estuários e lagunas, sobre fundos de lama, areia e pedras. Nas pescas artesanais realizadas na Baía de São José destacam-se várias espécies de importância econômica. A espécie *Genyatremus luteus*, vulgarmente conhecida como peixe-pedra, sobressai-se devido a sua grande abundância e apreciação pela população da cidade de São José de Ribamar, onde ocupa as primeiras posições no “ranking” do consumo diário de pescado (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Sua produção em 2007 foi de 446,5 no levantamento estatístico do IBAMA, oriunda da pesca artesanal (99,22%) e industrial (0,78%), gerando receita de aproximadamente R\$ 1.084.995,00. Dados registrados no último levantamento do assinalam que o Maranhão é o principal estado brasileiro onde *G. luteus* é intensamente capturado para consumo, com receita estimada de R\$ 7 milhões gerados exclusivamente pela pesca artesanal, sendo a 5^o espécie de maior rendimento para o estado (IBAMA, 2009).

Para Noletto – Filho (2012) deve-se buscar sempre que possível, a utilização de espécies da fauna local nas ações de desenvolvimento da tecnologia, aproximando-se dos princípios da sustentabilidade.

4. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 8, n. 6, p.1818-1834, nov. 2016.

ASSIS, C. R. D. **Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcadores in vitro da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos**. 2011. 198 f. tese (doutorado). – Curso de Pós graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

AHUJA, S. *Comprehensive Water Quality and Purification*. V. 1. EUA: **Elsevier**, 2014.

ALMEIDA, M.D. *et al.* **A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei no 3.200/2015**. Brasília: Caderno de Saúde Pública, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v33n7/1678-4464-csp-33-07-e00181016.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

AMINE, A. *et al.* Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 180-194, 2016.

ALMEIDA, Z. S.; NUNES, J. L. S.; ALVES, M. G. F. S. Feeding diet of *Genyatremus luteus* (Bloch, 1790) - (teleostei, perciformes: Haemulidae) from São José Bay, Maranhão, Brazil. **Atlântica, Rio Grande**, Rio Grande, v. 27, n. 1, p.39-47, 2005.

ALMEIDA, Z. S. *et al.* DIETA ALIMENTAR DE *Genyatremus luteus* (BLOCH, 1790) - (TELEOSTEI, PERCIFORMES: HAEMULIDAE) NA BAÍA DE SÃO JOSÉ, MARANHÃO, BRASIL. **Atlântica, Rio Grande**, Rio Grande, v. 27, n. 1, p.39-47, out. 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, UFPR. Universidade Federal do Paraná. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.R.J.; ROSSI JUNIOR, O.D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S.; Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**. v. 37, no 4, p.510-514, 2003.

AMINE, A.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; Recent advances in biosensors baseado n enzyme inhibition. **Biosensors and bioelectronics**. V73, p. 180-194, 2016.

ARAÚJO, M. C. **Caracterização da acetilcolinesterase cerebral do ciclídio jaguar (*Parachromis managuensis*) e seu potencial como biomarcador de pesticidas e íons metálicos**. 2015. 70 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

CARLOS, E. A.; NEVES, A. A.; REIS, C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determinação simultânea de trihalometanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 34, p. 272-278, 2011.

CERVIGÓN, F. 1966. Los peces marinos de Venezuela. Caracas, **Fondo de Cultura Científica**. 951p.

CHIARELLO, M.; GRAEFF, R. N.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHEIDERB, V. E.; MOURA, S. Determinação de Agrotóxicos na Água e Sedimentos por HPLC-HRMS e sua Relação com o uso e Ocupação do Solo. **Química Nova**, V. 40, 158-165, 2017.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CAMARGO, J. P. C. **Preparação e caracterização de biossensores baseado na eletrodeposição de grafeno/polipirrol/acetilcolinesterase para determinação de pesticidas em amostras de frutas e vegetais**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2017.

DONDOI, M. P. Organophosphorus insecticides extraction and heterogeneous oxidation on column for analysis with an acetylcholinesterase (AChE) biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v.578, p. 162-169, 2006.

DIAS, L. C P; PIMENTA, F. M.; SANTOS, A. B. Patterns of land use, extensification, and intensification of Brazilian agriculture. **Global Change Biology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p.2887-2903, ago. 2016.

ENSP. **Artigos científicos debatem o uso de agrotóxicos e os riscos ao ambiente e à saúde humana**. 2017. Disponível em: <<http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/42366>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

FERREIRA, P. V. N.; RUIZ, M. V. S.; AGUIAR, C. M. A. Influência do uso e ocupação do solo na qualidade ambiental do Córrego Lagoinha, em Uberlândia (MG). **Periódico Eletrônico "fórum Ambiental da Alta Paulista"**, Tupã, v. 13, n. 1, p.25-36, fev. 2017.

FERNANDES, G. L. SOBRE A ALIMENTAÇÃO DO PEIXE PEDRA, *Genyatremus luteus* (Bloch, 1795) JORDAN & FESLER 1893 (*TELEOSTEI, POMADASYIDAE*). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, São Luís, v. 4, n. 1, p.65-76, jan. 1981.

FOURNIER, D. E.; MUTERO, A.; Comp. Biochem. Physiol., Part C: **Toxicol. Pharmacol.** 1994, 108, 19.

FERNANDES, S. C. P.; VARIAÇÃO TEMPORAL DA CAPTURA COMERCIAL DO PEIXE PEDRA, *Genyatremus luteus*, DESEMBARCADO EM UM PÓLO PESQUEIRO DA COSTA NORTE DO BRASIL – PENÍNSULA DE AJURUTEUA – BRAGANÇA - PA. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.173-182, fev. 2015.

IBAMA. **Autorizações e Licenças para Fins Científicos e Didáticos–SISBIO**. Disponível em <http://servicos.ibama.gov.br/cogeq/index.php?id_menu=106>.2009.

INPEV - Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias. Disponível em: <<http://www.inpev.org.br/>>. Acesso em: 10 Set. 2017.

KONSTANTINO, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 03, p. 555-570, 2006.

PAULO, I. G. P.; LINHARES, N. E. G.; ESPÓSITO, T. S.; NUNES, G. S.; SOUTO, L. A. **S. Biossensor para Detecção de Metais Pesados e Ferro**, Depósito de patente N. 54, de 31/08/2017. 2017.

LEITE, C. M. **Desenvolvimento de biossensores amperométricos à base de enzimas acetilcolinesterase geneticamente modificadas contendo uma macroalga estuarina para a detecção do inseticida paration metílico**. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

MARTINEZ, M. T. **Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe de carbamatos**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MENDONÇA, C. D.; VERBINNEN, R.T.; MARQUES, P. B.O.; NUNES, G.S. Construção de biossensores amperométricos à base da enzima acetilcolinesterase contendo macroalga de ambiente estuarino para a detecção do agente anticolinesterase paration metílico. **Caderno de pesquisa**, v. 19, p.128-137, 2012.

MULCHANDANI, A.; MULCHANDANI, P.; KANEVA, I.; CHEN, W. **Anal. Chem.**, v. 70, p. 4140–4145; 1998.

MARQUES, N. E. F. et al. INDUÇÃO HORMONAL À DESOVA DO PEIXE PEDRA *Genyatremus luteus* (BLOCH, 1790) (TELEOSTEI: HAEMULIDAE). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, São Luís, v. 26, n. 1, p.32-35, jan. 2016.

NOLETO-FILHO, E. M.; YAURI W. L M.; SANTOS, R. L. Broodstocks catch and acclimation to close system of “peixe-pedra” *Genyatremus luteus* (Block, 1797) (Pisces: *Haemulidae*). **Boletim do Laboratório de hidrobiologia**, São Luís, p.55-60, jan. 2012.

NUNES, G. S.; LINS, J.A.P.; SILVA, F.G.S.; ARAUJO, L.C.; SILVA, F.E.P.S.; MENDONÇA, C.D.; BADEA, M.; HAYAT, A.; MARTY, J.-L. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. **Chemosphere**. v. 111, p. 623–630, 2014.

NAKAGAWA, L. E. *et al.* Persistence of chlorpyrifos in greenhouse air. **Toxicology / Scientific Communication**, São Paulo, v. 83, n. 0, p.1-4, 2016

RIBEIRO, A. L. C. **Implementação e validação de metodologia para determinação simultânea de glifosato e ampa (ácido aminometilfosfônico) em águas naturais**. 2011.f 93. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos Para Saúde - Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2011.

SINHA, R.; GANESAMA, M.; ANDREESCU, S.; STANCIU, L. AChE biosensor based on zinc oxide sol-gel for detection of pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 195-199, 2010.

SILVA, A. J. C. **Currais Novos-RN e a problemática hídrica sob a ótica educacional como fator transformador dessa realidade**. 2017. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Geografia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Caicó, 2017.

SPADOTTO, C. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar - FMR**, São Manuel, 9p., 2006.

SILMAN, I.; SUSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 5, P. 293-302, 2005.

SES/MA – Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão. **Plano Integrado de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/02/Plano-MA.pdf>>

SHAMAGSUMOVA, R. V.; SHURPIK, D. N.; PADNYA, D. L.; STOIKOV, I. L.; EVETUGYN, G. A. Acetylcholinesterase biosensor for measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar[5]arene. **Talanta**. 2015, 144, 559.

SEGALL, Y.; CASIDA, J. E; Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. 1983, 18, 209.

SUN, X.; GONG, Z.; CAO, Y.; WANG, X. Acetylcholinesterase Biosensor Based on Poly (diallyldimethylammonium chloride)-multi-walled Carbon Nanotubes-graphene Hybrid Film. *Nano-Micro Letter* 5, 47-56. 2013.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.; LECA-BOUVIER, B. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 489-511. 2012.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents*, 1, p. 155-170, 2001.

VASCO A. N. Qualidade da água que entra no estuário do rio Vaza Barris pelo principal fluxo de contribuição de água doce. *Scientia Plena*, v. 6, 2011.

ZINI, L. B. **Contaminação de agrotóxicos na água para consumo humano no rs: avaliação de riscos, desenvolvimento e validação de método empregando spe e lc-ms/ms.** 2016. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: World Health Organization; 1990.

WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 2, p. 25-32, 2014.

WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite. *Analytica Chimica Acta*, v.695, p. 84–88, 2011.

WEI, M; WANG, J. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, 211, 190-196.

**Artigo: Biossensor Enzimático para Detecção de Pesticidas Utilizando
Extrato do Cérebro de Peixe Pedra (*Genyatremus luteus*)**

A ser submetido ao periódico Química Nova

BIOSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO EXTRATO DO CÉREBRO DE PEIXE PEDRA (GENYATREMUS LUTEUS)

Allysson K. de C. Silva^a, Talita da S. Espósito^b, Marllon L. B. da Silva^c, Gilvanda S. Nunes^c, Fernanda J. O. Lindoso^a

^aDepartamento de Biologia - DEBIO, Universidade Federal do Maranhão, 65065-545 São Luís – MA, Brasil

^bDepartamento de Oceanografia e Limnologia - DEOLI, Universidade Federal do Maranhão, 65065-545 São Luís – MA, Brasil

^cDepartamento de Tecnologia Química - DETQI, Universidade Federal do Maranhão, 65065-545 São Luís – MA, Brasil

ENZYMATIC BIOSENSOR FOR PESTICIDES DETECTION USING EXTRACT OF THE BRAIN OF PEIXE PEDRA (GENYATREMUS LUTEUS)

The stonefish (*Genyatremus luteus*) lies to the western Atlantic, from the South of the Caribbean to Brazil. It is an important fishing resource of the states of Maranhão and Pará, this species stands out in the artisanal fisheries carried out in the Maranhão coast, highlighting among several species of economic importance due to its great abundance and appreciation. The high consumption consequently generates waste. One of the byproducts of the processing of this species was used to construct a biosensor for the detection of pesticides, especially organophosphates, using the enzymatic inhibition of acetylcholinesterase found in crude fish-stone brain (ECPP) extract. The characterization of ECPP was performed, temperature and optimum pH, kinetic studies with different concentrations of the substrate. For construction of the biosensor, ECPP was added to a graphite carbon paste with the tetracyanidinedimethane mediator (TCNQ) and Meldola's Blue. After the sensors were prepared, started the electrochemical characterization of the immobilized sensor-enzyme system, the results were recorded. The construction of this biosensor comes in place of acetylcholinesterase of Electric Eel commercialized by Sigma, high price and not produced in Brazil, making it a cheaper alternative for the development of enzymatic biosensors.

Keywords: *Enzyme. Acetylcholinesterase. Organophosphate pesticides. Haemuldade.*

INTRODUÇÃO

Os pesticidas organofosforados são compostos muito eficazes na erradicação de pragas e no controle de endemias, no entanto, são agentes extremamente tóxicos responsáveis por inúmeros casos de intoxicações humanas relatados anualmente⁵. No Brasil, o Ministério da Saúde estima que, por ano, existam mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos, com cerca de 4 mil mortes. Dentro deste cenário, os organofosforados são responsáveis pelo maior número de intoxicações agudas e mortes⁴.

Os organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs) representam importante classe de compostos tóxicos, os seus resíduos podem ser carregados para as águas superficiais por escoamento e para as águas subterrâneas por lixiviação^{18, 25}.

Sua toxicidade é baseada na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), responsável pelos impulsos nervosos. A inibição da acetilcolinesterase é irreversível; desta forma, a acetilcolina é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo um acúmulo da mesma onde é normalmente liberada, resultando, toda a sintomatologia da intoxicação por acetilcolina ocasionada por compostos organofosforados^{2,5}.

Com isso, técnicas de detecção de agrotóxicos em água, mais sensíveis e seletivas, passaram a ser desenvolvidas, no intuito de atender à demanda premente de monitoramento desses resíduos em amostras de águas superficiais e de consumo humano⁶.

Os biossensores podem ser definidos como sensores químicos cujo reconhecedor é um componente biológico ativo, o que significa que um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico. Assim, uma das características dos biossensores, é a sua alta seletividade com relação a um determinado analito^{10,8}. Os biossensores têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à sua capacidade de portabilidade, miniaturização e rapidez de resposta¹³.

Nas últimas décadas, as enzimas têm sido exploradas também na construção de biossensores altamente seletivos para determinados tipos de analitos, incluindo os poluentes ambientais²⁶. Entre as enzimas utilizadas para a construção de biossensores dedicado à análise de contaminantes ambientais, a enzima acetilcolinesterase (AChE) é a mais comumente utilizada¹⁸.

As acetilcolinesterases de organismos aquáticos são bastante utilizadas como biomarcadores e as razões de sua utilização se ligam ao fato de poluentes de diversas fontes chegarem aos recursos hídricos e também à sua alta posição nas cadeias alimentares o que aumenta detecção de anticolinesterásicos bioacumuláveis. Os critérios de escolha das

espécies se dão através de características como habitat, ecologia, hábitos alimentares, abundancia e facilidade de captura².

Inserido na família Haemulidae encontra-se o peixe-pedra, ou roncador, *Genyatremus luteus*. A ocorrência restringe-se ao Atlântico ocidental, desde o Sul do Caribe ao Brasil⁷, sendo a única espécie do gênero *Genyatremus* encontrada (ou registrada) no Brasil²⁸.

O objetivo deste trabalho foi o aproveitamento do cérebro de peixe-pedra para preparação do extrato bruto como fonte de acetilcolinesterase para desenvolvimento de um biossensor enzimático amperométrico de baixo custo com potencial uso na detecção de pesticidas organofosforados em matrizes ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Soluções

Para obtenção do extrato líquido bruto dos cérebros rico em AChE, os cérebros foram preparados por homogeneização em tampão tris-HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH = 8,0, sendo armazenados em microtubos e em temperatura aproximada de 4°C, em freezer. A solução tampão tris-HCl (pH 8,0) foi preparada pela combinação da solução aquosa de tris e solução aquosa de HCl 1,0 mol.L⁻¹.

As soluções de tampão fosfato (PBS) 0,1 mol.L⁻¹, pH 6,1 a 8,0, foram preparadas pela combinação de KH₂PO₄ 0,1 mol.L⁻¹ e NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Para a determinação do pH ótimo foram preparadas soluções tampões citrato HCl (0,1 mol.L⁻¹) com pH nas faixas de 3,0 a 4,5 e citrato fosfato (0,1 mol.L⁻¹) com pH nas faixas de 4,0 a 6,5.

Foram preparadas as soluções de 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzólico) (DTNB) 2,5 x 10⁻³ mol.L⁻¹ e do substrato iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) 1 mol.L⁻¹ para determinação da atividade enzimática.

Na etapa de imobilização enzimática, os reagentes utilizados foram: solução de glutaraldeído a 5% (m/v), hidroxietilcelulose (HEC) a 3% (m/v) e o reagente soro albumina bovina (BSA). Para comparação da atividade enzimática foi utilizada a enzima acetilcolinesterase extraída de enguia elétrica AChE (EE), todos adquiridos pela Sigma/Aldrich.

Métodos

Preparação do Extrato bruto dos cérebros de peixe – pedra (ECPP)

Os peixes foram adquiridos junto a pescadores no município de São José de Ribamar (Maranhão, Brasil), região metropolitana de São Luís. Foram realizadas 2 coletas, nos meses de novembro de 2016 (Coleta 1) e janeiro de 2017 (Coleta 2), cada uma com 12 exemplares. Para preparação do extrato bruto (ECPP), os cérebros de peixe-pedra (*Genyatremus luteus*) foram removidos.

Estes foram pesados (1,27g na coleta 1 e 1,50g na coleta 2) separadamente, foram homogenizados com a solução tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0, 10m.L⁻¹) no agitador mecânico IKA RW 20 Digital em rotação de 10 rpm . Após a homogenização, o extrato foi centrifugado a 10.000 xg por 25 minutos a 4°C para a remoção de partículas insolúveis, o sobrenadante foi denominado de Extrato Bruto (ECPP) e estocado a 4°C.

Determinação, comparação da atividade enzimática e concentração de proteínas

Após a etapa de obtenção dos ECPP rico em enzima AChE, a concentração de proteínas foi estimada pelo método de Warburg e Christian²⁹ utilizando a seguinte fórmula: $[concentração\ de\ Proteína]\ mg/mL = A_{280nm} \times 1,55 - A_{280nm} \times 0,75$, em espectrofotômetro NanoDrop ND – 2000C nas absorvâncias de 260 nm e 280 nm.

A atividade enzimática da AChE encontrada do ECPP e atividade da AChE (EE) foram verificados espectrofotometricamente, empregando a metodologia de Ellman modificada por Nunes¹⁹. Para um volume final de 800 µL, foi utilizado 50µL AChE do ECPP, 350 µL de solução tampão (PBS) 0,1 mol.L⁻¹, 200 µL de solução de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) 2,5 mmol.L⁻¹ e 200 µL de DTNB 2,5 x 10⁻³ mol.L⁻¹. A formação do produto foi medida no comprimento de onda de 412 nm, após 60s.

Após a medida espectrométrica, a absorvância foi calculada segundo a equação: $Abs_{412} = Abs_e - Abs_b$ Onde: Abs_{412} : diferença entre as médias das absorvâncias da enzima (Abs_e) e do branco (Abs_b), medidas a um comprimento de onda de 412 nm em um espectrofotômetro UV/Vis (Orion AquaMate 8000, NARP/UFMA).

Posteriormente, foi calculado a concentração da enzima expressa em mmol.L⁻¹ pela equação de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ sendo, A = diferença entre as médias das absorvâncias da enzima e do branco; ϵ = absorbitividade molar (mmol⁻¹.cm⁻¹.L); b =

comprimento do caminho da amostra (cm); c = concentração do elemento que absorve, na solução (mmol.L^{-1}).

Parâmetros Físico-químicos do ECPP

Parâmetros Cinéticos do ECPP

Os ensaios para os parâmetros cinéticos foram realizados através da metodologia de Ellman modificado para microplaca por Assis², onde o substrato utilizado para realização do ensaio cinético o Iodeto de Acetilcolina (concentração final de 0 a 20 mM). A solução foi feita na mistura de 200 μL de DTNB, 50 μL de ECPP rico em AChE e 50 μL do substrato AcSCh nas diferentes concentrações, para preparação do branco foi feita a substituição do ECPP pelo tampão (PBS) 0,1M pH 7,2. O ensaio foi realizado em triplicata em placa de 96 poços e lida na leitora de microplaca TP-READER em 405nm.

Os resultados de atividade (U/s) obtidos para cada concentração de substrato foram plotados num gráfico e os parâmetros assintóticos da cinética de Michaelis-Menten (V_{max} e K_m), foram calculados empregando o programa MicrocalTM OriginTM versão 6.0 (Software, Inc, EUA), a constante catalítica da taxa enzimática (K_m) foi calculada através da divisão do valor de V_{max} pela concentração final de enzima na reação (Mm).

pH Ótimo

Foram testados gradientes de pH e temperatura do ECPP em condições descrita por Ellman⁸ com adaptações do tampão fosfato de Rodriguez²¹ com variações de pH 6,5; 6,9; 7,2; 7,5 e 8,0 das soluções tampão (PBS) 0,1M, citrato – HCl 0,1M e citrato fosfato 0,1M, os testes foram feitos em triplicata em uma leitora de microplacas de 96 poços em 405nm.

Para os ensaios de determinação de pH ótimo, foram adicionados 200 μL do DTNB (0,25mM), tampão (PBS) em diferentes faixas de pH, 20 μL do ECPP e 20 μL de AcSCh (0,25mM), para preparação do branco foi adicionado tampão (PBS) 0,1M de diferentes pH em substituição ao extrato. A degradação da acetilcolina foi verificada após o final de 3 minutos e foi feita a leitura a 405nm na leitora de microplaca TP-READER.

Temperatura Ótima

Para determinação da temperatura ótima, a solução contendo 20 μ L tampão (PBS) 0,1M com pH 7,2, 200 μ L DTNB (0,25mM) foi mantido durante 10 minutos em temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C, logo após foi adicionado 20 μ L ECPP rico em AChE e 20 μ L AcSCh (0,25mM) para a formação do produto. Em seguida, foi feito a leitura no espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 poços após 3 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o ECPP em temperatura ambiente (25°C) e temperatura de 10 °C por 10 minutos para determinação da estabilidade térmica.

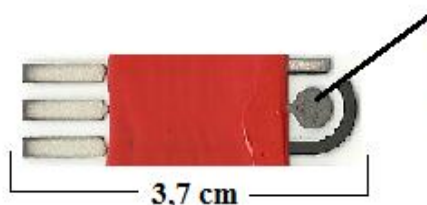
Preparo dos Biossensores

Imobilização enzimática do ECPP

O processo de imobilização da enzima foi feito por ligação cruzada com o glutaraldeído. Foram feitas duas pastas (com a presença de BSA e sem BSA) utilizando 100 mg de carbono grafite, 100 μ L da solução de HEC, 60 μ L de glutaraldeído, 10 μ L de BSA e por último 90 μ L solução ECPP rico em AChE seguida de homogenização.

Preparação dos biossensores eletroquímicos

O processo de preparo dos biossensores ocorreu com a adição de 40 μ L da pasta enzimática contendo o ECPP rico em AChE na região de trabalho dos sensores serigrafados (Figura 1), um sensor contendo o mediador tetracianoquinodimetano (TCNQ) e outro sensor com mediador Meldola's Blue no eletrodo para verificar as melhores condições trabalho e levado para armazenamento sob refrigeração (4°C) por 24 horas.



Aplicação da pasta enzimática contendo ECPP rico em AChE na região do trabalho.

Fonte: Mendonça¹⁵ (adaptado)

Figura 1. Sensor serigrafado para o desenvolvimento do biossensor enzimático contendo ECPP rico em AChE.

Caracterização Eletroquímica e Otimização dos Parâmetros Operacionais do Biossensor

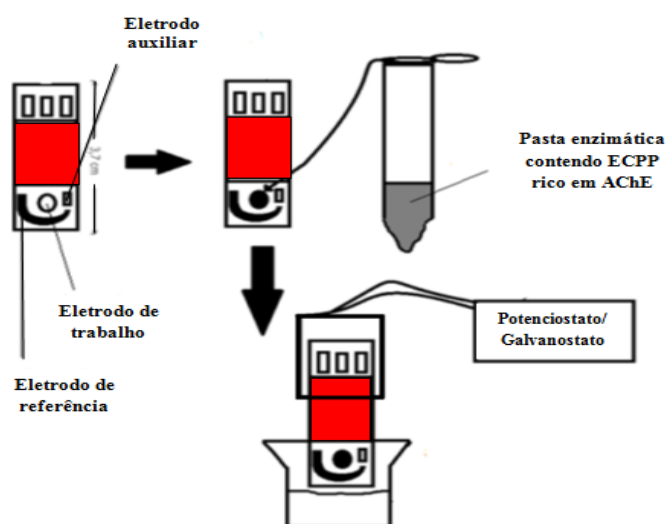
Após o preparo dos biossensores, foi iniciada a caracterização eletroquímica. Foram realizados testes utilizando voltametria de pulso diferencial com ECPP livre e imobilizada no biossensor para avaliar o seu potencial de trabalho para escolha do melhor mediador eletroquímico, as medidas foram efetuadas em um potenciostato (Micro-AUTOLAB Tipo III, Methrom NARP/UFMA). Foram realizados testes com os mediadores tetracianoquinodimetano (TCNQ) e Meldola's Blue com o objetivo de verificar quais desses mediadores geravam o potencial de trabalho mais baixo.

O biossensor foi colocado em conector apropriado que torna possível a comunicação entre o potenciostato (detector) e o sensor. Em seguida, imergiu-se o biossensor em soluções de tampão (PBS) em diferente pH entre a faixa de 6,1 a 8,0 em um béquer de 5mL para avaliação da atividade enzimática do ECPP. Assim, analisando quais desses valores de pH a corrente apresenta mais estabilidade.

Testes de inibição dos biossensores contendo ECPP

Inicialmente, foi registrado o sinal por meio de medida cronoamperométrica do sensor imerso em solução tampão fosfato e substrato (Figura 2). Após o registro do sinal, o biossensor foi lavado e colocado em incubação por 10 minutos em solução tampão (PBS) 0,1M juntamente com o substrato. O tempo de 10 minutos de incubação foi empregado em outros trabalhos como tempo ideal para ocorrer o processo de inibição da enzima AChE¹⁵.

Após 10 minutos de incubação, o eletrodo foi lavado novamente e medido o sinal da atividade enzimática com o substrato. A percentagem de inibição foi definida pelo decréscimo da corrente, utilizando a equação: $IR (\%) = [1 - (I / I_0)] \times 100$, 25 onde IR = inibição relativa; I_0 = intensidade de corrente antes da inibição enzimática; I = intensidade de corrente após inibição enzimática.



Fonte: Souto²⁶ (adaptado)

Figura 2. Preparação dos biossensores para os ensaios operacionais com adição da pasta enzimática contendo ECPP nos sensores com mediadores TCNQ e Meldola's Blue em solução tampão (PBS) 1,0 mol.L⁻¹, pH 7,2 e substrato iodeto de acetilcolina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação e Comparação da Atividade enzimática do ECPP e Enzima Comercial

Através de técnicas simples e de baixo custo de extração de enzimas, o ECPP apresentou atividade enzimática maior em comparação com a enzima comercial purificada AChE (EE) (Tabela 1).

Enzima	Atividade (U/mmol)
ECPP	0,004628 ± 0,04
AChE (EE)	0,003482 ± 0,02

Os valores são expressos como média ± desvio padrão dos ensaios em triplicata individuais

Tabela 1. Atividade enzimática do ECPP rico em AChE e AChE de enguia elétrica Sigma®

De acordo com Nogueira²⁰, diversas pesquisas demonstram que tem aumentado o interesse da aplicação de extratos enzimáticos brutos no lugar de enzimas purificadas para aplicação em biossensores para determinação de vários analitos. Desta forma, essa maior

atividade do ECPP rico em AChE qualifica esse homogenato para seu potencial uso no desenvolvimento de biossensores.

Parâmetros Físico-químicos do ECPP

pH e Temperatura ótima

O pH ótimo encontrado para o ECPP rico em AChE foi de 7,2 (Figura 3), este resultado é próximo ao descrito na literatura por Assis² para o extrato de cérebro de *Colossoma macropomum* e por Bocquené⁴ para de cérebro de *Solea solea* que apresentaram atividade ótima na faixa de pH de 7,0 a 7,5, respectivamente.

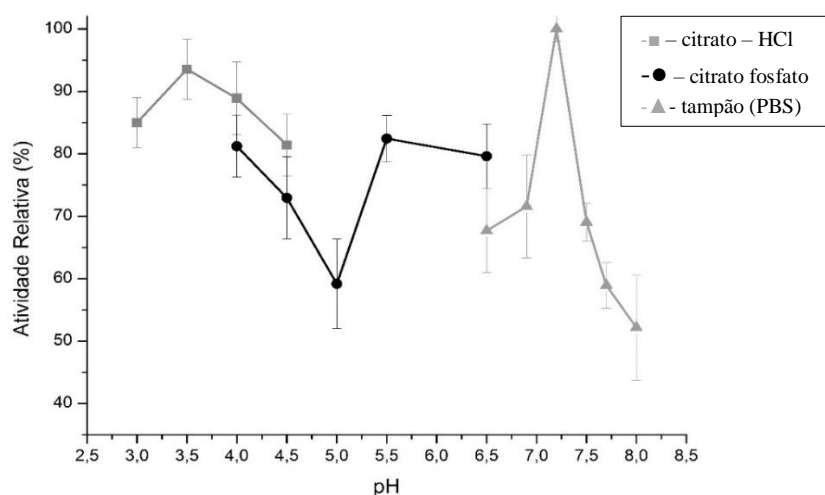


Figura 3. Efeitos de diferentes pH sobre atividade enzimática do ECPP

Já a temperatura ótima do ECPP foi de 25°C. Diferente de outros peixes que obtiveram temperatura maior como por exemplo Assis² que obteve temperatura ótima de 45°C para extrato de cérebro de juvenis *C. macropomum* e Bocquené⁴ para extrato de cérebro de *Pleuronectes platessa* que obteve temperatura ótima de 33°C. Possivelmente esta diferença de temperatura ótima esteja ligado a questão de habitat e evolutiva, devido a evolução em ambientes mais quentes. Por esse motivo, atividade de AChE dos peixes *Pleuronectes platessa* e *C. macropomum* tem maior temperatura ótima em comparação com ECPP.

Parâmetros Cinéticos do ECPP

O K_m do ECPP rico em AChE foi de 0,159. A tabela 2 traz uma comparação dos resultados deste trabalho com outros estudos que avaliaram a atividade da AChE em diferentes órgãos.

Espécies	K_m (Mm)	pH ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Tecido
<i>G. luteus</i> *	0,159	7,2	25	Cérebro
<i>C. macropomum</i> ¹	0,430	7,5	45	Cérebro
<i>P. vetulus</i> ²¹	1,690	-	-	Músculo
<i>P. verticalis</i> ²¹	0,300	-	-	Músculo
<i>C. ocellaris</i> ²²	0,769	8,0	45	Cérebro

- não determinado

*Presente trabalho

Tabela 2. Comparação de k_m , pH ótimo e temperatura ótima de AChE de outros peixes em diferentes órgãos com o ECPP rico em AChE.

O valor da constante de Michaelis (K_m), que é o indicador da afinidade da enzima pelo substrato encontrado no ECPP rico em AChE, foi mais baixo que aqueles encontrados em *Colossoma macropomum* por Assis² e por Rodríguez²¹ para *Pleuronectes vetulus*, mostrando maior afinidade pelo substrato AcSch. Por este motivo, o ECPP torna-se ‘uma alternativa de baixo custo para substituição da enzima comercial de elevado preço para aplicação em biossensores enzimáticos.

Otimização do Biossensor

Imobilização Enzimática do ECPP

Os sinais eletroquímicos não foram satisfatórios quando a pasta para imobilização do ECPP continha BSA (Figura 4.A). Provavelmente, essa proteína influenciou na obtenção da resposta pelo biossensor no processo redox do substrato causando interferência eletroquímica na corrente durante o processo de inibição da AChE encontrada no ECPP.

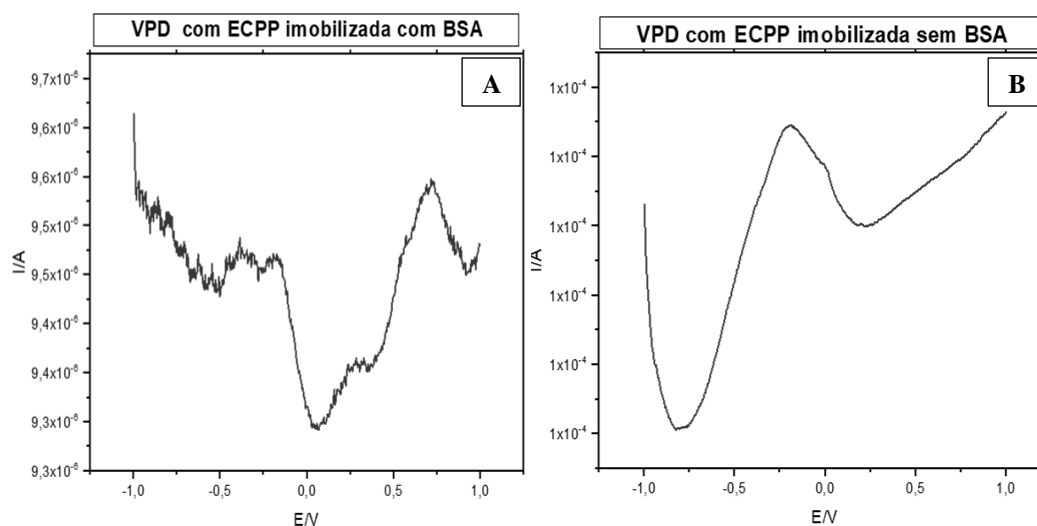


Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial (E/V) potencial e (I/A) corrente gerados em testes de otimização do biossensor com ECPP imobilizado com BSA (A) e sem a presença de BSA (B) em solução de substrato AcSCh e tampão (PBS) ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$).

Para Margarido¹⁶ o uso de BSA apesar de aumentar a rigorosidade da superfície da pasta na superfície na área de trabalho do sensor pode influenciar na sensibilidade de detecção do analito. Por este motivo, soro de albumina bovina (BSA) foi retirado do processo de preparação da pasta de carbono para imobilização enzimática baixando mais o custo de produção do biossensor com reagentes e melhorando nos sinais eletroquímicos (Figura 3.B).

Escolha do Mediador Eletroquímico

Os resultados dos testes de caracterização eletroquímica mostraram que o mediador mais adequado para o biossensor contendo o ECPP foi o TCNQ em tampão (PBS) 1,0M pH 7,2, pois foi possível realizar medidas de correntes com potencial mais baixo (100 mV) em comparação com o mediador Meldola's Blue (400mV). Para Nunes¹⁸, um mediador com o potencial de trabalho baixo (100mV) é bastante vantajoso, pois impede a oxidação de possíveis espécies interferentes existentes nas amostras no processo anódico.

Medições eletroquímicas

O biossensor enzimático com ECPP mostrou um pico bem definido no potencial de -0,4V empregando o mediador TCNQ em solução tampão (PBS) e substrato AcSCh nos testes de voltamograma de pulso diferencial (Figura 5).

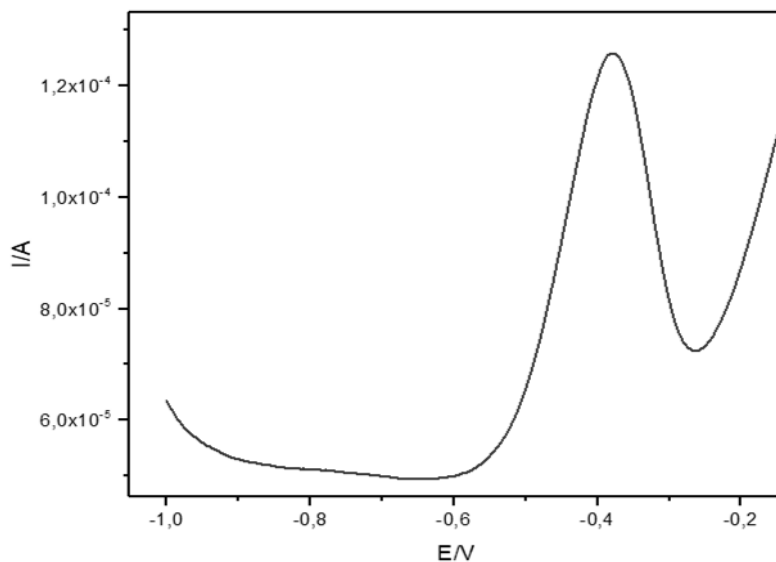


Figura 5. Voltamograma de pulso diferencial (E/V) potencial e (I/A) corrente usando o biossensor em condições operacionais em solução tampão (PBS) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,2, e iodeto de acetilcolina com o mediador TCNQ.

Mendonça¹⁵ desenvolveu biossensores que utilizam AChE (EE), BSA e Macroalga para melhorar a estabilidade da corrente em condições operacionais e diminuir a perda de atividade enzimática (Figura 5). O biossensor contendo ECPP mostrou desempenho semelhante sem a necessidade de reagentes para estabilidade da corrente em condições operacionais. Portanto, o uso de ECPP mostrou sensibilidade, tornando-se uma alternativa interessante para aplicação em biossensores enzimáticos para monitoramento ambiental.

CONCLUSÃO

A utilização de ECPP imobilizada em um sensor serigrafado para construção de um biossensor mostrou bom desempenho em condições operacionais semelhante a outros biossensores já desenvolvidos. Portanto, o ECPP apresenta uma alternativa de substituição da AChE (EE) vendida pela Sigma® como: baixo custo e facilidade na construção, podendo ser uma alternativa para aplicação de resíduos de pescado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFMA, Prof. Dr. Jean Louis Marty por ceder os sensores para o desenvolvimento dos biossensores e a FAPEMA, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, Z. S.; Nunes, J. L. S.; Alves, M. G. F. S. *Atlântica, Rio Grande*, **2005**, 1, 39.
2. Assis, C. R. D.; Castro, F. P.; Amaral, I. P. G.; Carvalho, E. V. M. M.; Carvalho, L. B.; Bezerra, R. S. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2010**, 29, 10.
3. ARAÚJO, M. C. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2015.
4. Bocquene G, Galgani F, Truquet P. *Mar Environ Res*, **1990**, 30, 75.
5. Bedor, C. N. G.; Ramos, L. O.; Pereira, P. J.; Rego, M. A. V.; Pavão, A. C.; Augusto, L. G. S.; *Revista Brasileira de Epidemiologia*, **2009**, 12, 39.
6. Barth, V. G.; Biaazon, A. B.; *Revista Saúde e Biologia*, **2010**, 2, 33.
7. Cervigón, F.; Cipriani, W.F.; Garibaldi, L.; Hendrickx, M.; Lemus, A.J.; Márquez, R.; Poutiers, J.M.; Robaina, G.; Rodriguez, B. FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Roma. **1992**, 513.
8. Dias, I. C. L.; Costa, H. D.; Firmo, W. C. A.; Mendes, H. B. R.; Nunes, G. S. *Revista Geintec*, **2016**, 1, 6.
9. Elluman, G. L.; *Biochemical Pharmacology*, **1961**, 7, 88.
10. Fatibello-Filho, O.; Capelato, M. D. *Quim. Nova*, **1992**, 15, 28.
11. Guiloski, I. C.; *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, **2010**, 461.
12. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F.; *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 1247.
13. Leite, C. M.; *Monografia de conclusão de curso*, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, 2013.
14. Marques, P. R. B. O.; Nunes, G. S.; Santos, T. C. R.; Andreescu, S.; Marty, J. L.; *Biosensors And Bioelectronics* (2004), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.03.021>.
15. Mendonça, C. D.; Verbinnen, R. T.; Marques, P. R. B. O.; Nunes, G. S.; *Caderno de pesquisa*, **2012**, 19, 128.

16. Margarido, F.M.; Araújo- Moreira, L. A.; Colnago, P. S. P.; *Resumo da Ied Simpósio nacional de Instrumentação Agropecuária*, São Carlos, Brasil, 2014.
17. Nunes, G. S. Leite, C. M.; Silva, F. G. S. S.; Marques, P. R. B. *Instituto Nacional de Propriedade Industrial*. **2013**. (BR 102013023225-4 A2).
18. Nunes, G. S.; Lins, J. A. P. ; Silva, F. G. S. ; Araújo, L. C. ; Silva, F. E. P. S. E. ; Mendonça, C. D. ; Badea, M. ; Hayat, A. ; Marty, J. L. *Chemosphere*. **2014**, *111*, 623.
19. Nunes, G. S.; Montesinos, T.; Marques, P. R. B.; Fournier, D.; Marty, J. L.; *Analytica Chimica Acta*, **2001**, *1*, 1.
20. Nogueira, P. R. R. B.; Pereira, M. G; Morais, M. C.; Silva, J. A. D.; Marques, P. R. B. O.; Saraiva, V. B.; Oliveira, M. M. *Revista Transdisciplinar Logos e Veritas*, **2014**, *01*, 33.
21. Rodríguez-Fuentes, G.; Armstrong, J.; Schlen. D. *Ecotoxicol Environ Saf.* **2008**, *69*, 466.
22. Silva, K. C. C. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Recife, Brasil, 2012.
23. Silva, L. M. C. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
24. Silva A. H. C. *Tese de doutorado*, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.
25. Segall, Y.; Casida, J. E; *Relat. Elem.* **1983**, *18*, 209.
26. Souto, L. S.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Maranhão, Brasil, 2016.
27. Tavera, J.J.; Acero Pizarro, A.; Cruzagüero, J.; Balart, E.F. *Journal Zoological Systematics Evolutionary Research*, *49*, **2011**, 315.
28. Wang, j.; Yokokawa, M.; Satake, T.; Suzuki, H.; *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, *220*, 859.
29. Warburg, O.; Christian, *Biochemistry Zoology*, **1941**, *310*, 384.

5.ANEXO

NORMAS DO PERIÓDICO QUÍMICA NOVA

Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser

enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve

ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões]. Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:
Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).
3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte maneira:
Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.
4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:
Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988.* (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3,1999.*

Livros:

com _____ *editor(es):*

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem _____ *editor(es):*

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
 Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido.
 Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.