UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

LÍVIA MARIA DA COSTA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA FENOL E URÉIA COM FOCO NA APLICAÇÃO AMBIENTAL

RIO DE JANEIRO

2011

Lívia Maria da Costa Silva

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA FENOL E URÉIA COM FOCO NA APLICAÇÃO AMBIENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Profª. Drª. Andréa Medeiros Salgado

Profª. Drª. Maria Alice Zarur Coelho

Rio de Janeiro

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, Lívia Maria da Costa.

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental / Lívia Maria da Costa Silva. – 2011.

xxxi, 154 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadoras: Andrea Medeiros Salgado e Maria Alice Zarur Coelho

1. Biossensores eletroquímicos. 2. Uréia. 3. Fenol. 4. Meio ambiente. 5. Eletrodo íon-seletivo a amônio. 6. Eletrodo de oxigênio. 7. Urease. 8. Tirosinase – Teses. I. Salgado, Andrea Medeiros. (Orient.). II. Coelho, Maria Alice Zarur. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 661.82

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Maria da Costa Silva

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA FENOL E URÉIA COM FOCO NA APLICAÇÃO AMBIENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em

_____
(Andrea Medeiros Salgado, D.Sc., EQ/UFRJ)

_____
(Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc., EQ/UFRJ)

_____
(Andréa Camardella de Lima Rizzo, D.Sc., CETEM)

_____
(Denize Dias de Carvalho, D.Sc., EQ/UFRJ)

_____
(Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, D.Sc., EMBRAPA-CE)

_____
(Paulo Rubens Guimaraes Barrocas, D.Sc., ENSP/FIOCRUZ)

_____
(Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc., EQ/UFRJ)

Dedico minha Tese de Doutorado...

Aos meus pais Maria Palmira da Costa Silva e Rubson Pereira da Silva pelo apoio cúmplice e incondicional neste e em todos os projetos em que me envolvo;
Ao meu irmão Jansen da Costa Silva por me ensinar que o mundo é maravilhoso;
Ao meu namorado Gabriel Rodrigues de Souza por fazer de tudo para meu mundo ser maravilhoso, e
A minha querida amiga e orientadora Andrea Medeiros Salgado pelo carinho, confiança, incentivo e ensinamentos científicos desde a Iniciação Científica durante a graduação em Ciências Biológicas.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos, que de uma forma ou de outra estiveram envolvidos nessa tarefa difícil de execução da Tese, é o mínimo que posso fazer para demonstrar minha imensa gratidão e expressar também o quanto precisamos do apoio uns dos outros para desenvolver qualquer tarefa. Reservo este espaço para manifestar meu agradecimento a todos e de forma particular:

A minha falecida vovó Maria de Lourdes Ferreira dos Santos por se constituir estímulo que me impulsiona a buscar vida nova a cada dia;

Aos meus pais, meu irmão e meu namorado pelo impecável apoio e incentivo por minha ascensão profissional e pessoal, principalmente pela inesgotável confiança nas minhas capacidades;

A equipe do Laboratório de Sensores Biológicos, pequeno e aconchegante, pela imensa ajuda e animação, principalmente a amiga Ariana Farias Melo;

As minhas alunas queridas Camila Motta, Juliana Castanheira e Rafaela Flores pela ajuda. Em especial, as duas últimas pelo imenso carinho, atenção e paciência diários;

A minha orientadora, Andrea Medeiros Salgado, por me ajudar a trilhar meu caminho científico desde a Iniciação Científica em 2005, além de ser uma amiga para todas as horas;

A minha orientadora, Maria Alice Zarur Coelho, por me abrigar no antigo Laboratório 113 desde a Iniciação Científica e, posteriormente, deixar o atual Laboratório 103 aberto para mim e minhas alunas. Apoio nunca faltou;

Ao meu grande amigo Marcel Assumpção Leite Silva pelo companheirismo em todos os momentos da minha vida acadêmica desde a graduação em Ciências Biológicas;

As minhas grandes amigas Carolina Campos e Gabrielle Assumpção por estarem presentes em todos os momentos dos últimos anos, incentivando-me e animando-me;

Aos amigos Alan Santos, Rafael Carneiro e Gabriel Meliga pelo carinho e ajuda nas disciplinas da graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e do Meio Ambiente – UFF;

A equipe do Laboratório 103, pela colaboração durante a execução dos ensaios;

Ao engenheiro Roberto Loiola da Silva pela ajuda na reta final da elaboração da Tese;

Aos meus amigos e amigas que possibilitaram essa caminhada com seu apoio, confiança e estímulos generosamente oferecidos. Eles, que muitas vezes me ouviram e me deram uma palavra de ânimo, tanto quando eu alcançava minhas pequenas conquistas, como quando enfrentava algumas dificuldades e adversidades que iam surgindo;

Por fim, durante a realização do curso, muitas pessoas, mesmo que inconscientemente, colaboraram no meu trabalho, seja por meio de informações, seja por meio das reflexões provocadas. Foram tantas que fica impossível citá-las pelos nomes, portanto a todos um *MUITO OBRIGADA* por terem me ajudado na realização da minha pesquisa que, hoje, concede-me a oportunidade de finalizar uma etapa na minha vida acadêmica: a obtenção do título de Doutor em Ciências.

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência."
Goethe

"O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir."
Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Lívia Maria da Costa. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O número crescente de poluentes potencialmente nocivos no meio ambiente tem motivado um aumento na demanda de técnicas analíticas de baixo custo e resposta rápida para serem utilizadas no monitoramento *in situ*. Nesse contexto, os biossensores despontam como uma ferramenta complementar de análise. O presente trabalho pretendeu desenvolver, de forma simples e barata, dois projetos de biossensores eletroquímicos para uréia e fenol visando aplicação em amostras reais ambientais.

O biossensor potenciométrico para uréia utilizou o feijão de porco, *Canavalia ensiformis*, como fonte da urease e, escolheu-se o eletrodo íon-seletivo a amônio como transdutor. A urease (EC 3.5.1.5) é capaz de catalisar a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. O biocomponente (0,2g) foi imobilizado em tela de nylon por meio de uma solução de glutaraldeído 12,5%. O tempo reacional selecionado foi de 15 minutos e a faixa linear, utilizando soluções padrão, do instrumento foi de 1 a 20ppm de uréia. O tempo de vida útil do instrumento foi superior a 2 meses, quando o biocomponente foi estocado em congelador (-8°C) e envolto em papel filme de PVC. Quando aplicado a amostra real, o vinhoto, apresentou resposta qualitativa promissora.

O biossensor amperométrico para fenol foi construído utilizando o cogumelo champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, como fonte da enzima

tirosinase e o eletrodo de oxigênio como transdutor. A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma polifenol oxidase que tem capacidade de oxidar fenóis a *o*-quinonas, consumindo o oxigênio. O material utilizado (5g) foi cortado em cubos de 1cm de lado e liofilizado, sendo colocado na posição mais próxima ao posicionamento do eletrodo, do sistema montado. Visando o melhor funcionamento do instrumento, selecionou-se 40ml/min como vazão de escoamento das soluções padrão, encontrando o tempo reacional de 6 minutos e uma faixa linear de 5 a 25ppm de fenol. No entanto, o biossensor não apresentou repetibilidade da sua faixa linear, precisando haver novas análises para determinar melhor arranjo do sistema, como a utilização do material biológico liofilizado em pó, para futura aplicação em amostras reais ambientais.

ABSTRACT

SILVA, Lívia Maria da Costa. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The increasing number of potentially harmful pollutants in the environment has asked for fast and cost-effective analytical techniques to be used in environmental monitoring programs. In this context, biosensors appear as a suitable alternative or as a complementary analytical tool. This study aimed to develop in a simple and inexpensive way two projects of electrochemical biosensors for urea and phenol in order to apply in real environmental samples.

The urea potentiometric biosensor used the jack bean, *Canavalia ensiformis*, as a urease source and ammonium ion-selective electrode as a transducer. Urease (EC 3.5.1.5) can catalyze the urea hydrolysis into ammonia and carbon dioxide. The biocomponent (0,2g) was immobilized on a nylon net by glutaraldehyde solution 12,5%. The selected reaction time was 15 minutes and the linear range of the instrument was 1-20ppm of urea using standard solutions. The lifetime of the biosensor was more than two months when the immobilized biocomponent was stored in freezer (-8°C) and wrapped in PVC film. When the biosensor was applied to real sample, vinasse, it showed promising qualitative response.

The phenol amperometric biosensor was mounted using the champignon de Paris mushroom, *Agaricus bisporus*, as a tyrosinase source, and oxygen electrode, as transducer. The tyrosinase (EC 1.14.18.1) is a polyphenol oxidase

that is capable of oxidizing phenols to *o*-quinones with oxygen consuming. The lyophilized biocomponent (5g) used was cut into cubes with 1cm on a side and placed in the closest position to the electrode, on the system.

To better instrument operation, was selected as 40ml/min to flow drain of standard solutions, was found the reaction time of 6 minutes and the linear range 5-25ppm of phenol. However, the biosensor didn´t show repeatability of its linear range, there must be further analysis to determine the best arrangement system, such as the lyophilized powder of biocomponent, for future environmental samples application.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema geral de funcionamento de um biossensor..... 30
Figura 2: Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível. 31
Figura 3: As diversas áreas onde a análise potenciométrica é empregada. ... 40
Figura 4: Expansão esperada para o mercado para biossensores que se prevê um CAGR de 11,5% de 2009 a 2016. 42
Figura 5: Esquema dos principais desafios para a comercialização dos biossensores. 43
Figura 6: Esquema simplificado da reação catalisada pela enzima tirosinase, (1) representa a atividade cresolase e (2) a atividade catecolase..... 53
Figura 7: Esquema de hidrólise da uréia catalisada pela enzima urease, (1) reação a clivagem da uréia, pela urease, produzindo uma molécula de amônia e uma de ácido carbâmico; (2) a decomposição espontânea do ácido carbâmico em amônia e ácido carbônico; (3) a hidrólise do ácido carbônico, que se tornam protonadas, gerando íons amônio e hidroxila (4). 55
Figura 8: Fotografia do sistema biossensor inicialmente montado (eletrodo de oxigênio e tecido fúngico) durante o desenvolvimento preliminar do sistema. . 62
Figura 9: Biossensor potenciométrico desenvolvido por Pinto *et al*. (2009) para quantificação de uréia. 63
Figura 10: Curva padrão de quantificação de proteína obtida pelo método de Lowry usando albumina bovina como padrão. 65
Figura 11: Foto do feijão de porco na sua forma *in natura*. 66
Figura 12: Foto de um pedaço da tela de nylon comercial utilizada no processo de imobilização..... 67
Figura 13: Sequência de passos do processo de imobilização do pó de feijão de porco. 68
Figura 14: Exemplo de uma curva padrão do eletrodo íon-seletivo a amônio elaborada ao longo do presente trabalho. 71
Figura 15: Esquema do sistema biossensor potenciométrico, desenvolvido no presente trabalho, montado para análise de uréia, (1) recipiente com a solução padrão de uréia; (2) bomba dosadora peristáltica; (3) câmara reacional; (4) eletrodo íon-seletivo a amônio, (5) potenciostato e (6) descarte..... 74
Figura 16: Foto dos cogumelos champignon de Paris *in natura*..... 78
Figura 17: Curvas de atividade tirosinásica dos 1º e 2º extratos enzimáticos de um dos lotes comprados do cogumelo *Agaricus bisporus* durante o desenvolvimento do presente trabalho..... 80
Figura 18: Exemplo de curva padrão de dosagem de fenol utilizando o método colorimétrico direto descrito no *Standard Methods*. 82
Figura 19: Sistema biossensor, desenvolvido no presente trabalho, montado para quantificação de compostos fenólicos , (1) recipiente com a solução padrão de composto fenólico; (2) bomba dosadora peristáltica; (3) câmara reacional; (4) eletrodo de oxigênio e (5) descarte. 84
Figura 20: Possíveis posições para o biocomponente no sistema biossensor em desenvolvimento. 85
Figura 21: Variação da atividade ureásica do pó de feijão imobilizado em tela de nylon ao longo dos dias de estocagem em geladeira usando as duas soluções tampão durante o ensaio alcalimétrico..... 90

Figura 22: Variação da atividade ureásica do pó de feijão *in natura* ao longo dos dias de estocagem em geladeira usando o ensaio alcalimétrico. 91
Figura 23: Variação da atividade ureásica do pó de feijão *in natura* ao longo dos dias de estocagem usando o ensaio alcalimétrico. 92
Figura 24: Estudo da forma de armazenamento do pó de feijão imobilizado em tela de nylon usando o ensaio alcalimétrico para quantificação da atividade ureásica. 93
Figura 25: Variação da atividade ureásica do pó de feijão imobilizado em tela de nylon, quando não estava em uso no biossensor, armazenado em congelador e envolto em papel filme de PVC, usando o ensaio alcalimétrico. 94
Figura 26: Estudo do tempo de estocagem do pó de feijão *in natura* e imobilizado usando o eletrodo íon-seletivo para quantificação da geração de amônia pela reação enzimática catalisada pela urease. 96
Figura 27: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo íon-seletivo quando se colocou o pó de feijão *in natura* e imobilizado em contato com solução de uréia 10ppm. 97
Figura 28: Análise da influência da reutilização do biocomponente vegetal imobilizado na atividade ureásica quando o colocou em contato com solução de uréia 10ppm através do método alcalimétrico. 98
Figura 29: Valores de saída do transdutor, em mV, para o mesmo valor de analito (20 ppm de uréia) e material biológico, usando dois tempos reacionais: 2 e 5 minutos. 100
Figura 30: Variação da resposta do eletrodo ao longo do tempo quando inserido em uma solução do analito (10 ppm de uréia) em contato com o material biológico de estudo no biossensor. 101
Figura 31: Tempo de estabilização da leitura do novo eletrodo íon-seletivo quando se colocou o pó de feijão imobilizado em contato com solução de uréia 10ppm no biossensor. 102
Figura 32: Valores de output do transdutor, em mV, para o mesmo valor de analito e material biológico utilizado, usando o tempo reacional determinado (15 minutos)..... 103
Figura 33a: Estudo da linearidade do instrumento montado, usando o biocomponente imobilizado em tela de nylon, relacionando a concentração do substrato e do produto formado 104
Figura 33b: Estudo da linearidade do instrumento montado, usando o biocomponente imobilizado em tela de nylon, relacionando o logaritmo natural do substrato e a resposta, em mV, do transdutor. Cada curva representa um "conjunto" de biocomponente imobilizado em tela de nylon diferente. 105
Figura 34a: Curvas de calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira visando o estudo de vida útil do instrumento, levando em consideração o produto formado (amônia). 106
Figura 34b: Curvas de calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira visando o estudo de vida útil do instrumento, levando em consideração a resposta do transdutor. 107
Figura 35a: Curvas calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira, levando em consideração o produto formado (amônia)..... 107

Figura 35b: Curvas calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira, levando-se em consideração a resposta do transdutor. 108
Figura 36: Curvas descendentes construídas ao longo dos dias de estocagem do material biológico em geladeira, usando o primeiro transdutor adquirido. 109
Figura 37: Comparação entre as curvas ascendente e descendente construídas com o biossensor potenciométrico, usando o segundo transdutor adquirido..... 109
Figura 38: Curvas de calibração visando o estudo da repetibilidade da curva de calibração do instrumento em desenvolvimento, utilizando o primeiro transdutor. A curva 1 representa a primeira curva de calibração elaborada e a curva 2, a repetição da curva 1. 111
Figura 39: Curvas de calibração visando o estudo da repetibilidade da curva de calibração do biossensor potenciométrico, usando o segundo transdutor. A curva 1 representa a primeira curva de calibração elaborada e a curva 2, a repetição da curva 1. 112
Figura 40: Remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação com os cogumelos *in natura* embalados a vácuo e estocados em geladeira. 116
Figura 41: Comparação entre o percentual de remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação entre os cogumelos *in natura* embalados a vácuo e os liofilizados estocados em geladeira após 12 dias de adquiridos. 117
Figura 42: Ensaios preliminares do tempo de estocagem do tecido fúngico liofilizado em geladeira através da análise de remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação. 118
Figura 43: Ensaio do tempo de estocagem do tecido fúngico liofilizado em geladeira analisando a remoção de fenol ao final de 60 minutos de reação. . 119
Figura 44: Estudo de melhor forma de estocagem (geladeira, congelador, temperatura ambiente - dissecador) dos cogumelos liofilizados usando como comparação o percentual de remoção de fenol ao final de 60 minutos de reação. 120
Figura 45: Relação entre a variação da concentração de fenol (ppm) e a variação de oxigênio dissolvido (mg/l) usando 5 minutos como tempo reacional do biocomponente na posição A do biossensor e vazão de escoamento da solução padrão de fenol de 40ml/min. 121
Figura 46: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente na posição A em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor usando as três vazões de escoamento estudadas. 123
Figura 47: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente na posição B em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor usando as três vazões de escoamento da solução analisadas. 123
Figura 48: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/ml), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, utilizando três tempos reacionais: 5, 6 e 10 minutos. 124
Figura 49: Curvas de calibração ascendentes do biossensor amperométrico utilizando as condições escolhidas (6 minutos de reação, vazão de 40ml/min e posição A do biocomponente na câmara reacional). Cada curva foi realizada com 5g de cogumelos liofilizados diferentes. 126
Figura 50: Ensaios visando o estudo da repetibilidade na construção da curva ascendente do biossensor amperométrico utilizando o mesmo biocomponente

sob as condições escolhidas (6 minutos de reação, vazão de 40ml/min e posição A do biocomponente na câmara reacional)..... 127
Figura 51: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente, em pó, na posição A em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor. 128
Figura 52: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, usando 0,5g de pó do biocomponente liofilizado, utilizando três tempos reacionais: 10, 15 e 20 minutos..... 129
Figura 53: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, usando 1,0g de pó do biocomponente liofilizado, utilizando três tempos reacionais: 10, 15 e 20 minutos..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores..... 34
Tabela 2: Tipo de transdutores empregados em biossensores. 36
Tabela 3: Biossensores amperométricos à base de tecidos. 39
Tabela 4: Alguns biossensores desenvolvidos para detecção de compostos fenólicos 46
Tabela 5: Biossensores para quantificação de uréia. 49
Tabela 6: Composição da amostra de vinhoto doada pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental. 77
Tabela 7: Resultados da aplicação do biossensor potenciométrico de uréia em uma amostra real. 113
Tabela 8: Análise dos dados presentes nas Figuras 52 e 53. 130
Tabela 9: Comparação entre os projetos de biossensor desenvolvidos ao longo da Tese. 133

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO 21

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS 24

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL 24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 26

3.1 BIOSSENSORES 26
3.2 DEFINIÇÃO DE BIOSSENSOR 27
3.3 COMPONENTES E FUNCIONAMENTO DE UM BIOSSENSOR 29
3.3.1 COMPONENTE BIOLÓGICO 30
3.3.1.1 Biossensores enzimáticos 32
3.3.1.2 Biossensores que usam tecidos (animais, fúngicos e vegetais) 32
3.3.2 SISTEMA DE TRANSDUÇÃO 34
3.3.2.1 Biossensores eletroquímicos 37
3.3.2.1.1 Biossensores amperométricos 37
3.3.2.1.2 Biossensores potenciométricos 39
3.4 APLICAÇÃO DOS BIOSSENSORES NA ÁREA AMBIENTAL 41
3.5 COMERCIALIZAÇÃO DOS BIOSSENSORES 42
3.6 ANALITOS DE ESTUDO 44
3.6.1 COMPOSTOS FENÓLICOS: FENOL 44
3.6.2 COMPOSTOS NITROGENADOS: URÉIA 47
3.7 BIOCOMPONENTES DE ESTUDO E SUAS ENZIMAS 50
3.7.1 MACROFUNGO *AGARICUS BISPORUS* 50
3.7.1.1 Tirosinase 51
3.7.1.1.1 Aplicações da Tirosinase de Cogumelos 53
3.7.2 FEIJÃO DE PORCO (*CANAVALIA ENSIFORMIS*) 54
3.7.2.1 Urease 55
3.7.2.1.1 Características Gerais 55
3.7.2.1.2 Urease de *Canavalia ensiformis* 56
3.8 TRANSDUTORES UTILIZADOS 56
3.8.1 ELETRODO DE OXIGÊNIO 56
3.8.2 ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO 58

CAPÍTULO 4 TRABALHOS ANTERIORES 60

4.1 UTILIZAÇÃO DO TECIDO FÚNGICO DE *AGARICUS BISPORUS* COMO BIOCOMPONENTE NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO DE FENOL 60
4.2 USO DO TECIDO VEGETAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE URÉIA 62

CAPÍTULO 5 MATERIAL E MÉTODOS 64

5.1 EQUIPAMENTOS 64
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA: MÉTODO DE LOWRY 64
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE UMIDADE DOS BIOCOMPONENTES 65
5.4 ENSAIOS COM O TECIDO VEGETAL DE *CANAVALIA ENSIFORMIS* VISANDO O DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA URÉIA 66
5.4.1 TECIDO VEGETAL DE FEIJÃO DE PORCO (*CANAVALIA ENSIFORMIS*) 66
5.4.2 PREPARAÇÃO DO BIOCOMPONENTE 66
5.4.2.1 Moagem e peneiramento 66
5.4.2.2 Imobilização em tela de nylon comercial 67
5.4.3 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA UREASE DO TECIDO VEGETAL 69
5.4.4 CALIBRAÇÃO E CURVA PADRÃO DO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO 70
5.4.5 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DE ACORDO COM O MÉTODO DE ESTOCAGEM DO TECIDO VEGETAL NA FORMA DE PÓ (IMOBILIZADO E *IN NATURA*) USANDO O MÉTODO ALCALIMÉTRICO 71
5.4.6 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DO TECIDO VEGETAL EM PÓ (IMOBILIZADO E *IN NATURA*) USANDO QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIA PRODUZIDA PELO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO 72
5.4.7 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DE RESPOSTA DO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO EM CONTATO COM O PÓ DE FEIJÃO DE PORCO *IN NATURA* E IMOBILIZADO E DA REPETIBILIDADE DA RESPOSTA DO TRANSDUTOR 72
5.4.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA UREASE PRESENTE NO TECIDO VEGETAL IMOBILIZADO EM TELA DE NYLON 73
5.4.9 PROJETO DO SISTEMA BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE URÉIA E SEU FUNCIONAMENTO 74
5.4.9.1 Estudo do tempo reacional do biocomponente no sistema biossensor 75
5.4.9.2 Estudo da faixa de linearidade do biossensor potenciométrico 75
5.4.9.3 Estudo do tempo de vida útil do componente biológico do biossensor potenciométrico 76
5.4.9.4 Análise de perda de biocomponente imobilizado pela lavagem do sistema biossensor 76
5.4.9.5 Utilização do biossensor potenciométrico em amostra real 77
5.5 ENSAIOS COM O TECIDO FÚNGICO DE *AGARICUS BISPORUS* VISANDO O DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA FENOL 78
5.5.1 TECIDO FÚNGICO DE CHAMPIGNON DE PARIS (*AGARICUS BISPORUS*) 78
5.5.2 EXTRAÇÃO DA TIROSINASE PRESENTE NOS COGUMELOS DE *AGARICUS BISPORUS* 78
5.5.3 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TIROSINASE DO TECIDO FÚNGICO 79
5.5.4 PREPARAÇÃO DO COGUMELO CHAMPIGNON DE PARIS 80
5.5.5 DOSAGEM DO FENOL 81
5.5.6 CALIBRAÇÃO DO ELETRODO DE OXIGÊNIO 82
5.5.7 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DO TECIDO FÚNGICO LIOFILIZADO E TECIDO *IN NATURA* EMBALADO A VÁCUO 83
5.5.8 PROJETO DO SISTEMA BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SEU FUNCIONAMENTO 83
5.5.8.1 Estudo das melhores condições relativas à posição do tecido fúngico, o tempo de reação e a vazão de escoamento da solução padrão para a construção da curva de calibração do biossensor amperométrico 85

5.5.8.2 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo de oxigênio no biossensor para fenol quando colocado em contato com o tecido fúngico liofilizado em cubos de 1cm de lado na posição A 86
5.5.8.3 Estudo da faixa de linearidade do biossensor amperométrico 86
5.5.8.4 Análise da reutilização do biocomponente durante a construção da curva de calibração ascendente do sistema biossensor para quantificação de fenol 87
5.5.8.5 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo de oxigênio no biossensor para fenol quando colocado em contato com o tecido fúngico liofilizado na forma de pó na posição A 87

CAPÍTULO 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 88

6.1 QUANTIFICAÇÃO DE UMIDADE DOS BIOCOMPONENTES 88
6.2 RESULTADOS RELATIVOS AO TECIDO VEGETAL PARA APLICAÇÃO NO BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA URÉIA 89
6.2.1 Estudo do tempo de estabilidade de acordo com o método de estocagem do tecido vegetal na forma de pó (imobilizado e *in natura*) usando o método alcalimétrico 89
6.2.2 Estudo do tempo de estabilidade do tecido vegetal em pó (imobilizado e *in natura*) usando quantificação de amônia produzida pelo eletrodo íon-seletivo a amônio 95
6.2.3 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DE RESPOSTA DO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO EM CONTATO COM O PÓ DE FEIJÃO DE PORCO *IN NATURA* E IMOBILIZADO 96
6.2.4 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA UREASE IMOBILIZADA EM FUNÇÃO DA SUA REUTILIZAÇÃO 97
6.2.5 FUNCIONAMENTO DO BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE URÉIA 99
6.2.5.1 Estudo do tempo reacional do biocomponente no sistema biossensor 99
6.2.5.2 Estudo da faixa de linearidade do instrumento 104
6.2.5.3 Estudo do tempo de vida útil do instrumento para análise de uréia 106
6.2.5.4 Estudo da repetibilidade do instrumento para análise de uréia 110
6.2.5.5 Análise de perda de biocomponente imobilizado pela lavagem do sistema biossensor 112
6.2.5.6 Utilização do biossensor potenciométrico em amostra real 113
6.3 RESULTADOS RELATIVOS AO TECIDO FÚNGICO PARA APLICAÇÃO NO BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA FENOL 114
6.3.1 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA E ATIVIDADE TIROSINÁSICA DO TECIDO FÚNGICO 114
6.3.2 ESTUDO DO TEMPO DE ESTABILIDADE DO TECIDO FÚNGICO LIOFILIZADO E TECIDO *IN NATURA* EMBALADO A VÁCUO 115
6.3.3 FUNCIONAMENTO DO BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL 120
6.3.3.1 Estudo das melhores condições para a construção da curva de calibração do biossensor amperométrico para determinação de fenol 120
6.3.3.2 Análise da reutilização do biocomponente na construção da curva de calibração ascendente do sistema biossensor para quantificação de fenol 127
6.3.3.3 Estudo do tempo de reação para a construção da curva de calibração do biossensor para fenol usando o pó de tecido fúngico liofilizado na posição A do sistema 128

CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES 131

7.1 BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA URÉIA 131
7.2 BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA FENOL 132
7.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS BIOSSSENSORES DESENVOLVIDOS DURANTE A TESE 133

CAPÍTULO 8 SUGESTÕES 135

8.1 BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA URÉIA 135
8.2 BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA FENOL 135

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 137

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

O aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos verificado nas últimas décadas tem causado problemas de poluição ambiental de maneira generalizada em todas as partes do mundo. Portanto, a proteção ambiental vem adquirindo grande importância na sociedade contemporânea, que tem cobrado mecanismos rápidos e eficientes de controle e fiscalização dos processos de contaminação, principalmente relacionados aos efluentes industriais (EPA, 2003; PAITAN *et al*., 2003). Deste modo, existe um consenso a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos, principalmente, nos corpos hídricos naturais e nos inúmeros efluentes industriais neles descarregados.

No contexto brasileiro, a legislação ambiental tem sido cada vez mais rigorosa quanto aos limites de descarte de compostos químicos nos diversos tipos de corpos hídricos. Além disso, determina a possibilidade de utilização de ensaios ecotoxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos, para análise de possíveis interações entre as substâncias citadas na lei e a presença de contaminantes que não estejam listados, passíveis de causar danos aos seres vivos (biota local e ser humano), presentes no efluente industrial a ser descartado. No contexto de legislação federal, pode-se citar a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes no meio ambiente.

O tempo e os custos envolvidos com a detecção de poluentes (por exemplo: aquisição, preparo e análise da amostra) têm imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental. Por outro lado, o aumento na quantidade de dados analíticos permite maior confiabilidade nas decisões de gerenciamento ambiental, por melhorar a eficiência na caracterização dos compostos poluentes *in situ* e caracterizar melhor os riscos ou ainda a eficiência dos procedimentos de descontaminação. Assim, a limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que permitam um

aumento no número destas análises num menor tempo e com custos acessíveis. Dentro deste contexto, é importante contar com metodologias emergentes na área de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, como os instrumentos denominados biossensores (ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; EPA, 2003).

Os biossensores representam ferramentas promissoras para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e possibilidade de construção de equipamentos simples e portáteis. Contudo, estas ferramentas não podem ser encaradas como uma substituição das técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a estas, pois algumas delas podem apresentar problemas de estabilidade (ROSATTO, 2000).

O funcionamento de um biossensor, de uma forma geral, envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Em seguida, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato, produzindo íons, elétrons, calor, luz, variação de massa, fluorescência ou gases, que são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (DANIELSSON *et al.*, 1981). Os biossensores, além de se apresentarem como instrumentos promissores para o monitoramento ambiental rápido e contínuo, possuem um amplo mercado potencial de aplicação, cobrindo as áreas de diagnose clínica, militar, controle de processos, alimentícia, de bebidas e agricultura.

Os problemas de estabilidade supracitados e a falta de credibilidade dos biossensores para aplicação em algumas áreas são ainda grandes desafios que contribuem para a escassez destes instrumentos no mercado. No entanto, esforços têm sido realizados buscando melhorar a confiança de modo a obter um sensor com desempenho desejado em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade.

Na busca por componentes biológicos mais baratos e eficazes para a produção de biossensores, na literatura existente, encontram-se vários trabalhos utilizando fontes naturais (vegetal e fúngica) para extração de enzimas. Assim, o presente trabalho visou o desenvolvimento de biossensores

para aplicação ambiental, na quantificação de compostos fenólicos e nitrogenados, analitos que têm seus limites máximos de descarte e concentração presentes na legislação ambiental brasileira vigente. Pretendeu-se ainda construir estes instrumentos de forma simples, usando as enzimas de interesse naturalmente presentes nos tecidos vegetal e fúngico, para monitoração *in situ* de amostras reais, que além de fornecerem respostas rápidas, são de baixo custo e com baixa geração de resíduos durante as análises, se comparado com as metodologias clássicas de análise.

Para a apresentação do trabalho desenvolvido, essa tese foi dividida nos seguintes capítulos: *Capítulo 1*, apresentando a introdução com os aspectos gerais relacionados ao tema do trabalho, além de um breve apanhado da motivação e objetivos do mesmo; *Capítulo 2*, que apresenta os objetivos gerais e específicos relacionados ao desenvolvimento de ambos os biossensores para aplicação ambiental; *Capítulo 3*, onde são apresentados os principais conceitos e estados da técnica referentes ao tema de biossensores para uréia e compostos fenólicos; *Capítulo 4,* onde são mostrados os aspectos gerais e os principais resultados encontrados nos dois trabalhos (PINTO *et al*., 2009; SILVA, 2009) que foram utilizados como base para o desenvolvimento dessa Tese; *Capítulo 5*, onde são apresentados os materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos para uréia e fenol; *Capítulo 6*, que apresenta e discute os resultados encontrados na confecção dos biossensores eletroquímicos para aplicação ambiental; *Capítulo 7*, onde são apresentadas as principais conclusões da Tese, finalizando com o *Capítulo 8,* com as sugestões de trabalhos futuros visando a continuação dos instrumentos desenvolvidos e aplicação em amostras reais.

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver biossensores para aplicação ambiental, especificamente para os analitos: uréia e fenol, usando tecidos vegetal e fúngico e duas técnicas de transdução eletroquímica: potenciometria e amperometria, respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

A fim de alcançar o objetivo principal da tese, o presente trabalho apresentou os seguintes objetivos específicos para o biossensor amperométrico para quantificação de compostos fenólicos:

- ✓ Dar continuidade ao trabalho de Mestrado no desenvolvimento de um biossensor amperométrico para quantificação de fenol no Laboratório de Sensores Biológicos (SILVA, 2009), usando tecido fúngico como fonte de tirosinase e eletrodo de oxigênio como transdutor;
- ✓ Quantificar o teor de umidade do biocomponente fúngico;
- ✓ Comparar o tempo de estocagem, em geladeira, do tecido fúngico cortado em cubos de 1cm de lado sob duas maneiras: embalados a vácuo na forma *in natura* e liofilizados;
- ✓ Analisar o tempo e o modo de estocagem do tecido fúngico liofilizado cortado em cubos de 1cm de lado;
- ✓ Determinar as melhores condições de montagem do instrumento para a determinação de fenol em relação ao posicionamento do biocomponente em relação ao transdutor, vazão de operação do sistema e tempo reacional;
- ✓ Determinar a faixa de detecção (faixa linear) do instrumento em relação ao fenol e construir a sua curva padrão sob as condições escolhidas de condução dos ensaios;

- ✓ Analisar a reutilização do biocomponente no biossensor amperométrico;
- ✓ Analisar a repetibilidade e reprodutibilidade do instrumento desenvolvido;
- ✓ Determinar as melhores condições de construção do instrumento para a quantificação de fenol usando o biocomponente liofilizado em pó.

E os seguintes objetivos específicos para o sistema biossensor potenciométrico para quantificação de uréia:

- ✓ Dar continuidade ao desenvolvimento do sistema biossensor potenciométrico para quantificação de uréia desenvolvido no Laboratório de Sensores Biológicos por Pinto *et al.* (2009), usando tecido vegetal de feijão de porco como fonte de urease e eletrodo íon-seletivo a amônio como transdutor;
- ✓ Quantificar o teor de umidade do biocomponente vegetal;
- ✓ Analisar o tempo de estabilidade de acordo com o modo de estocagem do tecido vegetal em pó *in natura* e imobilizado;
- ✓ Analisar o tempo de estabilidade do biocomponente imobilizado em uso no instrumento;
- ✓ Determinar o tempo de resposta do instrumento para a determinação do analito sob as condições previamente determinadas de condução dos ensaios;
- ✓ Escolher a faixa de detecção (faixa linear) do instrumento e construir a curva padrão sob as condições de condução dos ensaios escolhidas;
- ✓ Analisar a repetibilidade e reprodutibilidade do instrumento desenvolvido;
- ✓ Analisar a perda do biocomponente imobilizado durante as análises utilizando o biossensor potenciométrico;
- ✓ Aplicar o biossensor desenvolvido em amostras reais ambientais, avaliando os possíveis interferentes.

CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossensores

A seletividade é um dos maiores problemas na química analítica, e geralmente, é obtida apenas através de um intenso controle das condições experimentais. No entanto, na natureza, encontram-se estruturas altamente seletivas na forma de enzimas, anticorpos, dentre outros. As enzimas, particularmente, apresentam várias vantagens, em especial uma feliz combinação de seletividade com sensibilidade, além de permitem a utilização de várias tecnologias de transdução.

Free & Free (1953) revolucionaram os procedimentos analíticos com a implementação de tiras enzimáticas. No entanto, estas apresentavam diversos inconvenientes de modo que se procurou uma nova abordagem conseguida por Clark & Lyons (1962), através de uma experiência usando glicose oxidase imobilizada na superfície de um eletrodo de oxigênio. Observou-se uma diminuição da concentração de oxigênio proporcional à concentração de glicose. No artigo correspondente, apareceu pela primeira vez o termo eletrodo enzimático. Apesar disto, foram Hicks & Updike (1966) que, extrapolando o conceito, resolveram os problemas de ordem prática, necessários para construir um eletrodo enzimático sensível a glicose. O sensor foi a base de numerosas variações de um desenho básico nos quais outras enzimas (oxidases) foram imobilizadas.

O desenho de Clark foi tão bem sucedido que muitos biossensores experimentais e comerciais ainda são construídos segundo o original. No entanto, hoje em dia, prefere-se, como alternativa, a medição de peróxido de hidrogênio. Destes, destacam-se os biossensores produzidos pela companhia *Yellow Springs Instrument Company* (Ysi) (Ohio, EUA) (PATACAS, 2007). O seu biossensor de glicose foi criado em 1975, baseado na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio. Este foi o primeiro biossensor a ser produzido com fins comerciais.

O primeiro eletrodo enzimático potenciométrico foi construído por Guibault & Montalvo (1969). Tratava-se de um sensor de uréia baseado em urease imobilizada em um eletrodo de membrana seletiva a amônia.

Durante os anos 80, pela primeira vez, foi atingido o sucesso econômico em grande escala. Em 1984, foi publicado um artigo sobre o uso de ferroceno e dos seus derivados como mediadores imobilizados para uso com oxidorredutases. Em 1987, estes eram componentes essenciais para a construção de eletrodos enzimáticos pouco dispendiosos, e como tais, formaram a base para os primeiros elétrodos enzimáticos impressos em placas lançados pela companhia *MediSense* (Cambridge, EUA) (PATACAS, 2007).

As atuais publicações científicas contêm descrições de uma ampla variedade de dispositivos que exploram as enzimas, ácidos nucléicos, anticorpos, células intactas e receptores celulares (material biológico) em combinação com transdutores eletroquímicos, óticos, calorimétricos e acústicos (sistema de transdução). As mudanças no material biológico e/ou no sistema de transdução permitem milhares de estratégias alternativas de desenvolvimento de biossensores. Cada uma apresentando novas soluções para problemas analíticos nas mais variadas áreas de atuação.

3.2 Definição de biossensor

O sensor químico é definido como um dispositivo que transforma a informação química, que varia de acordo com a concentração de um componente da amostra a ser analisada, em um sinal analiticamente útil e quantificável. Os sensores químicos geralmente apresentam dois componentes básicos ligados em série: um sistema de reconhecimento químico ou molecular (receptor) e um transdutor físico-químico. Estendendo essa definição aos biossensores, estes são sensores químicos onde o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico (ARNOLD & RECHNITZ, 1987).

Os biossensores são uma área multidisciplinar para a qual não existe uma forma delineada. Assim, a sua rápida disseminação e diversidade justificam as várias

definições para o termo biossensor que se encontram na literatura. De forma geral, são definidos como qualquer dispositivo de detecção que incorpore tanto um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, etc), como um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica no ambiente (PATACAS, 2007). Formalmente, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) propõe a seguinte definição para biossensor: “Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução” (THÉVENOT *et al*., 2001). Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal quantificável; por exemplo, elétrico; proporcional à concentração do analito (SALGADO, 2001).

Estes instrumentos permitem realizar as mais variadas tarefas como: efetuar controle em linha a nível industrial, análise ambiental em tempo real, automatização de análises bioquímicas, análise *in vivo*, detecção de substâncias biológicas relevantes (como hormônios e drogas) e detecção de agentes de guerra química. Geralmente, um biossensor permite o uso de métodos “limpos” e de baixo custo sem a necessidade de pré-tratamentos morosos e de grandes volumes de amostra. Assim, um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalítico que requer etapas adicionais de processamento, tais como adição de reagentes, além do componente biológico não estar necessariamente ligado de forma direta ao detector.

O uso dos biossensores, na maioria dos casos, não necessita de 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, devendo ser analisadas as suas características únicas (ROSATTO *et al*., 2001), tais como:

- ✓ Seletividade, que está relacionada à habilidade que certas macromoléculas biológicas possuem em discriminar diferentes substratos;

- ✓ Faixa de sensibilidade, que corresponde à faixa de concentração mensurável;
- ✓ Acurácia e precisão;
- ✓ Natureza da solução, que está relacionada com condições como pH, temperatura e força iônica do meio as quais devem ser consideradas;
- ✓ Tempo, relacionado ao tempo de resposta; tempo de recuperação e tempo de vida útil;
- ✓ Freqüência de amostragem;
- ✓ Estabilidade operacional, onde a resposta do biossensor pode variar em função de diversos fatores como: geometria do sensor, método de preparo, assim como, receptores e transdutores usados. Depende da difusão externa e interna do substrato, e das condições operacionais de trabalho (concentração do analito, temperatura, pH, natureza do tampão, presença de solventes orgânicos e de outras substâncias, e composição da solução matriz que contém a amostra);
- ✓ Reprodutibilidade, que é a medida da dispersão ou flutuação em uma série de medidas obtidas ao longo de um período de tempo para concentração de um analito dentro de uma faixa de utilização;
- ✓ Baixo custo de construção e estocagem;
- ✓ Pequeno tamanho e potencial para miniaturização que permite a sua fácil instalação no ambiente de medida e monitoração *in situ*.

3.3 Componentes e funcionamento de um biossensor

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise, isto é, a especificidade e a alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. De um modo geral, como componentes usados no desenvolvimento de um biossensor, incluem-se:

- ✓ Componente biológico;
- ✓ Sistema de transdução;
- ✓ Sistema de processamento de dados e registro.

O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável, tais como: corrente, potencial, variação de temperatura, dentre outras. A Figura 1 resume de forma clara o que foi supracitado.

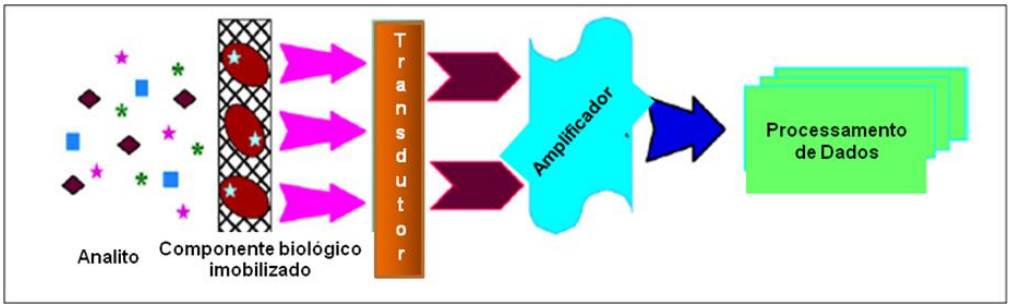

Figura 1: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (criação gráfica de MELO, 2008).

A aplicação de um biossensor permite a detecção quantitativa, além de qualitativa, de uma determinada espécie, pois este responde seletiva e reversivelmente à espécie química, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da dita espécie.

3.3.1 Componente biológico

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, é uma das características mais importantes de um biossensor. Ocorre principalmente em função do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua. Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (ALFAYA & KUBOTA, 2008; DU *et al.*, 2008).

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomponente para atuar como elemento de reconhecimento biológico, dentre eles (SALGADO, 2001):

- ✓ Disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o analito;

- ✓ Estabilidade face ao meio e às condições de medição;
- ✓ Possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho.

Baseado nestas exigências, alguns biocomponentes são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microorganismos, organelas e tecidos (vegetais, animais e fúngicos). Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 2). Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimioreceptores e os imunossensores.

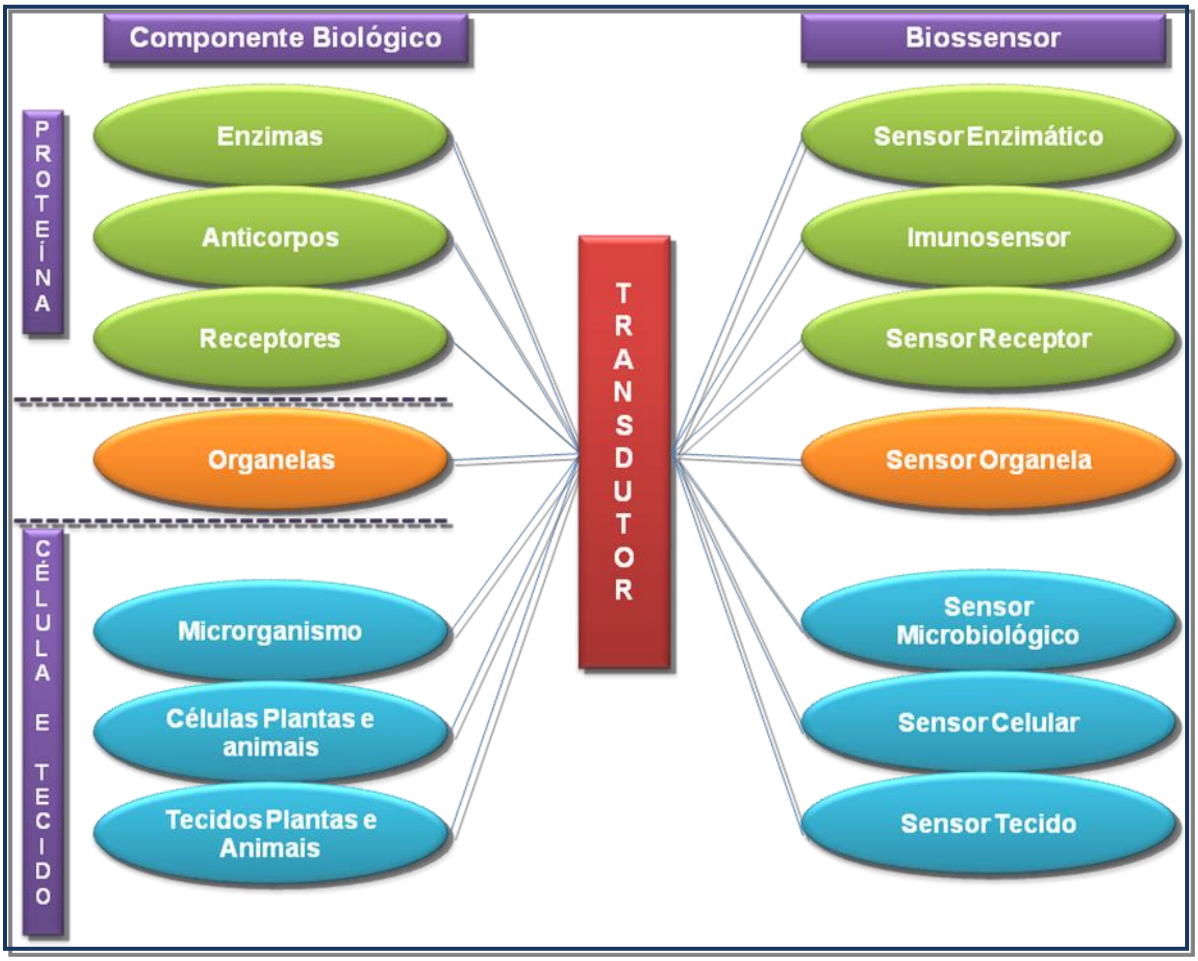

Figura 2: Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível (criação gráfica de MELO, 2008).

3.3.1.1 Biossensores enzimáticos

A maior parte dos biossensores desenvolvidos utiliza como componente biológico as enzimas, em geral imobilizadas (KARUBE & NOMURA, 2000). A vantagem do uso deste componente é que são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparadas aos catalisadores químicos, apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente à ligação forte da molécula de substrato pelo seu sitio ativo, envolvendo fatores do meio ambiente reacional, tais como: tamanho da molécula do substrato, polaridade, estereoquímica, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.

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, mas que pode ser contornada usando as condições adequadas de pH, temperatura e força iônica que garantam a manutenção da atividade enzimática. Outra desvantagem é o fato delas serem caras e, algumas reações enzimáticas, requererem co-fatores que, se não foram facilmente regenerados, encarecem ainda mais ainda o uso dos biossensores enzimáticos.

Na literatura, encontram-se vários trabalhos que utilizam uma ou mais enzimas como componente biológico do biossensor, na maioria das vezes, imobilizadas em diversos suportes e utilizando vários componentes ligantes (VIEIRA *et al*., 2003; LOUZADA *et al*., 2004; PANPAE *et al*., 2006; FIORENTINO *et al*., 2010; NIKOLELI *et al*., 2010).

3.3.1.2 Biossensores que usam tecidos (animais, fúngicos e vegetais)

O Brasil tem uma grande variedade de organismos vivos que podem se constituir em fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento. Em química analítica, por exemplo, podem ser utilizados na construção de diversos tipos de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de

análise. Há uma tendência recente de utilização de tecidos (vegetal e fúngico) e/ou extratos brutos no lugar de enzimas purificadas na confecção dos biossensores (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002).

O uso de tecidos e/ou extratos brutos pode apresentar, em alguns casos, desvantagem na seletividade do método analítico, bem como estão sujeitos a um grande número de interferências e contaminações. No entanto, são extremamente econômicos e, geralmente, possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas. Essa estabilidade se deve ao fato das enzimas estarem em seu habitat natural, isto é, naturalmente imobilizadas nas células do material biológico (ARNOLD & RECHNITY, 1987).

Há diversas formas de se aplicar o tecido na confecção dos biossensores, sendo a utilização de extratos brutos enzimáticos imobilizados, a forma mais citada na literatura (MATSUMOTO *et al*., 1981; SIGNORI & FATIBELLO-FILHO, 1994; VIEIRA & FATIBELLO-FILHO, 2002; TOPÇU *et al*., 2004; MOCCELINI *et al*., 2008; SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2010). No entanto, o ideal seria a utilização do tecido íntegro, não havendo necessidade de extrair a enzima, garantindo uma fonte barata, onde o tecido pode ser usado na forma de fatia do material biológico descascado (HOIRE & RECHNITZ, 1995; FERNANDES *et al.*, 1996), *in natura* (PINTO *et al*., 2007; SILVA *et al*., 2010; SILVA *et al*., 2011), previamente liofilizado ou desidratado.

A tendência de escurecimento dos tecidos está relacionada com as reações entre a enzima polifenol oxidase e peroxidase, e os substratos naturais presentes nestes tecidos. Este processo, aliado à oxidação promovida pelo oxigênio, são os responsáveis pelo apodrecimento do material e o decréscimo da atividade enzimática dos extratos brutos (SALGADO, 2001). Com o objetivo de minimizar estes efeitos, diversas substâncias protetoras e/ou estabilizadoras, como Polyclar® (polivinilpolipirrolidona) Super R, K-30, 10, AT, SB-100 são utilizadas (VIEIRA *et al*., 2003), sendo que a última é responsável por manter a maior atividade específica quando usada na proporção de 2,5:25 (Polyclar® SB-100 : tecido vegetal).

A Tabela 1 aponta algumas aplicações de tecidos animais, fúngicos e vegetais como componentes biológicos dos biossensores.

Tabela 1: Aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores.

Substrato	Tecido biocatalisador	Transdutor eletroquímico
Glutamina	Células de rim suíno	Sensor de NH_3
Adenosina	Células da mucosa do intestino delgado de rato	Sensor de NH_3
Guanina	Fígado de coelho	Sensor de NH_3
Peróxido de hidrogênio	Fígado bovino	Sensor de O_2
Piruvato	Semente de milho	Sensor de CO_2
Dopamina	Polpa de banana	Sensor de O_2
Cisteína	Folha de pepino	Sensor de NH_3
Tirosina	Beterraba	Sensor de O_2
Uréia	Feijão de porco triturado	Sensor de NH_3
Fenol	Cogumelo de Paris (*Agaricus bisporus*)	Sensor de oxigênio
Ácido clorogênico	Broto de feijão (*Vigna radiate*)	Sistema de três eletrodos (voltametria)

Fonte: SALGADO, 2001 modificado.

O presente estudo se insere nesta categoria quando a classificação dos biossensores se baseia no material biológico, visto que utiliza como biocomponentes, o tecido fúngico de *Agaricus bisporus* para detecção de compostos fenólicos e os grãos (em pó imobilizado) de *Canavalia ensiformis* para quantificação de uréia.

Os tecidos vegetal e fúngico íntegros surgem como excelentes fontes de enzima de baixo custo e, geralmente, mais estáveis que as enzimas purificadas. As enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos possuem, também, maior tempo de vida e normalmente apresentam o seu cofator disponível (ARNOLD & RECHNITZ, 1987).

3.3.2 Sistema de transdução

Genericamente, define-se transdutor como sendo todo dispositivo que transforma uma forma de energia em outra. No âmbito da instrumentação elétrica, define-se como sendo todo equipamento que converte qualquer grandeza física não elétrica (temperatura, som, luz) em um sinal elétrico. Sob o ponto de vista da confecção de um biossensor, transdutor é o equipamento que converte o produto da reação

biológica em um sinal elétrico quantificável e processável. O papel deste equipamento consiste em detectar a presença, a mudança, a amplitude ou a freqüência de uma grandeza submetida à medição e providenciar na saída um sinal elétrico que, quando convenientemente processado e aplicado a um aparelho de medição, seja possível quantificar o elemento medido.

A combinação das mais variadas áreas, como eletroquímica, física, eletrônica, tecnologia de sistemas integrados de silício e de fibras óticas no desenvolvimento de novos transdutores, aliada à bioquímica e imunoquímica, tem tornado possível o surgimento de micro-biossensores altamente sensíveis, específicos, seletivos e acurados.

A escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado; que seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e; que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada (MELLO & KUBOTA, 2007). Outros aspectos também devem ser atendidos, como: frequência da resposta; compatibilidade com o meio ambiente onde tem que operar; exatidão; características elétricas (relação entre sinal e ruído; possibilidade de amplificação do sinal quando insuficiente; limitações da frequência de resposta) e condições de aplicação e robustez (peso, dimensões, robustez mecânica e elétrica).

Além da classificação de acordo com o seu componente biológico, os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu sistema de transdução. Baseado no transdutor, os biossensores podem ser classificados em:

- ✓ Biossensores Eletroquímicos:
  - Biossensores Amperométricos;
  - Biossensores Potenciométricos;
  - Biossensores Condutimétricos;
- ✓ Biossensores Acústicos;
- ✓ Biossensores Óticos;
- ✓ Biossensores Calorimétricos.

Dos vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos, óticos e calorimétricos. Na Tabela 2, encontram-se os vários sistemas de transdução, seus modos de medição e aplicação típica.

Tabela 2: Tipo de transdutores empregados em biossensores.

Sistemas de Transdução	Modo de medida	Aplicações típicas
Eletroquímicos		
Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
Amperométrico	Corrente	Substratos enzimáticos e sistemas imunológicos (antígeno/anticorpo)
Potenciométrico	Voltagem	Íons, gases, espécies redox
Carga iônica ou de efeito de campo: ISFET (Íon seletivo transistor de efeito de campo) ENFET (Enzima transistor de efeito de campo) IMFET (Imunológico transistor de efeito de campo)		Íons, gases, substratos enzimáticos e analitos imunológicos Íons em meio biológico, eletrodos enzimáticos e imunoeletrodos
Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Acústicos		
Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Óticos		
Optoeletrônicos, fibras óticas, equipamento de ondas guiadas	Variação de luminosidade (luminescência, fluorescência), Índice de refração	pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos
Calorimétricos		
Termistores, diodos	Calor	Enzima, organela, células integras ou tecidos, gases, poluentes, antibióticos, vitaminas, analitos imunológicos

Fonte: MASCINI *et al.*, 2001 modificado.

3.3.2.1 Biossensores eletroquímicos

Essa classe de biossensores se caracteriza por: serem simples, sensíveis, confiáveis e de resposta rápida; necessitarem de instrumentação de baixo custo. Operarem em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitirem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração (THÉVENOT *et al*., 2001).

As técnicas eletroanalíticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem determinados sistemas, sempre se baseando nas propriedades elétricas de uma solução de analito, quando este está em contato com uma célula eletroquímica. Tais informações incluem: a estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial; a velocidade de transferência de massa; a extensão de adsorção e de quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas. Uma vantagem deste método é que as células eletroquímicas são frequentemente específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é relativamente barata. Todas estas vantagens fazem com que os biossensores eletroquímicos constituam a grande maioria dos biossensores desenvolvidos (CASTILHO, 2003).

Dependendo do princípio de medição, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Neste trabalho, somente serão descritos de forma mais abrangente os transdutores amperométricos e potenciométricos por estes serem nosso objeto de estudo e aplicação.

3.3.2.1.1 Biossensores amperométricos

O princípio de funcionamento de um biossensor amperométrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação ocorre num potencial determinado, onde a corrente gerada está relacionada com a

espécie em solução. Assim, estes biossensores dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo (THÉVENOT *et al*., 2001).

Todavia, como estes biossensores são operados por difusão, as principais desvantagens apresentadas por eles são: uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima; os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse e a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo. Algumas inovações têm tentado superar estes problemas, como o uso de membranas limitantes de difusão para manter as concentrações de substrato abaixo dos níveis de saturação da enzima e o uso de mediadores (PEREZ, 2000).

A construção de eletrodos quimicamente modificados através do desenvolvimento de técnicas de imobilização tanto das enzimas como dos mediadores fez surgir uma nova classe de transdutores amperométricos. Os mediadores podem ser incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturados em pasta de carbono (ROMANI *et al*., 2000). Pandey *et al*. (1993) desenvolveram um biossensor para medição da glicose, onde a enzima glicose oxidase estava incorporada a uma pasta de grafite e epóxi modificada e material eletroativo (mediador) tetracianoquinodimetano (TCNQ). A mistura pastosa obtida era usada para preencher o corpo de um eletrodo ligante. Esta tecnologia é conhecida como *screen printing*.

Este tipo de biossensor representa a maioria dos dispositivos comerciais disponíveis atualmente, isto porque estes eletrodos são baseados em enzimas redox (oxiredutases) (SIGNORI & FARIBELLO-FILHO, 1994) e existe um grande número destas enzimas comercialmente disponíveis que podem atuar na detecção de ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, aldeídos e fenóis.

A Tabela 3 apresenta alguns biossensores amperométricos à base de tecidos vegetais ou fúngicos.

Tabela 3: Biossensores amperométricos à base de tecidos.

Tecido	Enzima	Analito	Faixa linear	Referência
Banana	Polifenol oxidase	Polifenóis	0,2-400µM	NARANG *et al*., 2011
Fungo (*A. bisporus*)	Polifenol oxidase	Thiourea	1-20µM	SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2010
Espinafre (*S. oleracea*)	Oxalato oxidase	Oxalato	0,01-0,1µM	SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2003
Abacate (*P. americana*)	Tirosinase	Catecol	4,65nM-0,01M	PAGLIAI, 2009
Inhame (*A. macrorhiza*)	Polifenol oxidase	Polifenóis	0,01-0,09 µM (fenol)	SIGNORI & FATIBELLO-FILHO, 1994
Banana nanica (*M. acuminata*)	Polifenol oxidase	Paracetamol (acetaminofenol)	-	PERONE *et al*., 2007

3.3.2.1.2 Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos, em geral, utilizam um eletrodo de referência (inerte) e um eletrodo operante, preferencialmente contendo gases ou íons seletivos, ambos em contato com a amostra. Estes se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo operante por acumulação da carga e, portanto, densidade de carga aumentada na superfície do eletrólito. Desta forma, enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons, em decorrência da catálise, e estas espécies são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (THÉVENOT *et al*., 2001; ARYA *et al.*, 2008).

Os eletrodos de íons seletivos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição, onde somente a medição do pH é necessária, não um sistema polarográfico como requer os sensores amperométricos. Em geral, a faixa analítica destes sensores é de 10^{-1} a 10^{-5} mol e

como sua resposta é logarítmica, já que o potencial elétrico desenvolvido pelo eletrodo é proporcional ao logaritmo da atividade do íon em solução, a precisão da medida é constante por toda sua faixa dinâmica, sendo descrita pela equação de Nernst-Donnan (THÉVENOT *et al*., 2001). A Figura 3 apresenta as diversas áreas de aplicação da análise potenciométrica.

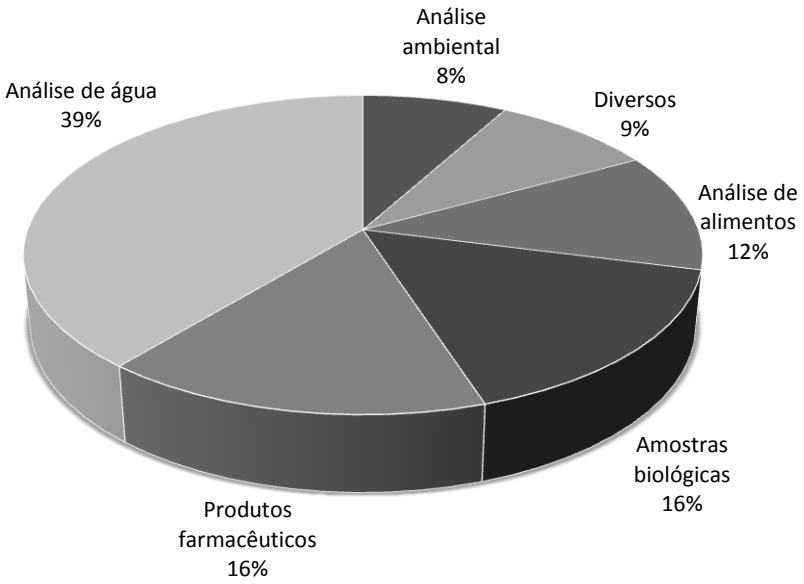

Figura 3: As diversas áreas onde a análise potenciométrica é empregada (KUTSCHENKO *et al*., 2005 modificado).

Biossensores potenciométricos têm sua medição afetada pela atividade de um dado íon em solução, por isso espécies que possam formar complexos com o íon de interesse, assim reduzindo sua atividade, devem ser removidas ou mascaradas. Para isso, é necessário usar uma solução tampão para forçar o controle iônico prevenindo variações na atividade do íon causadas por oxidação, redução ou formação de complexo. Embora, estes sensores tenham uma ampla faixa de medição, apresentam inconvenientes de responder a outros contaminantes e tem uma limitação que é seu baixo limite de detecção.

3.4 Aplicação dos biossensores na área ambiental

A capacidade dos biossensores em, determinar de forma seletiva analitos em amostras complexas, apresentar rapidez de análise, diminuir custo e resíduos gerados por análise, tem atraído o interesse de diferentes áreas como: diagnose clínica, militar, controle de processos, indústrias de alimentos e bebidas, agricultura e monitoramento ambiental.

Na área ambiental, a aplicação dos biossensores é interessante, visto que eles apresentam características importantes quando se deseja fazer uma monitoração ambiental, como: portabilidade, custo baixo (na construção do sistema e na análise), preparação mínima de amostra e estabilidade do instrumento frente aos inúmeros obstáculos existentes neste campo (amplo número de potenciais poluentes, suas várias classes químicas e concentrações). Os biossensores são usados na monitoração e controle do ambiente, principalmente na detecção de metais pesados em amostras de solo, além de herbicidas e pesticidas em amostras de água dos corpos hídricos (VELASCO-GARCIA & MOTTRAM, 2003). Mais recentemente, os biossensores tem tido uma utilização crescente com o desenvolvimento de dispositivos analíticos com capacidade de resposta em tempo real, na detecção e monitoração de agentes químicos e biológicos perigosos.

Apesar da diversidade de áreas de aplicação dos biossensores e do crescente aumento de estudos e patentes na área, a falta de credibilidade para a sua aplicação em algumas áreas é ainda um grande problema que contribui para a sua escassez no mercado. Uma das soluções para este problema tem sido o desenvolvimento de sensores multienzimáticos que permitam a determinação simultânea de compostos de interesse presentes em uma mesma amostra, diminuindo custos, visto que é necessário o uso de um único instrumento e ainda possibilitam, em alguns casos, que possíveis compostos interferentes sejam eliminados. No entanto, independente da área de atuação, a maioria dos biossensores já utilizada é do grupo dos enzimáticos eletroquímicos.

3.5 Comercialização dos biossensores

Thusu (2010) estimou que a receita global para o mercado de biossensores continuará a registrar um forte crescimento, ultrapassando marca de US$ 14 bilhões em sete anos (2009 a 2016) (Figura 4). Estas receitas foram estimadas a crescer com um CAGR (crescimento composto anual) de 11,5% entre 2009 e 2016. A maior parte deste crescimento foi relacionada ao aumento na demanda nas áreas de segurança e biodefesa, monitoramento ambiental, além do segmento de diagnóstico do tipo *homecare*.

Na área ambiental, estima-se que o desenvolvimento dos biossensores cresça em um ritmo acelerado, chegando a US$ 32,7 milhões até o ano 2015. Dispositivos baseados na bioluminescência têm ganhado popularidade em análises da qualidade da água em países como França, Alemanha, Espanha e Suécia (THUSU, 2010).

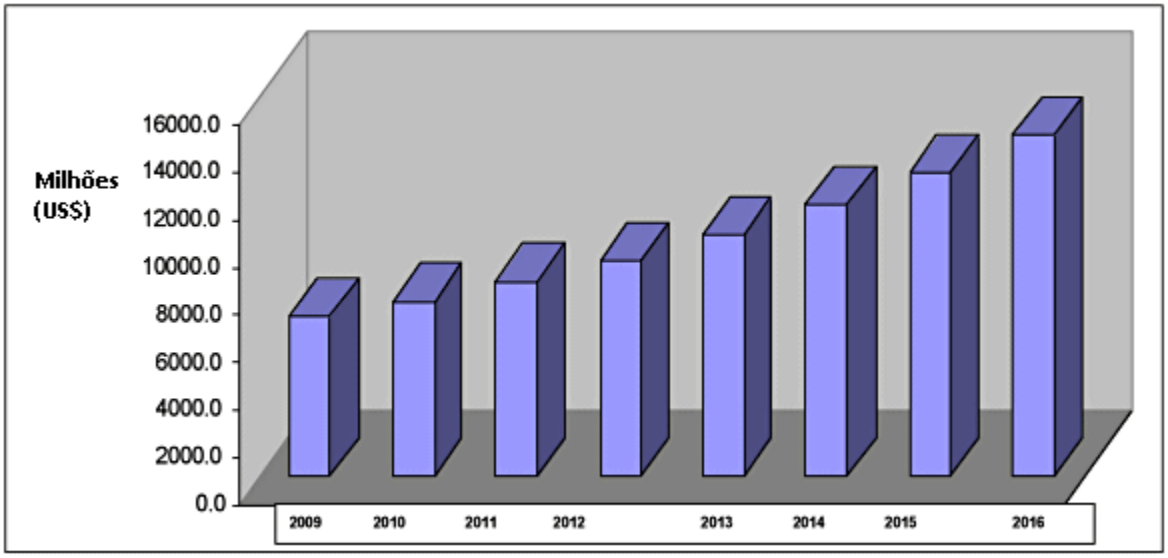

Figura 4: Expansão esperada para o mercado para biossensores que se prevê um CAGR de 11,5% de 2009 a 2016 (THUSU, 2010).

A indústria de biossensores é composta por dois tipos de participantes: empresas produtoras dos dispositivos (biossensores) (Abbott Point of Care Inc., Affinity Sensors, Neosensors Limited, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Animas Corporation, LifeScan Inc., Medtronic Diabetese e Roche Diagnostics Ltd.) e empresas

de desenvolvimento de tecnologia aplicadas a biossensores (AgaMatrix Inc., Cranfield Biotechnology Center, LifeSensors Inc., M-Biotech e Nova Biomedical).

Ainda existem desafios (Figura 5) a serem enfrentados para que haja efetiva comercialização dos biossensores, não ficando restritos a área de pesquisa e desenvolvimento. Assim, o crescente desenvolvimento de biossensores miniaturizados vem ampliar e muito o campo de aplicação e uso destes instrumentos e, futuramente, acredita-se que com os “novos elementos” e com o aperfeiçoamento dos biossensores existentes, a falta de credibilidade, que atualmente ainda existe no Brasil, segundo o Professor Doutor Lauro Kubota (Unicamp), para o uso destes instrumentos para aplicações industriais, deixe de ser um grande problema (http://www.clubedeengenharia.org.br/).

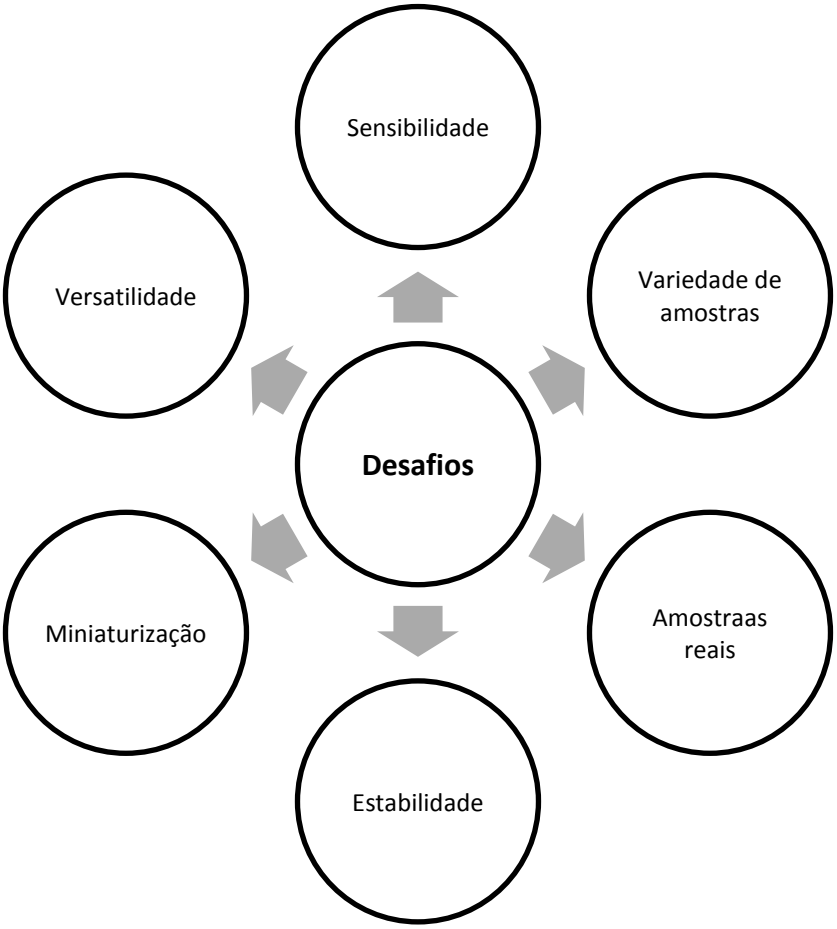

Figura 5: Esquema dos principais desafios para a comercialização dos biossensores (SCOGNAMIGLIO *et al*., 2010 modificado).

3.6 Analitos de estudo

3.6.1 Compostos fenólicos: fenol

O fenol apresenta a fórmula química, C_6H_5OH, e quando puro é um sólido cristalino, possuindo odor característico e sabor adocicado. Ele é relativamente solúvel em água (9g/100g de água). Os compostos fenólicos são alcoóis do tipo ROH, onde o R é um grupo benzênico. Os mais simples são líquidos ou sólidos de baixo ponto de fusão; a presença na sua estrutura química de ligações de hidrogênio intermoleculares faz com que apresentem pontos de ebulição bastante elevados. Eles se oxidam com muita facilidade, e se não estiverem purificados podem apresentar cor, devido simplesmente à presença de impurezas coradas.

O fenol é recuperado na indústria do carvão, além de uma quantidade considerável ser sintetizada. É utilizado extensivamente na síntese de produtos orgânicos, particularmente de resinas do tipo fenólicas. Dentre seus diversos usos, pode-se citar: na agricultura onde é utilizado como biocida e na indústria de papel e celulose, utilizado no branqueamento da polpa.

Embora suas primeiras utilizações tenham sido como anti-séptico de feridas e em cirurgias, o fenol é um veneno protoplasmático que causa danos a todo tipo de célula. Os efeitos toxicológicos agudos do fenol são predominantemente sobre o sistema nervoso central e a morte pode ocorrer após uma hora e meia de exposição. O envenenamento agudo por esse composto pode causar distúrbios gastrointestinais severos, falha no sistema circulatório, anemia hemolítica, edema pulmonar e convulsões (MANAHAN, 1994; SANTOS DE ARAUJO *et al*., 2006). Devido ao seu potencial dano à saúde humana, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA classifica os fenóis em 11° lugar, no total de 126 poluentes, na sua lista de poluentes prioritários (FERNANDES, 2005). No Brasil, a fim de evitar danos à saúde humana, o Ministério da Saúde determinou que o limite máximo permitido de fenol em água destinada ao abastecimento público é de $0{,}1 \mu g.l^{-1}$. Além disso, a Portaria 518⁄2004 do

Ministério da Saúde impõe concentrações máximas, em águas de abastecimento, para compostos derivados do fenol, tais como pentaclorofenol e 2,4,6 triclorofenol.

A origem do fenol no meio ambiente é tanto natural como xenobiótica. As fontes naturais são oriundas da queima das florestas e demais tecidos vegetais, ocorrendo, portanto, naturalmente no solo (PASSOS, 2006). Já como fontes xenobióticas, isto é, poluentes, os compostos fenólicos estão comumente presentes em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, pesticidas, detergentes e principalmente de papel. A quantidade e a qualidade dos efluentes variam muito de acordo com a tecnologia e os processos de produção empregados (ATLOW *et al*., 1984; ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; LOUZADA *et al*., 2004; TOPÇU *et al*., 2004; ARAUJO *et al*., 2006).

O contexto de crescente preocupação com a degradação ambiental levou os governos a criarem leis que limitam os níveis de descarte para um número diverso de substâncias. No Brasil, a legislação federal estabelece um limite máximo diferenciado de fenóis totais em cada tipo de corpo d'água natural, limite este estabelecido pelo capítulo II da resolução CONAMA 357/05. Além disso, em relação ao descarte de efluentes em corpos hídricos, essa resolução impõe uma concentração máxima de 0,5mg/l de fenóis (CONAMA, 2005).

Devido à rigorosa imposição legal, além de serem substâncias tóxicas e claramente nocivas à saúde humana, o monitoramento ambiental constante e *in situ* é um problema prático importante. Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos e fluorimétricos. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caras, lentas e necessitam de operadores treinados (ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; KOCHANA *et al*., 2008a). Por isso, é imprescindível que haja um crescente investimento no desenvolvimento de tecnologias capazes de realizar essa monitoração, como por exemplo, nos instrumentos biossensores. Neste contexto, a literatura tem mostrado o desenvolvimento de biossensores utilizando polifenol oxidases.

A maior parte dos trabalhos com biossensores para compostos fenólicos, baseiam-se na utilização da tirosinase comprada comercialmente (YILDIZ *et al*., 2007; KOCHANA *et al*., 2008a; FIORENTINO *et al*., 2010), e/ou extratos brutos enzimáticos de tecidos vegetais imobilizados em várias matrizes como glutaraldeído (TOPÇU *et al*., 2004), agarose, quitosana (ABDULLAH *et al*., 2006; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006), PVA (KIM *et al*., 2007; ZEJLI *et al*., 2008), poliamida, e sistemas de adsorção física em eletrodos como platina, carbono vítreo (TEMBE *et al*., 2007; SHAN *et al*., 2008), dentre outros. Em relação ao material de estudo do presente trabalho, *Agaricus bisporus*, a tirosinase presente no seu tecido, normalmente, é utilizada, como biocomponente de biossensores, em extrato bruto imobilizado (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002).

Narang *et al.* (2011) desenvolveram um biossensor baseado na imobilização covalente da polifenol oxidase em quitosana revestida por membrana de nylon para determinação de polifenóis em chá, bebidas alcoólicas e amostras de água. O instrumento apresentou tempo de resposta baixo e alta estabilidade de armazenamento (180 dias) a 4ºC. Fiorentino *et al.* (2010) desenvolveram um biossensor óptico para determinação de *o*-difenóis utilizando a enzima tirosinase fúngica imobilizada em multicamadas polieletrolíticas. A Tabela 4 mostra alguns biossensores desenvolvidos para detecção de compostos fenólicos.

Tabela 4: Alguns biossensores desenvolvidos para detecção de compostos fenólicos.

Biocomponente	Transdução	Analito	Referência
Polifenol oxidase de banana	Amperométrico	Polifenóis	NARANG *et al*., 2011
Tirosinase imobilizada em pasta de carbono imobilizada	Amperométrico	Bisfenol A e catecol	PORTACCIO *et al*., 2010
Lacase de *Trametes versicolor e Trametes hirsuta*	Amperométrico	Polifenóis em vinho	DI FUSCO *et al*., 2010
Lacase e tirosinase	Amperométrico	Polifenóis	KOCHANA *et al*., 2008b
Casca de banana (*M. cavendish*) (polifenol oxidase)	Amperométrico	Polifenóis	OZCAN & SAGIROGLU, 2010
Tirosinase imobilizada em filme de polipirrol	Potenciométrico	Catecol	AMEER & ADELOJU, 2009
Lacase imobilizada em filme de quitosana	Ótico	Catecol	ABDULLAH *et al*., 2006

3.6.2 Compostos nitrogenados: uréia

As fontes de nitrogênio nos corpos hídricos são bastante diversificadas, sendo natural ou antropogênica. Os esgotos sanitários constituem em geral a principal fonte, lançando nitrogênio orgânico devido à presença de proteínas e nitrogênio amoniacal, resultante da hidrólise sofrida pela uréia. Alguns efluentes industriais também concorrem para as descargas de nitrogênio orgânico e amoniacal nas águas, como algumas indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, de conservas alimentícias, matadouros, frigoríficos e curtumes. Em áreas agrícolas, o escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados também contribui para a presença de diversas formas de nitrogênio. Já nas áreas urbanas, as drenagens de águas pluviais associadas às deficiências do sistema de limpeza pública, constituem fonte difusa de difícil caracterização.

Em relação às fontes naturais, a atmosfera é uma fonte importante devido a diversos mecanismos: fixação biológica desempenhada por bactérias e algas; a fixação química, reação que depende da presença de luz, concorre para a presença de amônia e nitratos nas águas; as lavagens da atmosfera poluída pelas águas pluviais concorrem para a presença de partículas contendo nitrogênio orgânico, bem como para a dissolução de amônia e nitratos (CHAGAS, 2007).

Os compostos de nitrogênio são nutrientes para processos biológicos. São tidos como macronutrientes, pois, depois do carbono, o nitrogênio é o elemento exigido em maior quantidade pelas células vivas. Nas décadas recentes, por conta do incremento de atividades humanas, o aporte desses nutrientes, além do fósforo, nos corpos hídricos aumentou e excedeu em muitas vezes os níveis de base (naturais), estimulando a produção primária de matéria orgânica, superando a produção primária do oxigênio. Esse processo é denominado eutrofização.

Os nitratos são tóxicos, causando uma doença denominada metahemoglobinemia infantil que é letal para crianças (o nitrato é reduzido a nitrito na corrente sangüínea, competindo com o oxigênio livre, tornando o sangue azul). Além disso, a amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5mg/l. Além disso, a amônia provoca

consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente. Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é importante parâmetro de classificação das águas naturais e normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas (DHAWAN *et al*., 2009).

A uréia é um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo de mamíferos sendo excretada principalmente pelos rins (JÚNIOR, 1995; JHA *et al*., 2008). Cerca de 80% do nitrogênio excretado pelo organismo está sob a forma de uréia (CHAGAS, 2007). Esse composto é utilizado entre outras aplicações, como fertilizante e como fonte de nitrogênio para ração animal.

A determinação de uréia é de grande importância para áreas como análise clinica, indústria alimentícia, cosméticos e avaliação ambiental. Na área clínica, a uréia é quantificada em testes patológicos de sangue e urina; na indústria alimentícia, analisa-se uréia em leite, por exemplo, já que por se tratar de um constituinte não natural, sua presença pode significar adulteração do mesmo (VERMA & SINGH, 2003); na área de cosméticos, a uréia é usada como matéria-prima de cosméticos e na avaliação ambiental, a grande quantidade de uréia em efluentes e corpos hídricos pode favorecer o processo de eutrofização.

A sua quantificação pode ser feita por diversos métodos, dentre eles: método manométrico descrito por Van Slyke & Hiller (1933 *apud* JÚNIOR, 1995) que é baseado em medidas de reações que consomem ou produzem gases; é considerado muito preciso com erro de aproximadamente 1%, porém não é usado para determinação de pequenas concentrações de uréia; método espectrofotométrico, onde a amônia formada na degradação enzimática da uréia é geralmente quantificada pelo reagente de Nessler (APHA, 1992) ou pela reação de Berthelot; método volumétrico descrito inicialmente por Folin (1913 *apud* JÚNIOR, 1995), consiste na conversão de uréia em carbonato de amônio, através da urease, e uma quantificação antes e depois da conversão, por meio de titulação ácido-base usando alaranjado de metila como indicador; e método potenciométrico, onde o aumento na concentração de íons amônio, íons bicarbonato e íons hidroxiIa via degradação da uréia, pode ser detectado, respectivamente, ou por eletrodos íon-seletivos a amônio ou por eletrodos sensores a

gases (gás carbônico ou amônia ou ainda por eletrodos de membrana de vidro (medidas de pH). Em todos os casos há uma relação logarítmica entre o sinal obtido e a concentração de uréia.

Em relação aos biossensores para determinação de uréia, o primeiro dispositivo foi construído por Guilbault & Montalvo (1969) e consistiu da imobilização da urease em gel de poliacrilamida na superfície de um eletrodo íon-seletivo a amônio. Ademais, Arnold & Glazier (1984), em 1984, desenvolveram um biossensor potenciométrico para uréia imobilizando o extrato do feijão de porco na superfície de um eletrodo gás sensível a amônia. Desde então, vários instrumentos foram desenvolvidos e a Tabela 5 mostra alguns biossensores para quantificação de uréia em diferentes matrizes e áreas de aplicação.

Tabela 5: Biossensores para quantificação de uréia.

Biocomponente	Transdução	Área de aplicação	Referência
Urease imobilizada em gelatina	Potenciométrico	Análise clínica	PANPAE *et al*., 2006
Urease imobilizada em polímero eletrosintetizado	Potenciométrico	Química analítica (solução padrão)	CHIRIZZI & MALITESTA, 2011
Urease imobilizada em filme lipídico	Ótico	Indústria de laticínios (leite)	NIKOLELI *et al*., 2010
Urease imobilizada em matriz polimérica	Potenciométrico	Indústria de laticínios (leite)	TRIVEDI *et al*., 2009
Urease imobilizada por dois métodos: eletropolimerização de pirrol e *cross-linking* em filme de glutaraldeído e albumina	Condutimétrico	Química analítica (solução padrão)	HEDAYATOLLAH *et al*., 2004
Urease imobilizada em filme de azul de toluidina eletropolimerizado	Amperométrico	Química analítica (solução padrão)	VOSTIAR *et al*., 2002

3.7 Biocomponentes de estudo e suas enzimas

3.7.1 Macrofungo *Agaricus bisporus*

O Reino Fungi é um grupo bastante heterogêneo formado por seres eucarióticos, podendo se apresentar sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, formando um micélio verdadeiro (SMIDERLE, 2008). Seus representantes são encontrados em todos os ambientes do planeta. São importantes decompositores e parasitas. Em relação à nutrição, são heterotróficos e se alimentam pela secreção de exoenzimas no substrato ao redor (RAVEN *et al.,* 2001).

Esse Reino é dividido em grupos menores, onde o filo Basidiomycota agrupa os seus representantes mais desenvolvidos. Os representantes desse filo, comumente conhecidos como basidiomicetos, constituem um grupo bastante diverso, sendo os cogumelos e orelhas-de-pau, as formas mais conhecidas. Eles apresentam, em sua maioria, uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (SMIDERLE, 2008).

A importância atribuída a esse grupo está relacionada à utilização de seus representantes na alimentação e medicina popular desde tempos remotos (WASSER, 2002). O maior número das espécies comestíveis do filo Basidiomycota é enquadrado na ordem Agaricales, na qual há duas principais famílias: Boletaceae e Agaricaceae (SANTOS, 2005).

A familiarização com o consumo de basidiomicetos se tornou evidente quando se iniciou o cultivo de espécies de *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach (cogumelo champignon de Paris). O cultivo deste macrofungo foi iniciado na França casualmente. Em 1865, o champignon foi introduzido na América e passou a ser cultivado em instalações semelhantes a fábricas (estações de cultivo). No Brasil, o cultivo foi introduzido em 1953 por imigrantes chineses na cidade de Mogi das Cruzes-SP e italianos em Atibaia - São Paulo (ROSA, 2007). Atualmente, é cultivado, principalmente, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil e é uma fonte rentável promissora

dentro do agronegócio. O champignon de Paris é nutritivo, sendo rico em proteínas (2,69%), cálcio, ferro, cobre, zinco, vitamina C, folato e dezoito aminoácidos.

Outra importância atribuída aos basidiomicetos refere-se à capacidade desses fungos em degradar celulose e lignina. Materiais orgânicos desperdiçados, como subprodutos agrícolas e resíduos animais, são utilizados como substrato para o cultivo de fungos, produzindo alimentos de boa qualidade, podendo ser consumidos pelos humanos. Dessa maneira, os nutrientes são reciclados e retornam para a cadeia alimentar.

Este macrofungo tem sido utilizado como fonte da tirosinase para o desenvolvimento de biossensores para compostos fenólicos. Além desse analito, o tecido fúngico de *A. bisporus* também tem sido utilizado para deteção de demais compostos, como tiouréia (SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2010), álcool etílico (AKYILMAZ & DINÇKAYA, 2000; HUANG & WU, 2006), ácido benzóico (SEZGINTÜRK *et al.*, 2005). Neste último caso, Sezgintürk *et al.* (2005) desenvolveram um biossensor para detecção de ácido benzóico. Utilizaram a tirosinase do tecido de *Agaricus bisporus* homogeneizado imobilizada em gelatina e glutaraldeído na proporção de 44,25mg/cm^2, 5,9mg/cm^2 e 2,5%, respectivamente sob eletrodo de oxigênio do tipo Clark.

3.7.1.1 Tirosinase

As polifenol oxidases formam uma família de enzimas oxidorredutases capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, reagindo com o oxigênio sem a necessidade de co-substratos. Ela é dividida em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURÁN & ESPOSITO, 2000).

As tirosinases (polifenol oxidase; monofenol monoxigenase, catecol oxidase, EC 1.14.18.1) são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes ao longo de toda a escala filogenética desde as simples bactérias até os grandes mamíferos (FENOLL *et al.*, 2001). Estão diretamente ligadas à fase proximal na cadeia da melanogênese e são responsáveis pelos fenômenos de pigmentação em mamíferos e

de escurecimento em cortes vegetais (VAN GELDER *et al.*, 1997). Isto é, essa enzima catalisa a oxidação da L-tirosina para seu correspondente dopaquinona. A polimerização do último resulta na formação da melanina (FARIA *et al*., 2007).

Vários trabalhos já foram publicados utilizando tirosinase obtida a partir de diferentes fontes - cogumelos, vegetais, frutas, legumes, além de epiderme de pós tumores e *Neurospora crassa* (ROS *et al.,* 1994; SEO *et al*., 2003; VIEIRA *et al*., 2003; KOCHANA *et al*., 2008a). Através desses estudos, observou-se que, independentemente da fonte, as tirosinases mantinham suas características funcionais e apresentavam estruturas semelhantes. O primeiro trabalho de investigação bioquímica com a tirosinase data de 1895, sendo realizado com o cogumelo *Russula nigrans,* cujos cortes expostos ao ar tornavam-se vermelhos e depois negros (SANCHEZ-FERRER *et al.,* 1995; FARIA, 2008). Em plantas e fungos, as tirosinases ocorrem em várias isoformas: formas imaturas, formas maturas e latentes e formas ativas. Sabe-se que existem estas isoformas, no entanto, não foi estabelecida a relação entre a descrição bioquímica e as características cinéticas destas (WICHERS *et al*., 1996). Segundo van Gelder *et al*. (1997), em cogumelos, aparentemente, 99% do total desta enzima estão presentes sob a sua forma latente. Além disso, Bevilaqua (2000) e Silva (2009) observaram que o envelhecimento do cogumelo deve ser responsável pela ativação destas formas latentes da tirosinase.

Assim, como ocorre com outras tirosinases macrofúngicas, a tirosinase de *Agaricus bisporus* é intracelular. Estudos sobre a estrutura da tirosinase desse cogumelo sugerem que a enzima possui um peso molecular de 110-120kDa e ocorre como um composto tetrâmero de duas subunidades de 43-48kDa (H) e duas subunidades de 13,4kDa (L), assumindo uma estrutura quaternária H_2L_2 (WICHERS *et al.,* 1996). Seu ponto isoelétrico (pI) situa-se em uma faixa de 4,7-5,0 e seu pH ótimo de atuação está entre 6 e 7.

O grupo prostético da enzima possui estrutura semelhante ao da hemocianina, contendo dois átomos de cobre e sendo composto por dois sítios de ligação para aromáticos e um sítio de ligação para oxigênio que está relacionado aos átomos metálicos (BEVILAQUA, 2000).

O mecanismo cinético da tirosinase é bastante incomum. Ela, além de possuir

dois tipos de atividade catalítica distintos (mono e difenolase), apresenta uma fase lag na reação com monofenóis. Vários fatores afetam o período desta fase: concentração de substrato, concentração de enzima, pH e a fonte da enzima. A presença de quantidades catalíticas de difenóis ou íons metálicos de transição (principalmente Fe^{+2}, mas também Cd^{+2}, Ni^{+2}, Co^{+2} e Zn^{+2}) pode acabar com esta fase (SANCHEZ-FERRER *et al.,* 1995). No entanto, em relação à cinética da segunda reação, oxidação de difenóis, pode-se dizer que segue a cinética de Michaelis e Menten (FARIA, 2008).

A tirosinase utiliza oxigênio molecular para oxidar fenóis catalisando duas reações distintas: a orto-hidroxilação de monofenóis (atividade monofenolase, creolase) gerando catecóis e a oxidação de orto-difenóis a orto-quinonas (atividade difenolase, catecolase) (FENOLL *et al.*, 2001; ROSATTO *et al.,* 2001; CESTARI *et al*., 2002). As duas reações estão esquematizadas, de forma simplificada, na Figura 6.

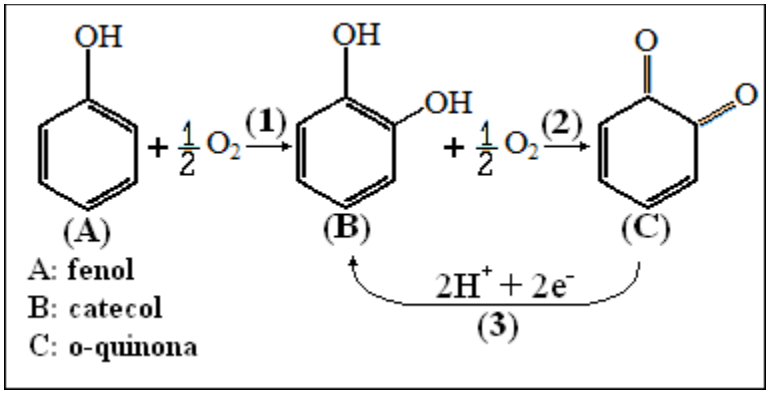

Figura 6: Esquema simplificado da reação catalisada pela enzima tirosinase, (1) representa a atividade cresolase e (2) a atividade catecolase (adaptado de ZHANG *et al*., 2001).

3.7.1.1.1 Aplicações da Tirosinase de Cogumelos

Os primeiros estudos sobre a enzima tirosinase presente em cogumelos foram motivados pelo desejo de entender o mecanismo de escurecimento enzimático de cogumelos ou dos vegetais, na presença de ar, e evitá-lo (fato que reduz o valor de mercado do produto). No entanto, com o passar dos anos, o foco de estudo dessa enzima tem se voltado para seu uso em aplicações biotecnológicas e ambientais. As mais importantes aplicações da tirosinase são: o seu uso na biossíntese de L-DOPA**;** a

detecção e a quantificação de compostos fenólicos em águas**;** a remoção de compostos fenólicos de águas residuárias e a formação de redes de proteínas ligadas (c*ross-linked protein*) (FARIA, 2008).

Como componente biológico de biossensores, as enzimas são as mais empregadas, sendo a tirosinase uma delas. A tirosinase presente no cogumelo *Agaricus bisporus*, material de estudo desse trabalho, tem sido estudada de diversas formas: extrato bruto (ATLOW *et al*., 1984; SEZGINTÛRK *et al*., 2005), purificada (PAPA *et al*., 1994; WICHERS *et al*., 1996) e preparação comercial (ATLOW *et al*., 1984; COOKSEY *et al*., 1997; YILDIZ *et al*., 2007; SHAN *et al*., 2008).

Além disso, van Leeuwen & Wichers (1999) analisaram a distribuição da atividade tirosinásica total e quantidade de tirosinase ativa no corpo de frutificação de *A. bisporus* ao longo das partes principais (píleo, estipe, lamelas, anel e volva) do macrofungo, concluindo não haver variação significativa entre as partes.

3.7.2 Feijão de porco (*Canavalia ensiformis*)

O feijão de porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) é uma leguminosa cultivada em regiões tropicais e equatoriais que apresenta crescimento anual ou bianual. O valor principal dessa espécie consiste na sua notável rusticidade e adaptação aos solos de baixa fertilidade com a propriedade de imediatamente enriquecê-los. É recomendada para adubação verde, no começo da floração, aproximadamente três meses após o plantio. Estudos fitoquímicos mostram que o feijão de porco apresenta uma série de compostos, como: saponinas, terpenóides, alcalóides e taninos. Além disso, extratos de diversas regiões das plantas têm apresentado potencial atividade herbicida e fungicida (SOUZA FILHO, 2002).

Na literatura, observam-se diversos trabalhos que utilizam esse tecido vegetal como fonte da enzima urease com aplicações em diversas áreas, dentre elas, a construção de biossensores para uréia (PANPAE *et al*., 2006).

3.7.2.1 Urease

3.7.2.1.1 Características Gerais

Ureases (uréia amidohidrolase E.C.3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes (DIXON *et al*., 1975) que catalisam a hidrólise da uréia a amônia e carbamato, que espontaneamente se decompõe em dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia (Figura 7). Esta enzima demonstra um alto grau de especificidade para uréia e derivados como hidroxi e dihidroxiuréia, além de algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico (POSTAL, 2008).

$$H_2N - CO - NH_2 + H_2O \xrightarrow{urease} NH_3 + H_2N - CO - OH \text{ (1)}$$
$$H_2N - CO - OH + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2CO_3 \text{ (2)}$$
$$H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \text{ (3)}$$
$$2NH_3 + 2H_2O \leftrightarrow 2NH_4^+ + 2OH^- \text{ (4)}$$

Figura 7: Esquema de hidrólise da uréia catalisada pela enzima urease, (1) reação a clivagem da uréia, pela urease, produzindo uma molécula de amônia e uma de ácido carbâmico; (2) a decomposição espontânea do ácido carbâmico em amônia e ácido carbônico; (3) a hidrólise do ácido carbônico, que se tornam protonadas, gerando íons amônio e hidroxila (4) (FEDER, 2008).

Ureases são encontradas em bactérias, fungos e tecidos vegetais, sendo mais abundantes em sementes de leguminosas (exemplo: feijão-de-soja - *Soja hyspida*) e curcubitáceas (exemplo: abóbora moranga - *Cucurbita maxima*) (POLACCO & HOLLAND, 1993). Apesar dessa abundância, pouco se sabe sobre a função da urease nas plantas. Acredita-se que suas funções estejam relacionadas ao reciclo do nitrogênio (SIRKO & BRODZIK, 2000) e, em combinação com a arginase, à utilização das reservas protéicas da semente durante a germinação (FOLLMER, 2008).

Ureases apresentam alta homologia e mecanismos catalíticos similares apesar de diferirem na estrutura quaternária. Enquanto as enzimas vegetais e fúngicas se comportam como trímeros ou hexâmeros de uma subunidade de 90kDA, as bacterianas são multímeros de complexos formados por duas ou três subunidades (GUERRA, 2007).

3.7.2.1.2 Urease de *Canavalia ensiformis*

As sementes de *C. ensiformis* são fontes de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a urease. Esta foi a primeira enzima a ser isolada na forma pura e cristalizada por Sumner em 1926 (SUMNER, 1926). Em 1913, Marshal (1913 *apud* POSTAL, 2008) foi o primeiro pesquisador a utilizar urease extraída de feijão de porco.

A urease do feijão de porco possui uma cadeia polipeptídica única de 840 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 90,770 kDa. A forma mínima da proteína que expressa atividade enzimática (ativa) é trimérica; no entanto, a forma nativa é um hexâmero (ZERNER, 1991). A enzima possui dois átomos de níquel no seu sítio ativo, sendo cada um coordenado por dois resíduos de histidina. Além disso, em 1981, uma proteína neurotóxica foi isolada e denominada canatoxina que foi caracterizada como uma isoforma minoritária da urease da semente de *C. ensiformis* (FOLLMER *et al*., 2001).

3.8 Transdutores utilizados

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais freqüentemente citados na literatura.

3.8.1 Eletrodo de oxigênio

A amperometria é a técnica eletroquímica geralmente aplicada em biossensores disponíveis comercialmente. É uma técnica eletroquímica que tira vantagem do fato de certas espécies químicas serem oxidadas ou reduzidas em eletrodos de metais inertes quando se aplica um potencial constante. Essas espécies químicas são conhecidas como substâncias eletroativas. Três eletrodos compreendem uma célula

amperométrica. O eletrodo de trabalho é geralmente constituído de um metal como platina, carbono vítreo ou ouro (D'ORAZIO, 2003).

Em 1962, o professor Liland Clark desenvolveu o primeiro sensor enzimático para glicose (eletrodo de Clark) que consistia de um sistema de dois eletrodos separados da solução da amostra por uma membrana gás permeável. Assim sendo, atualmente, os sensores de gases amperométricos, representados pelo sensor de oxigênio tipo Clark, são utilizados para determinação de oxigênio em uma variedade de ambientes líquidos (PORRAS, 1996).

O eletrodo de oxigênio consiste de um catodo e de um anodo condutivamente conectados por um eletrólito (solução concentrada de KCl). Uma tensão adequada de polarização entre o catodo e o anodo reduz o oxigênio no catodo. A tensão é selecionada de modo que o oxigênio seja completamente reduzido, sendo que os demais gases não são afetados. A tensão ideal para o sistema Pt/Ag/AgCl encontra-se entre –500 e –750mV.

Reação no catodo: $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$

Reação no anodo: $4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-$

Tais reações químicas resultam em uma corrente elétrica que é proporcional à pressão parcial de oxigênio (pO_2). O eletrodo de oxigênio consome o oxigênio que é continuamente extraído da solução. A quantidade de oxigênio dissolvido e a magnitude da corrente do eletrodo são influenciadas pelos seguintes parâmetros: pressão parcial do oxigênio da solução; material e espessura da membrana; tamanho do catodo; tensão de polarização; temperatura e condições de vazão e a viscosidade da solução.

Na literatura, existem diversos trabalhos que descrevem o desenvolvimento de biossensores que utilizam o eletrodo de oxigênio como transdutor na detecção e monitoração de diversos analitos, como: glicose, compostos fenólicos (TIMUR *et al*., 2004) e etanol (AKYILMAZ & DINCKAYA, 2000; HUANG & WU, 2006).

3.8.2 Eletrodo íon-seletivo a amônio

Os métodos eletroanalíticos estão entre as técnicas mais populares usadas em química analítica, dentre elas a potenciometria. Esta é uma técnica simples e bem conhecida, tendo sido inicialmente empregada na medida de pH. O fundamento da medida potenciométrica reside na medida do potencial da célula, isto é, a diferença de potencial entre os dois eletrodos – o indicador e o de referência – em uma célula eletroquímica em condições de corrente desprezível, visando obter informações sobre a composição da solução de interesse. O eletrodo de referência deve manter um potencial constante e estável em função do tempo, independente das propriedades da solução no qual está imerso. O eletrodo indicador geralmente interage com uma dada espécie, desenvolvendo um potencial de interface, que reflete a sua atividade (concentração). As medidas potenciométricas são feitas, geralmente, por eletrodos íon-seletivos (SILVA, 2000; TORRES, 2001; RIBEIRO, 2006).

Os eletrodos íon-seletivos são sensores eletroquímicos que monitoram atividades iônicas em solução. Uma vez que o potencial de um único eletrodo não pode ser medido, o potencial do eletrodo íon-seletivo deve ser substituído pela força eletromotriz gerada por uma célula galvânica, consistindo em um eletrodo indicador e um de referência na solução de interesse. Tais eletrodos são relativamente livres de interferência e proporcionam medições rápidas e convenientes para determinações quantitativas de cátions e ânions (SILVA, 2000; TORRES, 2001).

Nesse contexto, o eletrodo íon-seletivo a amônio utiliza uma membrana hidrofóbica permeável a gás para separar a solução de estudo da solução de enchimento do eletrodo. A amônia dissolvida na solução se difunde através da membrana até que sua pressão parcial seja a mesma em ambos os lados da membrana. Em dada amostra, a pressão parcial de amônia é proporcional a sua concentração.

A solução de enchimento do eletrodo contém cloreto de amônio em quantidade suficientemente elevada para que a concentração de íons de amônio possa ser considerada fixa. Portanto, o potencial do eletrodo indicador em relação ao de referência interno é descrito pela Equação de Nernst (Equação 1):

$$E = E_0 - S.log[OH^-] \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

E = medida do potencial do eletrodo;

E_0 = potencial de referência;

$[OH^-]$ = concentração de hidroxila na solução;

S = variação (*slope)* do eletrodo.

CAPÍTULO 4 TRABALHOS ANTERIORES

A presente tese é resultado dos ensaios realizados durante o Doutorado, onde neste capítulo serão apresentados os aspectos gerais e os principais resultados encontrados nos dois trabalhos que foram utilizados como preliminares para o desenvolvimento dessa Tese. A seção 4.1 se refere ao trabalho realizado durante o desenvolvimento do Mestrado (SILVA, 2009), defendido ao longo do Doutorado, e a seção 4.2 aos trabalhos realizados por Pinto (PINTO *et al,* 2007; 2008; 2009) no Laboratório de Sensores Biológicos.

4.1 Utilização do tecido fúngico de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol

A determinação de fenóis é de extrema importância ambiental, visto que os fenóis são poluentes tóxicos encontrados em diversos efluentes industriais. Análises de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Entretanto, estes não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caros, lentos e necessitam de operadores treinados. A fim de viabilizar uma metodologia analítica que permita tal monitoração, o trabalho de Mestrado se propôs a utilizar o tecido fúngico íntegro de *Agaricus bisporus*, dada sua atividade tirosinásica, fazendo o papel de biocomponente de um biossensor para detecção de fenóis e tendo o eletrodo de oxigênio como transdutor (Figura 8). A tirosinase é uma polifenol oxidase que tem capacidade de transformar fenóis em produtos menos solúveis em água, as quinonas.

A metodologia experimental adotada visou a escolha do melhor tamanho e forma do tecido fúngico, temperatura e pH para a remoção de fenol em solução padrão, assim como, foi analisada a possível adsorção do analito no tecido, a influência do envelhecimento do tecido fúngico na remoção de fenol e a quantificação da concentração de fenol presente no próprio tecido ainda sem utilização. Posteriormente, para a montagem preliminar do biossensor, propriamente dito, o eletrodo de oxigênio

foi utilizado como transdutor, investigando a relação linear entre a variação de oxigênio dissolvido e a concentração de fenol da solução aquosa. Para a calibração do instrumento, estudou-se o tempo de reação e a quantidade de tecido necessários para promover respostas confiáveis e com menor erro entre as análises. As influências da saturação da solução com ar antes da leitura e a lavagem do eletrodo também foram analisadas.

Resumidamente, os resultados mostraram que não houve adsorção de fenol no tecido fúngico e que este apresenta fenol em sua composição (aproximadamente 0,306 ppm). Além disso, as melhores condições de atuação da enzima tirosinase para remoção de fenol foram: cogumelo cortado em cubos de 1,0 cm de lado, pH 8,0 e faixa de temperatura de 35ºC-45ºC. Já na confecção do sistema biossensor, o tempo de reação escolhido foi de 1 minuto e a quantidade de 5g do biocomponente. Porém, ao contrário do esperado, não houve uma relação linear entre a variação de oxigênio dissolvido e a concentração de fenol da solução padrão utilizando esta configuração do biossensor. Além disso, observou-se que o procedimento de lavagem do eletrodo de oxigênio entre as análises não interferiu positivamente na resposta. No entanto, a etapa de borbulhamento de ar, por 5 minutos antes da leitura das soluções padrão pelo eletrodo de oxigênio, promoveu menor variação entre as leituras do “teste em branco”, isto é, quando não se utilizou tecido fúngico.

Como a configuração testada neste trabalho não apresentou resultados coerentes, várias sugestões foram oferecidas, dentre elas, testar a utilização do biocomponente em um outra forma, a fim de minimizar os efeitos da deposição das quinonas nos seus interstícios, como por exemplo, uso do tecido fúngico liofilizado.

O trabalho desenvolvido durante o Mestrado permitiu a elaboração de diversos trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais, a publicação de dois artigos científicos no periódico *Environmental Technology*, intitulados “*Agaricus bisporus* as a source of tyrosinase for phenol detection for future biosensor development” (SILVA *et al*., 2010) e “An amperometric biosensor development for phenol detection” (SILVA *et al*., 2011a), além de um artigo no periódico *Chemical Engineering Transactions* denominado de “Amperometric Biosensor for Phenol Determination” (SILVA *et al*., 2011b).

Figura 8: Fotografia do sistema biossensor inicialmente montado (eletrodo de oxigênio e tecido fúngico) durante o desenvolvimento preliminar do sistema.

4.2 Uso do tecido vegetal para o desenvolvimento de um biossensor de uréia

A determinação de uréia é de grande importância para diversas áreas como análise clinica, indústria alimentícia, cosméticos e avaliação ambiental. Muitos métodos são utilizados na sua determinação, incluindo espectrofotometria (FUHRMANN *et al*., 1992), fluorimetria (MANA & SPOHN, 1996), potenciometria (EGGENSTEIN *et al.*, 1999) e amperometria (BERTOCCHI *et al*, 1996). Porém, alguns desses métodos precisam de um pré-tratamento da amostra ou são inapropriados para um monitoramento *in situ*. Por esse motivo, tem crescido o interesse no desenvolvimento de biossensores, que são dispositivos capazes de medir substâncias de forma segura, rápida e barata.

Nesse contexto, os trabalhos de Pinto *et al.* (2007, 2008, 2009) visaram estudar a aplicação de um biossensor de tecido de feijão, fonte da enzima urease, imobilizado em membrana de nylon acoplada a um eletrodo de amônia sob diferentes condições para monitoração de uréia (Figura 9). Alguns parâmetros foram analisados visando

otimizar o funcionamento do biossensor, dentre eles: a massa de feijão (0,1 a 0,5g), a faixa de temperatura (20 a 40ºC), o valor de pH (6,0 a 8,0), o tamanho de poro e o tipo de membrana de nylon a ser empregada. Além disso, os parâmetros cinéticos da urease presente no tecido de feijão imobilizada em membrana de nylon com o agente químico glutaraldeído foram analisados.

Através dos resultados, viu-se que a massa de 0,2g foi a que forneceu maior sensibilidade de medição e, o pH e a temperatura ideais foram de 6,0 e 25ºC, respectivamente. Os valores de $K_{m\ app}$ e $V_{max\ app}$ para a enzima imobilizada foram 411,39mM e 31,26mM/min, respectivamente. No entanto, problemas de transferência de massa decorrentes da proximidade do biocomponente imobilizado e a sensibilidade da membrana do transdutor, resultaram em uma conversão menos efetiva de uréia à amônia, o que sugeriu ser necessário desenvolver outra configuração para a construção do biossensor enzimático.

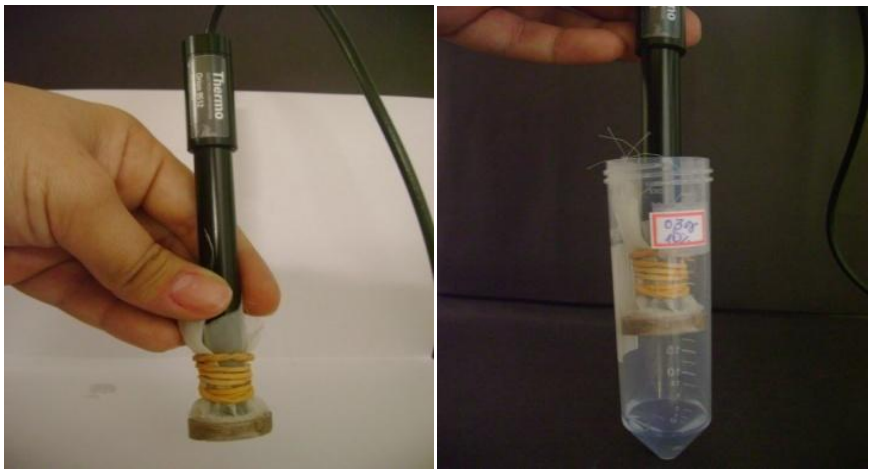

Figura 9: Biossensor potenciométrico desenvolvido por Pinto *et al*. (2009) para quantificação de uréia.

Uma parte dos resultados de Pinto *et al*. (2007, 2008, 2009) unida a alguns resultados da presente tese foram responsáveis pela geração do capítulo denominado “Development of potentiometric urea biosensor based on *Canavalia ensiformis* urease” do livro *Biosensors - Emerging Materials and Applications*, ISBN 978-953-307-328-6 (SILVA *et al*., 2011c).

CAPÍTULO 5 MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo, são apresentados os principais materiais e a descrição dos procedimentos utilizados durante o desenvolvimento dessa Tese que visou dar continuidade aos trabalhos citados no Capitulo 4, buscando a forma otimizada para a configuração dos biossensores eletroquímicos para uréia e fenol, e sua aplicação em amostras ambientais reais.

5.1 Equipamentos

Durante o presente trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica (FA-2104N, Bioprecisa); estufa microprocessada de secagem (Quimis); placa de aquecimento e agitação (Quimis); agitador orbital (Thomas); espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800); bomba a vácuo (Motores Elétricos Brasil S.A); bomba dosadora peristáltica (Milan Equipamentos Ltda); trituradores elétricos (Arno e Croydon Industrial Ltda); pHmetro microprocessado (Quimis); centrífuga (Excelsa 2); mini aerador (Aqualife 200); oxímetro (medidor de OD/O_2/Saturação DM-4P Digimed); eletrodo íon-seletivo a amônio (Orion Ammonia Electrode 95-12 Thermo); liofilizador Enterprise 1 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda); ultrafreezer (modelo CL120-80V, ColdLab); seladora a vácuo (Zip Fun Kitchen); banho maria (Quimis).

5.2 Quantificação de proteína: Método de Lowry

A determinação de proteína foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al*., 1951; ZAIA *et al*., 1998). O método apresenta limite de detecção de 0,7mg.l^{-1} e leituras de absorbância em comprimento de onda 750nm. Neste método, ocorre redução dos constituintes ativos do reagente Folin-fenol por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos que contribuem com quatro elétrons ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação

do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. Após a reação supracitada ocorrer, a solução desenvolve uma cor medida em um espectrofotômetro e correlacionada com uma curva padrão (Figura 10), obtendo-se a concentração de proteínas da amostra analisada.

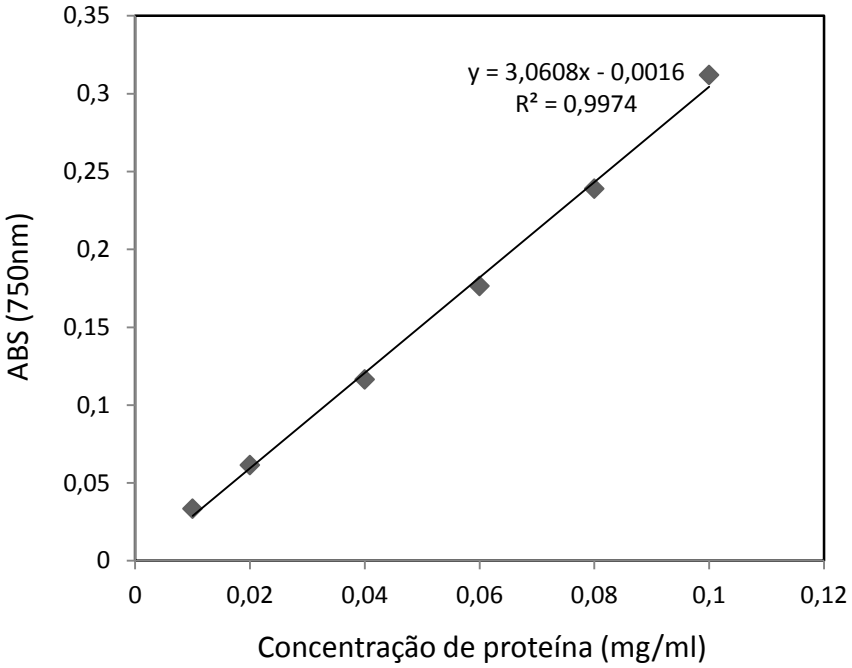

Figura 10: Curva padrão de quantificação de proteína obtida pelo método de Lowry usando albumina bovina como padrão.

5.3 Quantificação de umidade dos biocomponentes

A umidade dos biocomponentes (pó do feijão de porco e cubos de 1cm de lado de cogumelo champignon de Paris *in natura*) foi determinada, em triplicata, pela secagem em estufa a 105ºC até peso constante. A fim de se obter o valor percentual de umidade, subtraiu-se o valor do peso final (Vf) obtido do valor inicial (Vi) e dividiu-se pelo valor inicial, multiplicando por 100, através da Equação 2.

$$\frac{Vi - Vf}{Vi}\ x\ 100 = Umidade\ (\%) \qquad \text{(Equação 2)}$$

5.4 Ensaios com o tecido vegetal de *Canavalia ensiformis* visando o desenvolvimento do biossensor potenciométrico para uréia

5.4.1 Tecido vegetal de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*)

O material de estudo, feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) (Figura 11), foi doado pela empresa Sementes na Terra & Produtores Associados através da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Trata-se de um tecido rico na enzima urease (EC 3.5.1.5) (LUCA & REIS, 2001) que é responsável por catalisar a hidrólise da uréia, formando íons amônio (SILVA *et al.*, 2005).

Figura 11: Foto do feijão de porco na sua forma *in natura*.

5.4.2 Preparação do biocomponente

5.4.2.1 Moagem e peneiramento

Os grãos de feijão de porco foram descascados manualmente usando luvas e uma lâmina de corte e, posteriormente triturados a seco em um triturador elétrico. Em seguida, peneirados em uma peneira, de uso doméstico, de nylon, separando o pó obtido com granulometria menor ou igual a 3mm. O material, na forma de pó, foi

estocado em geladeira a 4ºC em recipiente hermeticamente vedado, quando não utilizado no processo de imobilização para uso no biossensor.

5.4.2.2 Imobilização em tela de nylon comercial

A imobilização realizada foi baseada no trabalho de Júnior (1995). Esta consistiu na utilização de uma tela de nylon comercial (Figura 12), 0,2g de tecido vegetal triturado (pó) e solução comercial de glutaraldeído 12,5%.

Figura 12: Foto de um pedaço da tela de nylon comercial utilizada no processo de imobilização.

A Figura 13 mostra a sequência de passos da imobilização, onde a massa de feijão (0,2g) foi depositada sobre uma tela de nylon (passo 1) e foram adicionados 200µl de uma solução contendo 100µl da solução de glutaraldeído e 300µl de solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 (passos 2 e 3). Revestiu-se a massa de feijão com outra tela de nylon (passos 4 e 5), ficando em repouso por 20 minutos. Posteriormente, foi imersa em água destilada por 20 minutos e, em seguida, em tampão fosfato de sódio pH 7,0 pelo mesmo tempo. O biocomponente imobilizado (passo 6) foi utilizado depois de armazenado por 24h em geladeira a 4ºC.

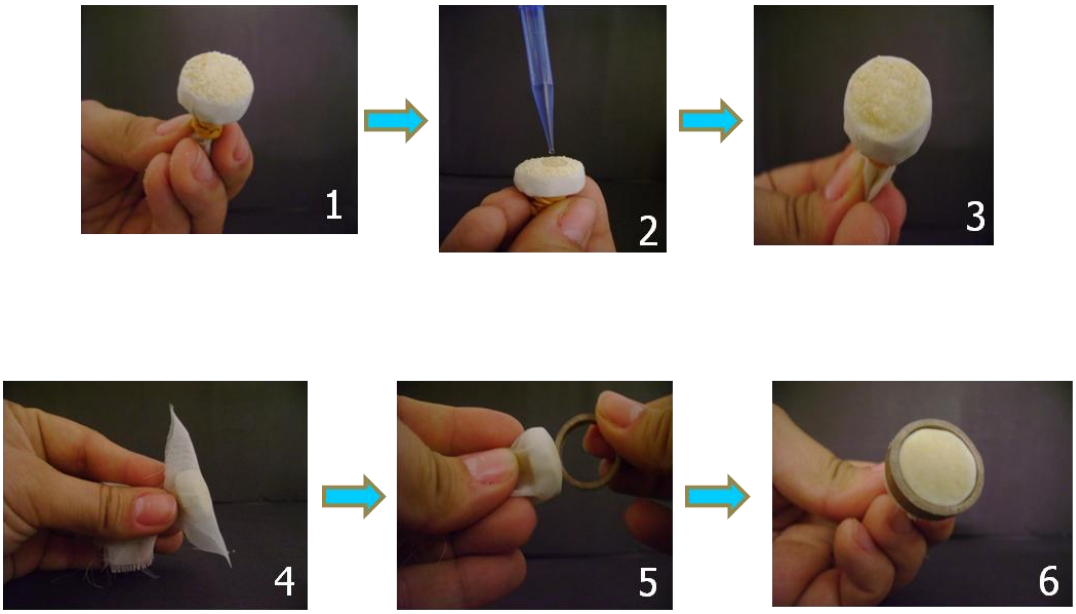

Figura 13: Sequência de passos do processo de imobilização do pó de feijão de porco.

Inicialmente, quando não estava em uso, o tecido vegetal imobilizado foi armazenado em geladeira, a 4°C, estando imerso em solução tampão fosfato de sódio pH 7,0, a fim de evitar o ressecamento, e consequentemente, a possível inativação da enzima presente no tecido de feijão de porco. Posteriormente, foram utilizadas as melhores condições de armazenamento encontradas e testadas durante o presente trabalho.

O reagente utilizado na imobilização, glutaraldeído, promove a ligação das moléculas entre si por meio de pontes intermoleculares, proporcionando a formação de uma ampla rede tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligação covalente entre as estruturas de superfície do tecido vegetal. Trata-se de um reagente polifuncional bastante utilizado devido ao seu baixo custo e baixa toxicidade quando comparado com os demais. Além disso, outra vantagem, é que as ligações formadas entre o tecido e o glutaraldeído são estáveis frente aos efeitos ambientais, como pH, temperatura, força iônica e solvente (JUNIOR, 1995; FOLLY, 1996; SALGADO, 1997, 2001).

5.4.3 Medida da atividade enzimática da urease do tecido vegetal

A medida da atividade ureásica foi baseada no método alcalimétrico descrito por Kistiakowsky & Shaw (1953 *apud* COMERLATO, 1995). Estes autores observaram que o pH inicialmente neutro de uma solução não tamponada de uréia-urease rapidamente aumenta para pH 9,0 e, então, permanece constante. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1µmol de amônia por minuto.

Assim, inicialmente, utilizou-se como substrato uma solução de uréia 20ppm diluída em tampão Tris/HCl 0,1M pH 9,0. No entanto, devido ao fato do uso do tampão fosfato de sódio pH 6,0 como diluente das soluções de uréia usadas no biossensor, e, aos resultados semelhantes encontrados quando as soluções tampão foram utilizadas, optou-se por utilizar como substrato uma solução de uréia 20ppm diluída em tampão fosfato de sódio pH 6,0.

A 11ml de água destilada, adicionou-se 1ml de substrato e colocou-se a solução em contato com o tecido vegetal imobilizado ou em pó *in natura* (0,2g) por 5 minutos sob baixa agitação constante a temperatura ambiente (24°C ± 1°C). Em seguida, retirou-se uma alíquota de 2ml do meio e adicionou-se ácido clorídrico (HCl) 0,1M para interromper a reação. Por fim, retrotitulou-se esta nova solução com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M. Os ensaios do branco foram realizados com uma solução de 11ml de água destilada e 1ml de substrato. Todas as análises foram realizadas, semanalmente, em triplicata.

A adição de ácido clorídrico no final do tempo reacional, além de interromper a reação, converte o carbamato e amônia em íon amônio. Assim, a retrotitulação com hidróxido de sódio mede o ácido que não reagiu. O cálculo da atividade enzimática foi realizado através da equação a seguir (Equação 3):

$$\frac{Unidade}{g\ de\ feijão} = \frac{Molaridade\ do\ NaOH\ X\ Volume\ NaOH\ X\ 1000}{tempo\ de\ reação\ X\ quantidade\ de\ feijão\ imobilizado} \qquad \text{(Equação 3)}$$

onde, volume NaOH representa a diferença entre o volume utilizado no branco e o volume utilizado nas alíquotas dos ensaios.

5.4.4 Calibração e curva padrão do eletrodo íon-seletivo a amônio

O eletrodo íon-seletivo a amônio foi utilizado como transdutor do sistema biossensor montado para quantificação de uréia. Assim, antes dos ensaios relacionados ao desenvolvimento e aplicação do instrumento, foi necessário calibrar o eletrodo e elaborar sua curva padrão específica. Esta foi elaborada utilizando soluções diluídas de cloreto de amônio (NH_4Cl), em tampão fosfato de sódio pH 6,0, na faixa de concentrações de 5ppm a 100ppm. Para a sua construção, o eletrodo foi imerso em 5ml das soluções padrão nas diversas concentrações, sendo 100µl da solução de ajuste de força iônica (solução ISA comercial) adicionados. Após alguns minutos de estabilização, a leitura do sinal (em mV) produzido foi registrada. Entre as leituras das soluções, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel macio.

A fim de construir a curva padrão (Figura 14), um gráfico de forma logarítmica foi produzido correlacionando os valores de mV encontrados com suas respectivas concentrações padrão de amônia. Concomitantemente, foi verificado o teste da pendente, característico do instrumento transdutor citado, a fim de assegurar o seu bom funcionamento, segundo a Equação de Nernst (Equação 1), onde deveria encontrar variação de 54-60mV/década.

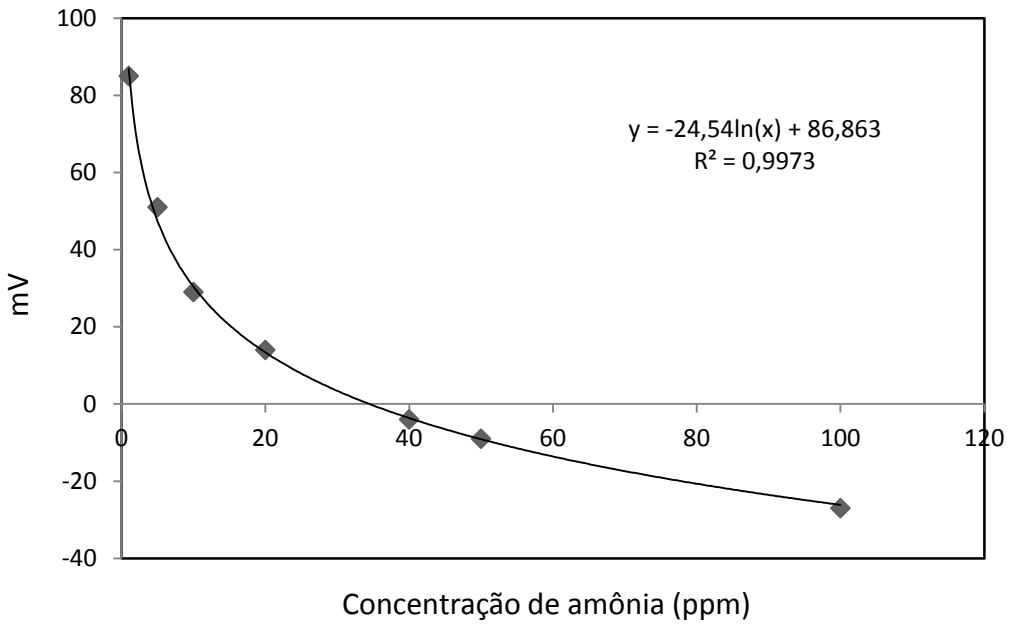

Figura 14: Exemplo de uma curva padrão do eletrodo íon-seletivo a amônio elaborada ao longo do presente trabalho.

5.4.5 Estudo do tempo de estabilidade de acordo com o método de estocagem do tecido vegetal na forma de pó (imobilizado e *in natura*) usando o método alcalimétrico

A estabilidade enzimática é a capacidade das enzimas de reter sua capacidade catalítica sob diferentes condições de reação ao longo do tempo – função biológica das enzimas está intimamente associada à sua estrutura tridimensional.

Para estudar o tempo de estabilidade de acordo com o modo de estocagem do tecido vegetal imobilizado, foram imobilizadas quatro amostras de tecido vegetal em pó, sendo duas armazenadas em geladeira, uma mergulhada em solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 e a outra envolta em papel filme, e outras duas armazenadas em congelador, do mesmo modo supracitado. Além disso, também foi estudado o tempo de estocagem do pó de feijão de porco armazenado em recipiente hermeticamente fechado em geladeira (4ºC), congelador (-8ºC) e temperatura ambiente (24º ± 1ºC) (em dessecador). As análises da atividade ureásica foram realizadas, em triplicata, segundo o método alcalimétrico descrito na seção 5.4.3.

5.4.6 Estudo do tempo de estabilidade do tecido vegetal em pó (imobilizado e *in natura*) usando quantificação de amônia produzida pelo eletrodo íon-seletivo a amônio

A fim de estudar o tempo estabilidade sob estocagem do tecido vegetal imobilizado, foram imobilizadas seis amostras de tecido vegetal em pó e armazenadas em congelador envoltas por papel filme. No caso do pó de feijão *in natura*, este foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado em geladeira (4ºC) e congelador (-8ºC). Os ensaios foram realizados a cada 15 dias em um prazo total de 3 meses. As análises da atividade ureásica foram realizadas, em triplicata, através do monitoramento da produção de amônia após 15 minutos de reação por eletrodo íon-seletivo a amônio previamente calibrado usando o método descrito na seção 5.4.4.

5.4.7 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo íon-seletivo a amônio em contato com o pó de feijão de porco *in natura* e imobilizado e da repetibilidade da resposta do transdutor

O tempo de resposta de um sensor é uma das características dinâmicas de um instrumento e pode ser definido como o tempo que a leitura deste instrumento leva para ir de um valor inicial a um valor final de equilíbrio. Assim, o tempo de estabilidade de resposta do eletrodo íon-seletivo a amônio em relação ao tempo de reação enzimática do pó de feijão de porco *in natura* e imobilizado foi estudado. Os ensaios foram realizados, em triplicata, em temperatura ambiente, com soluções de uréia de concentração de 10ppm (diluída com tampão fosfato de sódio, pH 6,0) e mesma quantidade de biocomponente (0,2g de pó de feijão) imobilizado ou *in natura*. Ao longo de 30 minutos de reação, a leitura, em mV, do transdutor foi monitorada a cada minuto.

Além disso, a repetibilidade é uma característica importante para um instrumento de medição, visto que representa a capacidade que este possui de dar o mesmo valor do sinal de saída para um valor correspondente de sinal de entrada em situações semelhantes. Assim, a repetibilidade do transdutor foi investigada com a sua inserção

em uma solução de uréia (20ppm) e uma solução de amônia (50ppm) ao longo de 60 minutos por três dias consecutivos. Os valores do transdutor, em mV, foram anotados a cada minuto e plotados em um gráfico reposta do eletrodo (mV) x tempo (minutos).

Com o tempo de resposta definido, a repetibilidade do sistema foi estudada através de quatro ensaios realizados para a avaliação da variação dos valores encontrados pelo transdutor quando esteve em contato com a solução de uréia 10ppm sob as condições citadas acima durante o tempo determinado.

5.4.8 Estudo da estabilidade operacional da enzima urease presente no tecido vegetal imobilizado em tela de nylon

A utilização de enzimas imobilizadas favorece a manutenção de suas propriedades catalíticas por maior tempo, podendo ser reutilizadas em um maior número de análises. Os estudos de estabilidade operacional mostram a robustez do procedimento de imobilização através do reuso da enzima imobilizada em vários ciclos reacionais consecutivos (ROSATTO *et al*., 2001). Assim, quanto maior a estabilidade operacional do biocomponente imobilizado, maior é seu tempo de uso produtivo, tornando a análise mais barata e simples.

Para investigar a variação de atividade ureásica do pó de feijão de porco imobilizado, em função da sua reutilização, fez-se uma primeira determinação da atividade segundo o procedimento descrito na seção 5.4.3. Em seguida, separou-se o biocomponente imobilizado do meio reacional e este foi lavado com, aproximadamente, 10ml de água destilada. Posteriormente, com o biocomponente reutilizado, seguiu-se o mesmo método para determinação da atividade enzimática. O procedimento de reutilização do material imobilizado foi realizado por mais uma vez, seguindo, portanto, três reutilizações consecutivas, intercaladas por lavagens com água destilada.

5.4.9 Projeto do sistema biossensor potenciométrico para quantificação de uréia e seu funcionamento

O sistema biossensor potenciométrico, desenvolvido no presente trabalho, montado para análise de uréia é mostrado na Figura 15. O sistema consistiu de um recipiente com amostra real ou solução padrão de uréia (1); bomba dosadora peristáltica (2); uma câmara reacional (3) formada por tubos e conexões de PVC no tamanho de ½", com capacidade de, aproximadamente, 25ml de volume reacional; eletrodo íon-seletivo a amônio (4); potenciostato (leitor de milivoltagem) (5); descarte das soluções (6), além das mangueiras de silicone de conexão (diâmetro interno de 0,3mm ± 0,05mm e comprimento de 82,2mm ± 0,05mm, medidos com paquímetro).

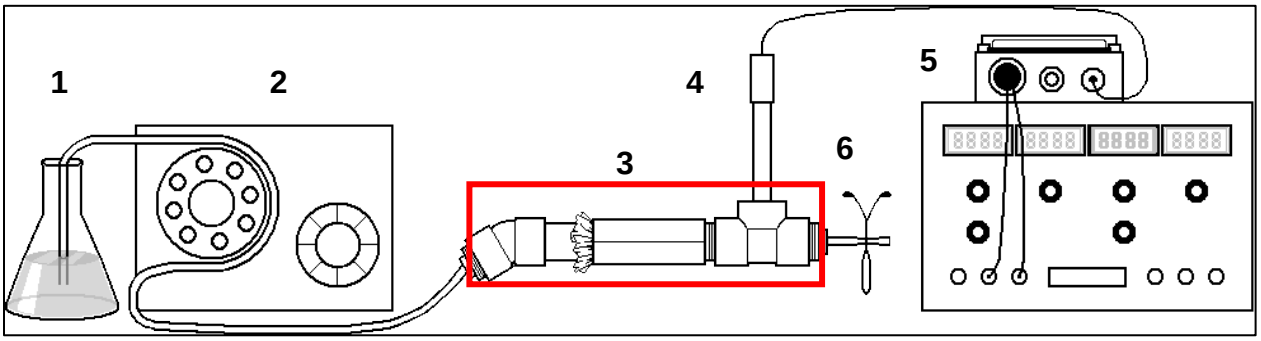

Figura 15: Esquema do sistema biossensor potenciométrico, desenvolvido no presente trabalho, montado para análise de uréia, (1) recipiente com a solução padrão de uréia; (2) bomba dosadora peristáltica; (3) câmara reacional; (4) eletrodo íon-seletivo a amônio, (5) potenciostato e (6) descarte.

A câmara reacional, retângulo vermelho, consistiu no local onde o componente biológico (0,2g de tecido vegetal em pó) imobilizado em tela de nylon foi retido e o transdutor (eletrodo íon-seletivo a amônio) foi imerso. Os ensaios foram desenvolvidos a temperatura de 24ºC ± 1ºC, e as soluções padrão de uréia foram diluídas em tampão fosfato de sódio pH 6,0. Após a análise de cada solução padrão de uréia pelo instrumento, o sistema foi lavado pelo bombeamento de água destilada, por 2 minutos, com vazão de 40ml/min.

5.4.9.1 Estudo do tempo reacional do biocomponente no sistema biossensor

Nessa etapa, o tempo de resposta do instrumento em desenvolvimento foi determinado, passando uma solução 10ppm de uréia pelo sistema com vazão de 40ml/min. Após o enchimento da câmara reacional, colocou-se o eletrodo, previamente calibrado, em contato com a solução e os valores (mV) foram acompanhados a cada minuto até a sua estabilização.

Este ensaio permitiu verificar se o tempo de estabilização encontrado no ensaio descrito na seção 5.4.7 se manteria com o uso do sistema biossensor mostrado na Figura 15.

5.4.9.2 Estudo da faixa de linearidade do biossensor potenciométrico

O estudo da faixa de linearidade e o grau de linearidade do instrumento são de extrema importância na construção da curva de calibração de um instrumento, garantindo sua precisão e confiabilidade. A maioria dos sensores analíticos comercialmente disponíveis necessita de calibração antes da sua utilização, a fim de que não haja erros de medição decorrentes de quaisquer motivos que tenham causado alteração nas suas condições padrões de operação. Essas curvas podem ser traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída do transdutor para um determinado valor do sinal de entrada (concentração do analito de estudo). Instrumentos lineares possibilitam a relação direta da leitura do sinal de saída com o da entrada, através da sua função de calibração (SKOOG *et al*.,1994; PEREIRA *et al*., 2007).

No estudo da faixa de linearidade do instrumento, foram passadas pelo biossensor, soluções padrão de uréia na faixa de 1 a 50ppm, com vazão de 40ml/min. Após o preenchimento total da câmara reacional, a bomba foi desligada, e 200µl da solução de ajuste de força iônica foram adicionados. Passado o tempo reacional determinado, anotou-se o valor (mV) indicado pelo eletrodo.

Os valores, em mV, encontrados, após a leitura com o transdutor, foram convertidos em valores de concentração de amônia através da equação da curva padrão do eletrodo íon-seletivo a amônio. A fim de se construir as curvas de calibração ascendente e descendente do instrumento, a concentração inicial de uréia foi correlacionada com a concentração de amônia gerada. Além disso, curvas foram construídas correlacionando o logaritmo natural (ln) da concentração de uréia e o valor de saída do transdutor (em mV).

5.4.9.3 Estudo do tempo de vida útil do componente biológico do biossensor potenciométrico

A fim de estudar o tempo de vida útil do biocomponente imobilizado usado no biossensor de uréia, foram realizados experimentos, visando a construção da curva de calibração, ao longo de 3 meses, utilizando o instrumento, com o mesmo conjunto de tecido vegetal em pó imobilizado em tela de nylon, e diversas concentrações de solução padrão de uréia (1 a 20ppm). Entre as análises, o biocomponente, imobilizado em tela de nylon, foi envolto em papel filme de PVC e armazenado em congelador.

5.4.9.4 Análise de perda de biocomponente imobilizado pela lavagem do sistema biossensor

A possível perda de biocomponente imobilizado durante o processo de lavagem do sistema, realizada entre as análises, foi investigada através da passagem de água destilada pelo sistema, na vazão de 40ml/min, por um período de duas horas. Foram retiradas alíquotas no início, meio e final do tempo transcorrido para quantificação de proteína segundo o método de Lowry descrito na seção 5.2.

5.4.9.5 Utilização do biossensor potenciométrico em amostra real

Utilizando as condições de trabalho determinadas para o biossensor potenciométrico proposto, foi analisada a concentração de uréia adicionada artificialmente (10ppm), em uma amostra real de vinhoto de 1ª geração doada pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química cuja composição é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6: Composição da amostra de vinhoto doada pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental.

Parâmetros	Valores
pH	5,98
Cor (unidadade PtCo)	15200
SST (mg/l)	3938
SSV (mg/l)	1213
SSF (mg/l)	2725
DQO total (mg/l)	51549
DQO solúvel (mg/l)	45339
DBO_5 (mg/l)	17000
Nitrogênio total (mg/l)	626,5
Fenóis totais (mg/l)	1,94
Polifenóis (mg/l)	3690
COT (mg/l)	13998
Fósforo total (mg/l)	24
Sulfato (mg/l)	330
Ácidos voláteis (mg HAc/l)	2860
Alcalinidade (mg $CaCO_3$/l)	1082

Por se tratar de uma amostra complexa, para cada ensaio, a amostra foi diluída 1000x em solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 e, a concentração de uréia foi obtida por meio da curva de calibração (regressão linear simples) do biossensor elaborada no dia da análise.

5.5 Ensaios com o tecido fúngico de *Agaricus bisporus* visando o desenvolvimento do biossensor amperométrico para fenol

5.5.1 Tecido fúngico de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*)

Os cogumelos do fungo *Agaricus bisporus* (Figura 16) usados no presente trabalho, conhecidos vulgarmente como cogumelo champignon de Paris, foram adquiridos em mercados populares, como por exemplo, CADEG (Benfica) (SILVA, 2009). Todos os lotes adquiridos apresentavam aparência similar (coloração branca, poucas vezes com um tom amarronzado). Os cogumelos foram utilizados, no máximo, três dias após a sua compra, e até a sua preparação, conservados sob refrigeração a 4°C. O tecido fúngico é rico em tirosinase (WICHERS *et al*., 1996), uma enzima responsável pela oxidação de fenóis.

Figura 16: Foto dos cogumelos champignon de Paris *in natura*.

5.5.2 Extração da tirosinase presente nos cogumelos de *Agaricus bisporus*

O macrofungo *Agaricus bisporus* foi escolhido como biocomponente para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol por ser uma fonte rica em enzima tirosinase. Assim, a fim de avaliar a variação da quantidade da atividade

tirosinásica dos lotes de cogumelos utilizados no presente trabalho, realizou-se o procedimento de extração enzimática dos mesmos.

A extração da enzima tirosinase do tecido fúngico foi realizada segundo o procedimento desenvolvido por Kameda (2003). Os cogumelos (340g) foram triturados em acetona gelada (1250ml) e o preparado foi filtrado em papel filtro (Whatman nº1) à vácuo. Em seguida, a pasta resultante foi congelada por 24 horas a 0°C. Posteriormente, esta foi ressuspensa em água destilada (150ml) e resfriada por 24 horas a 4°C. Finalmente, a pasta foi centrifugada a 3000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante obtido, o primeiro extrato enzimático. As etapas de ressuspensão e centrifugação foram realizadas por mais uma vez, gerando o segundo extrato enzimático.

5.5.3 Medida da atividade enzimática da tirosinase do tecido fúngico

A atividade enzimática da tirosinase foi medida segundo Campos *et al.* (1996). Em um béquer contendo 5,5ml de solução 0,2M de tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 1,5ml de solução 1,2mM de L-tirosina foi adicionado 1ml do extrato enzimático, previamente diluído em uma proporção de 1:10 no mesmo tampão. A variação de absorvância proveniente da reação enzimática foi lida a 280nm em intervalos de 30 segundos durante 999 segundos. A Figura 17 mostra as curvas de atividade tirosinásica dos 1º extrato enzimático e da sua re-extração (2º extrato) de um dos lotes comprados do cogumelo *Agaricus bisporus* durante o desenvolvimento do presente trabalho.

A unidade de atividade enzimática da tirosinase foi definida como sendo a quantidade de enzima que promove o incremento de 0,001 na absorvância a 280nm por minuto. A atividade foi calculada pela equação abaixo, Equação 4:

$$A\ (U/ml) = \frac{(Abs2 - Abs1)x\ 1000\ x\ De}{(t2 - t1)x\ Ve} \qquad \text{(Equação 4)}$$

Onde: Abs1 e Abs2 são absorvâncias nos tempos t1 e t2 em sua fase de aumento linear; Ve é o volume da solução enzimática (1ml) e De é a diluição da solução enzimática.

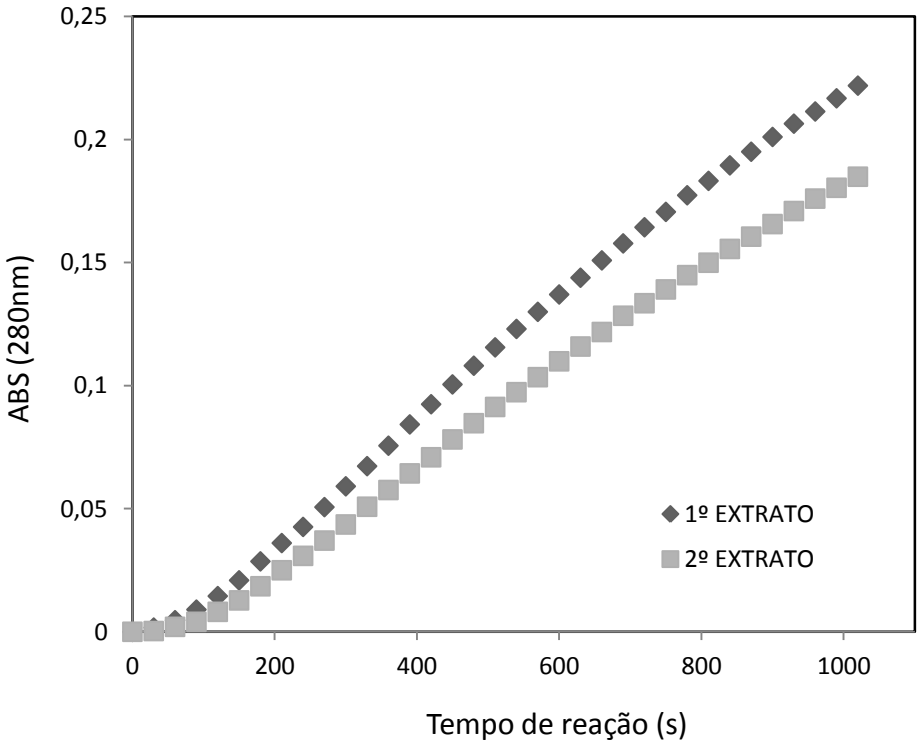

Figura 17: Curvas de atividade tirosinásica dos 1º e 2º extratos enzimáticos de um dos lotes comprados do cogumelo *Agaricus bisporus* durante o desenvolvimento do presente trabalho.

5.5.4 Preparação do cogumelo champignon de Paris

Na preparação dos cogumelos, estes foram cortados em cubos de 1cm de lado (SILVA, 2009), usando luvas e um bisturi limpo e esterilizado. Para o procedimento de liofilização, os cubos, aproximadamente 5g (SILVA, 2009), foram separados em frascos e colocados em um ultrafreezer até, finalmente, serem liofilizados. Para o processo de embalagem a vácuo, os cubos, aproximadamente 5g (SILVA, 2009), foram colocados em embalagens apropriadas (Nylon Poli) e seladas a vácuo. Enquanto não estava em uso, o biocomponente foi conservado sob refrigeração a 4ºC.

O material liofilizado também foi levado a pó através de um triturador elétrico e, posteriormente, peneirados em uma peneira, de uso doméstico, de nylon, separando o pó obtido com granulometria menor ou igual a 3mm.

5.5.5 Dosagem do fenol

A concentração do fenol das soluções foi determinada pelo método colorimétrico direto descrito no *Standard Methods* (APHA, 1992), empregando o reagente 4-aminoantipirina como agente complexante. Este método permite a dosagem de fenol simples e fenóis substituídos, exceto na posição *para*.

A quantificação do fenol foi realizada pela adição de 250μl de hidróxido de amônio (NH_4OH) 0,5M a 10ml da solução padrão, água destilada ou tampão fosfato de sódio pH 8,0. Posteriormente, foram adicionados 100μl da solução de 4-aminoantipirina a 2% (p/v) e 100μl da solução de ferricianeto de potássio a 8% (p/v). O pH foi ajustado para 7,9 (± 0,1) pela adição de hidróxido de amônio 0,5M ou solução tampão fosfato de potássio pH 6,8. Após 15 minutos, a absorvância da solução foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onde (λ) de 500nm.

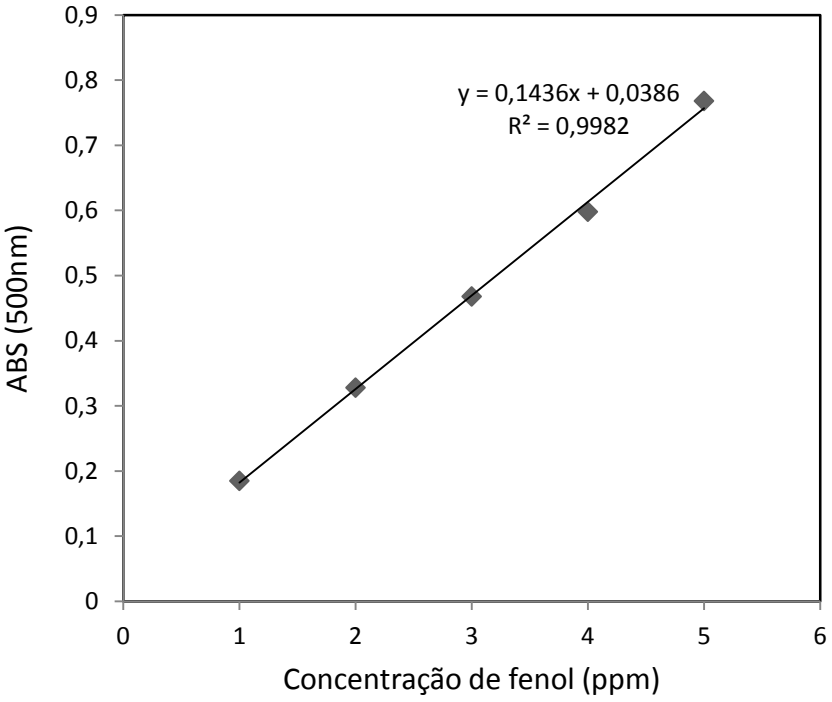

Figura 18: Exemplo de curva padrão de dosagem de fenol utilizando o método colorimétrico direto descrito no *Standard Methods* (APHA, 1992).

A fim de construir a curva padrão (Figura 18) do método utilizado, as soluções de fenol, com concentrações de 1 a 5ppm, foram preparadas a partir de diluições com tampão fosfato de sódio pH 8,0. O branco da reação consistiu de água destilada.

5.5.6 Calibração do eletrodo de oxigênio

O eletrodo de oxigênio foi utilizado como transdutor do sistema biossensor montado para quantificação de compostos fenólicos. Assim, diariamente, antes dos ensaios relacionados ao desenvolvimento e aplicação do instrumento, foi necessário calibrar o eletrodo. Sua calibração foi realizada com dois pontos de acordo com o manual do equipamento (medidor de OD/O_2/Saturação DM-4P Digimed). A determinação do ponto zero (0%) da curva de calibração foi realizada de forma automática, através de chaveamento eletrônico interno e, o ponto 100% através da

opção “Calibrar no Ar”, onde a célula seca foi colocada a 2 cm da superfície da água destilada.

5.5.7 Estudo do tempo de estabilidade do tecido fúngico liofilizado e tecido *in natura* embalado a vácuo

O tempo de estocagem do material fúngico (liofilizado e *in natura*) em geladeira (4ºC) foi analisado através da sua capacidade de remover fenol da solução padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e, consistiu em utilizar um erlenmeyer contendo uma solução de fenol (10ppm) e 5g do material fúngico (cubos de 1cm de lado), que foi submetido a baixa agitação constante. Foram recolhidas 5 alíquotas de 7,0ml a cada 15 minutos, durante 60 minutos de ensaio, sendo a primeira alíquota retirada assim que os cubos de cogumelos entraram em contato com a solução fenólica diluída em tampão fosfato de sódio pH 8,0. A quantificação do fenol das alíquotas foi realizada segundo o procedimento descrito na seção 5.5.5.

Posteriormente, analisou-se a melhor maneira de se estocar o biocomponente: geladeira (4ºC), congelador (-8ºC) ou temperatura ambiente (24º ± 1ºC) (em dessecador). Os ensaios do estudo da remoção de fenol pelo biocomponente ocorreram como descrito anteriormente nessa seção, semanalmente.

5.5.8 Projeto do sistema biossensor amperométrico para quantificação de compostos fenólicos e seu funcionamento

No desenvolvimento do sistema biossensor, desenvolvido no presente trabalho, mostrado na Figura 19, as medidas amperométricas foram realizadas através do emprego do eletrodo de oxigênio tipo Clark e o tecido fúngico liofilizado como biocomponente, previamente cortado em cubos de 1cm ou na forma de pó. As soluções padrão de estudo foram previamente diluídas com solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 na faixa de 1 a 30ppm de fenol.

O sistema consistiu de um recipiente com solução padrão de fenol (1); bomba dosadora peristáltica (2); uma câmara reacional (retângulo vermelho) (3) formada por tubos e conexões de PVC de tamanho de ¾”, promovendo capacidade de, aproximadamente, 50ml de volume reacional; eletrodo de oxigênio (4); descarte das soluções (5), além das mangueiras de silicone de conexão (diâmetro interno de 0,3mm ± 0,05mm e comprimento de 82,2mm ± 0,05mm, medidos com paquímetro).

O funcionamento do sistema consistiu, à temperatura ambiente (24ºC ± 1ºC), na passagem das soluções padrão, previamente borbulhadas com ar por 5 minutos (SILVA, 2008), pelas mangueiras de silicone. O objetivo desse procedimento foi fazer com que todas as soluções começassem com a mesma concentração inicial de oxigênio, evitando assim, mais interferentes na resposta final em relação à variação de oxigênio dissolvido obtida resultante da reação enzimática (SILVA, 2009).

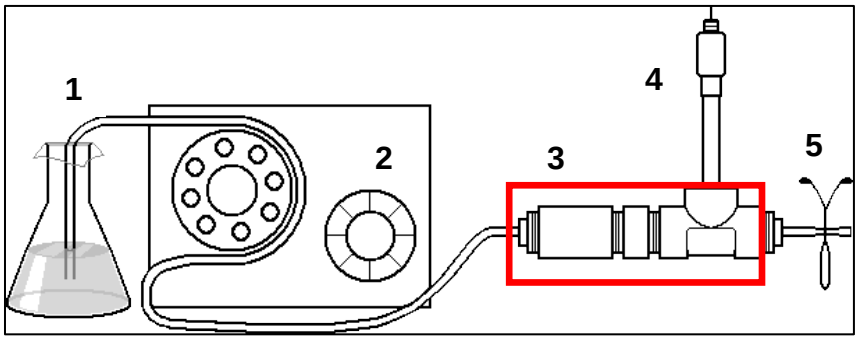

Figura 19: Sistema biossensor, desenvolvido no presente trabalho, montado para quantificação de compostos fenólicos , (1) recipiente com a solução padrão de composto fenólico; (2) bomba dosadora peristáltica; (3) câmara reacional; (4) eletrodo de oxigênio e (5) descarte.

O eletrodo de oxigênio, previamente polarizado, por 15 minutos, e calibrado, foi imerso na solução de fenol imediatamente após a saturação inicial desta com oxigênio obtida no borbulhamento de ar e o valor da concentração de oxigênio dissolvido, em mg/l, registrada (Vi). O valor final (Vf) foi registrado no final do tempo reacional determinado, sendo a variação da concentração de oxigênio dissolvido, em mg/l, definida pela diferença entre Vi e Vf.

Vale dizer que, a fim de minimizar as trocas de gases entre o meio externo e a solução de análise, o sistema sempre foi vedado com papel filme e as peças vedadas com fita veda rosca.

5.5.8.1 Estudo das melhores condições relativas à posição do tecido fúngico, o tempo de reação e a vazão de escoamento da solução padrão para a construção da curva de calibração do biossensor amperométrico

Os primeiros ensaios para a construção do sistema biossensor para fenol visaram escolher a melhor posição da massa de tecido fúngico, o tempo de reação e a vazão de escoamento das soluções padrão que promoveriam variação da concentração de oxigênio dissolvido (Vf-Vi) coerente à reação de oxidação promovida pela enzima tirosinase. Na prática, esperava-se que o aumento da concentração de fenol da solução padrão, sob tempo reacional fixo, promoveria o aumento da variação da concentração de oxigênio dissolvido.

Para a determinação da melhor vazão de escoamento das soluções padrão fenólicas no sistema foram escolhidos três valores: 20ml/min, 40ml/min e 60ml/min, e para a seleção do melhor posicionamento do biocomponente foram escolhidas duas posições (A e B) na câmara reacional demonstradas na Figura 20, diretamente acoplada ao sistema transdutor (A) ou imediatamente anterior a este (B).

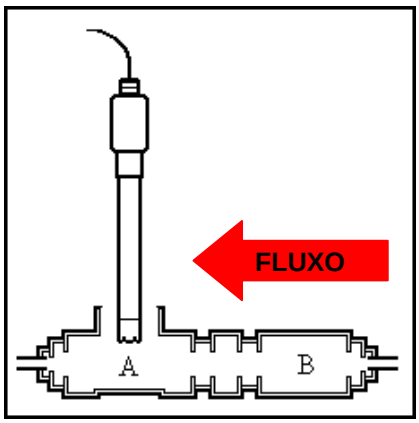

Figura 20: Possíveis posições para o biocomponente no sistema biossensor em desenvolvimento.

As soluções padrão fenólicas, previamente saturadas com oxigênio, foram bombeadas pelo sistema biossensor até o preenchimento da câmara reacional, quando a bomba peristáltica foi desligada e, o eletrodo de oxigênio imerso na solução e o sistema vedado. Os valores da concentração de oxigênio dissolvido, em mg/l, foram

registrados no tempo zero (Vi) e a cada 5 minutos (Vf), durante 30 minutos de ensaio. A passagem das soluções se deu da menor para a maior concentração, visando obter a curva de calibração ascendente do sistema.

5.5.8.2 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo de oxigênio no biossensor para fenol quando colocado em contato com o tecido fúngico liofilizado em cubos de 1cm de lado na posição A

Nessa fase, estudou-se o tempo de resposta do instrumento, em triplicata, passando uma solução 10ppm de fenol, previamente diluída em tampão fosfato pH 8,0, pelo sistema com vazão de escoamento de 40ml/min a temperatura ambiente. Após o enchimento da câmara reacional, colocou-se o eletrodo polarizado e calibrado, em contato com a solução e vedou-se o sistema, e os valores da concentração de oxigênio dissolvido foram acompanhados a cada minuto até a sua estabilização. Este ensaio permitiu verificar se o tempo de estabilização encontrado no ensaio descrito na seção 5.5.8.1 se manteria com o uso do sistema biossensor.

Ademais, foram realizados 4 ensaios para a avaliação da variação dos valores encontrados pelo transdutor quando esteve em contato com a solução de fenol 10ppm sob as condições citadas acima durante o tempo determinado nesse item e na seção 5.5.8.1.

5.5.8.3 Estudo da faixa de linearidade do biossensor amperométrico

De posse das melhores condições de posição do tecido fúngico no sistema biossensor (posição A), o tempo de reação (6 minutos) e a vazão de escoamento da solução (40ml/min), objetivou-se determinar a faixa de linearidade do instrumento, através da construção da curva de calibração ascendente do biossensor para fenol. Os ensaios foram desenvolvidos conformo descrito na seção 5.5.8, utilizando cubos liofilizados de 1cm do tecido fúngico diferentes.

5.5.8.4 Análise da reutilização do biocomponente durante a construção da curva de calibração ascendente do sistema biossensor para quantificação de fenol

De posse das melhores condições de posição do tecido fúngico no sistema biossensor (posição A), o tempo de reação (6 minutos) e a vazão de escoamento da solução (40ml/min), objetivou-se construir a curva de calibração ascendente do biossensor para fenol, estudando a possibilidade de reutilização do biocomponente, sendo este aproveitado três vezes e, observando-se a repetibilidade da curva.

5.5.8.5 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo de oxigênio no biossensor para fenol quando colocado em contato com o tecido fúngico liofilizado na forma de pó na posição A

Primeiramente, buscou-se utilizar a quantidade 0,5g do material liofilizado, visto que o tecido fúngico *in natura* apresenta aproximadamente 90% de umidade e a quantidade utilizada nos outros testes é de 5g do biocomponente.

Assim, para o estudo do tempo de resposta do eletrodo de oxigênio quando colocado em contato com o tecido fúngico liofilizado na forma de pó (0,5g e 1,0g) na posição A, bombeou-se, a temperatura ambiente, uma solução padrão de fenol 10ppm, previamente diluída em tampão fosfato pH 8,0, pelo sistema com vazão de escoamento de 40ml/min. Após o enchimento da câmara reacional, colocou-se o eletrodo polarizado e calibrado, em contato com a solução, vedando-se o sistema, e os valores da concentração de oxigênio dissolvido foram acompanhados a cada minuto até a sua estabilização. Este ensaio permitiu verificar se o tempo de estabilização encontrado no ensaio descrito na seção 5.5.8.2 se manteria, mesmo com a modificação da forma do biocomponente.

CAPÍTULO 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Quantificação de umidade dos biocomponentes

A atividade da água (aw) está relacionada com a água disponível para crescimento microbiano e reações que possam deteriorar os alimentos, referindo-se a medição da concentração de solutos em água e seus efeitos sobre a atividade química da água. O valor da aw indica o nível de água em sua forma livre nos materiais e é expresso na escala de 0 a 1 aw, onde o valor 0 é dado para materiais livres de água e 1 para a água em sua forma líquida (JOBIM *et al*., 2007).

Assim, além da temperatura, o teor de água dos grãos e sementes é um fator primordial na conservação dos mesmos. Quando o teor de água é baixo (11 a 13%, base úmida), a respiração, atividade vital, fica diminuída e o metabolismo reduzido ao mínimo. Assim, a combinação de baixas temperaturas e baixo teor de água dos grãos é ideal para a armazenagem de sementes que necessitam da manutenção da sua qualidade (RIGUEIRA *et al*., 2009).

Os ensaios de determinação do teor de umidade dos feijões de porco, realizados em triplicata, mostrou que eles apresentam cerca de 11,4% ± 0,17% de teor de água. O baixo teor de água explica o longo de tempo de vida útil dos feijões que estão armazenados desde 2003 quando foram doados pela empresa Sementes na Terra & Produtores Associados. Fato que promoveu o barateamento do projeto do biossensor, visto que o material biológico possui grande tempo de vida útil na forma de grãos a temperatura ambiente.

Ao contrário dos grãos, os cogumelos são alimentos altamente perecíveis na natureza e com vida de prateleira que varia de 3 a 5 dias quando armazenados em temperatura ambiente (MARTINE *et al*., 2000 *apud* MOHAPATRA *et al*., 2008). Isso ocorre devido ao alto teor de umidade e da alta atividade de enzimas como proteases e polifenol oxidases (MANZI *et al*., 2004). Analisando o tecido fúngico de *Agaricus bisporus in natura*, o teor de umidade encontrado foi de 93,5% ± 5,7%. A alta porcentagem de água sinalizou que o procedimento de liofilização seria necessário

para aumentar o tempo de estocagem e de conservação do biocomponente sem que houvesse apodrecimento. Assim como nesse trabalho, Junqueira (2004) relata que o cogumelo shiitake fresco apresenta de 85% a 95% de água.

6.2 Resultados relativos ao tecido vegetal para aplicação no biossensor potenciométrico para uréia

6.2.1 Estudo do tempo de estabilidade de acordo com o método de estocagem do tecido vegetal na forma de pó (imobilizado e *in natura*) usando o método alcalimétrico

Parâmetros importantes que devem ser analisados quando se quer desenvolver um biossensor são o tempo de vida útil, durabilidade e estabilidade às condições de estocagem do componente biológico de estudo (SALGADO, 2001).

Assim, como descrito na seção 5.4.3, a medida da atividade da enzima urease foi baseada no método alcalimétrico descrito por Kistiakowsky & Shaw (1953 *apud* COMERLATO, 1995) onde se observa que o pH inicialmente neutro de uma solução não tamponada de uréia-urease rapidamente aumenta para pH 9,0 e, então, permanece constante. No entanto, como os resultados de Pinto *et al*. (2007) mostraram que a urease naturalmente presente no pó de feijão possui melhor atividade catalítica em solução tampão fosfato de sódio pH 6,0, adaptou-se o método, trocando a solução tampão utilizada na metodologia de análise da atividade ureásica. Ademais, conforme visto na Figura 21, o perfil da atividade ureásica relativa (%) do pó imobilizado em tela de nylon ao longo dos dias de estocagem em geladeira é semelhante quando se usa ambas as soluções tampão.

Apesar de Pinto *et al*. (2007) terem observado que o aumento do valor de pH promove a redução da atividade enzimática do biocomponente imobilizado, os resultados mostrados na Figura 21 mostram que esse fenômeno não ocorreu no tempo reacional do ensaio, 5 minutos. Ademais, o aumento do pH da solução, causado pela reação enzimática, também não foi capaz de inativar a enzima presente no

biocomponente durante o tempo de ensaio, quando foi utilizada a solução tampão fosfato pH 6,0. Assim, a partir desses resultados, os ensaios de quantificação de atividade ureásica foram realizados utilizando solução tampão fosfato de sódio pH 6,0.

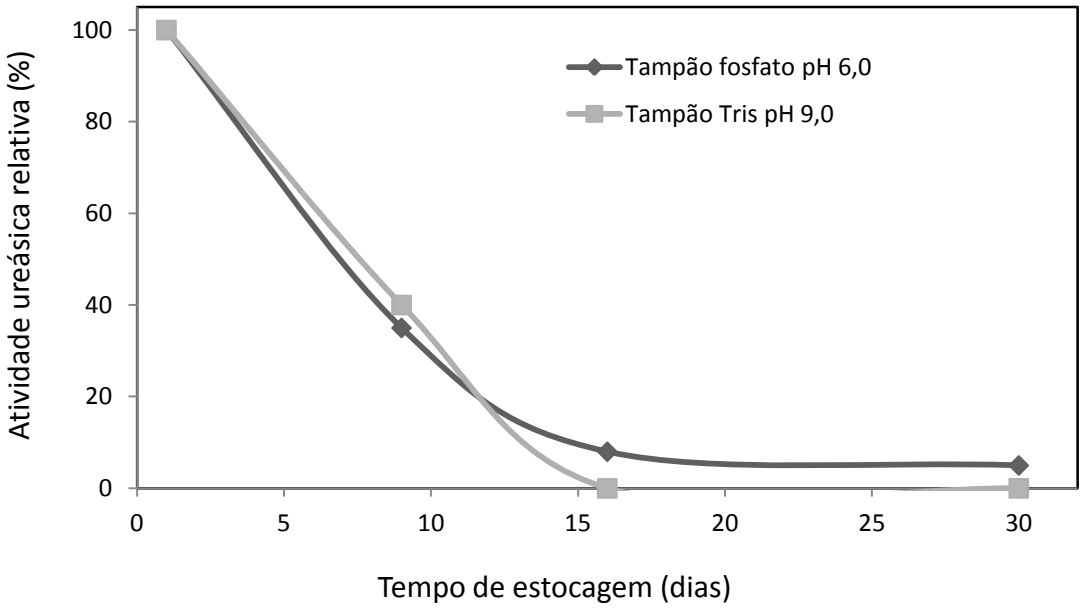

Figura 21: Variação da atividade ureásica do pó de feijão imobilizado em tela de nylon ao longo dos dias de estocagem em geladeira usando as duas soluções tampão durante o ensaio alcalimétrico.

Inicialmente, como o pó de *Canavalia ensiformis* era guardado em geladeira, quando não estava em uso na sua forma imobilizada, nos trabalhos de Pinto *et al.* (2007, 2008, 2009), resolveu-se estudar a estabilidade do biocomponente sob estocagem em geladeira através da análise alcalimétrica (Figura 22). Como era de se esperar, a atividade ureásica relativa do biocomponente decaiu ao longo do tempo de estocagem em geladeira, atingindo o valor de 30% em 22 dias. Devido ao baixo desvio padrão das triplicatas dos ensaios, barra de erros invisível no gráfico, acredita que os aumentos da atividade relativa observados em 8 e 30 dias de estocagem se devam as variações inerentes ao biocomponente, visto que trata-se de uma mistura de grãos de feijão de porco na forma de pó.

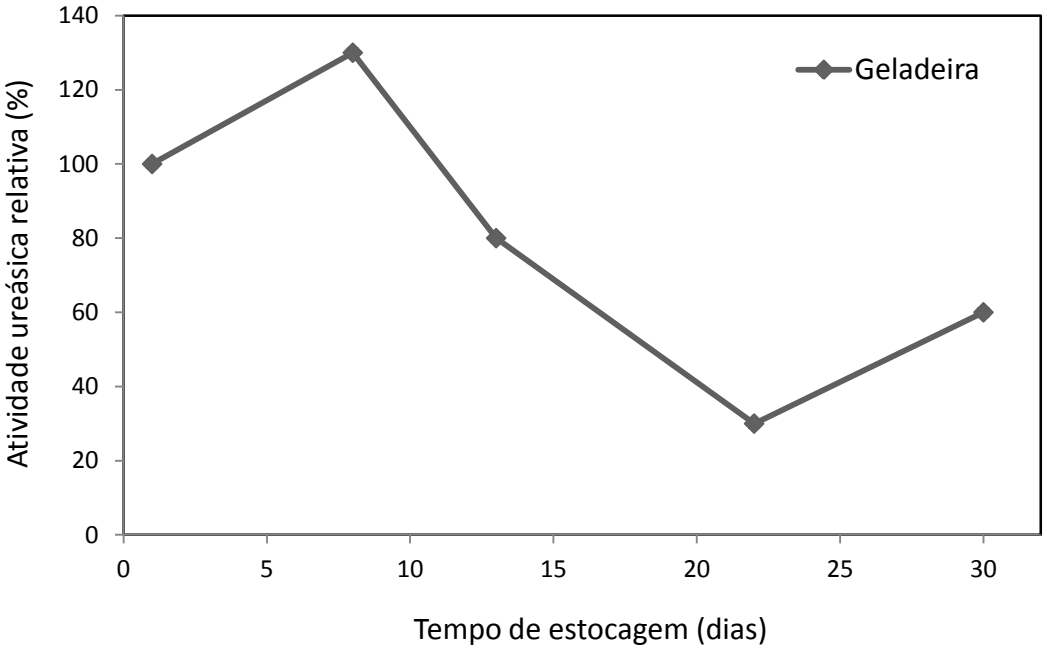

Figura 22: Variação da atividade ureásica do pó de feijão *in natura* ao longo dos dias de estocagem em geladeira usando o ensaio alcalimétrico.

Posteriormente, a fim de escolher o melhor modo de estocagem do pó de feijão de porco, decidiu-se por estudar a sua estocagem em outras temperaturas: temperatura ambiente (24º ± 1ºC) e congelador (-8ºC). Os resultados, média das triplicatas, dos ensaios das análises feitas ao longo dos dias estão mostrados na Figura 23.

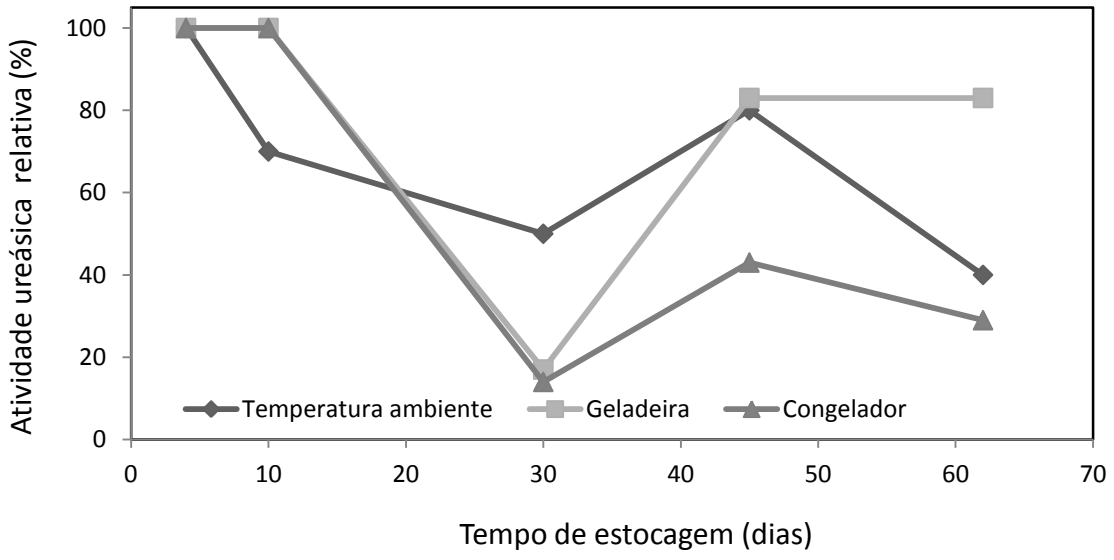

Figura 23: Variação da atividade ureásica do pó de feijão *in natura* ao longo dos dias de estocagem usando o ensaio alcalimétrico.

Até trigésimo dia de estocagem, observou-se o menor decaimento, cerca de 50%, da atividade ureásica do biocomponente quando este foi armazenado em frasco hermeticamente fechado e estocado a temperatura ambiente. Entre o trigésimo e o quadragésimo quinto dia, observou-se um aumento da atividade relativa nas três condições de estocagem analisadas, voltando a decair até o sexagésimo dia. Assim, decidiu-se armazenar o pó do feijão de porco a temperatura ambiente por, no máximo, 30 dias. Esse resultado já era esperado devido ao longo de tempo de vida útil dos feijões de porco que estão armazenados desde 2003. No entanto, por estar descascado e na forma de pó, aumentando, assim, a área em contato com o ambiente externo, o tempo de vida útil é bem menor.

Além do pó de feijão de porco *in natura*, analisou-se o melhor método de estocagem do biocomponente imobilizado em tela de nylon, enquanto não estava em uso no biossensor. Durante os seus trabalhos, Pinto *et al*. (2007, 2008, 2009) o armazenavam em geladeira, imerso em solução tampão fosfato pH 7,0, solução utilizada na imobilização do mesmo. No presente trabalho, analisaram-se quatro opções de armazenamento: geladeira ou congelador e, imerso em solução tampão fosfato pH 7,0 ou envolto em papel filme. As duas últimas maneiras foram escolhidas

visando minimizar o ressecamento do material biológico em contato com o ar frio. A Figura 24 mostra os resultados encontrados ao longo de 14 dias de estocagem.

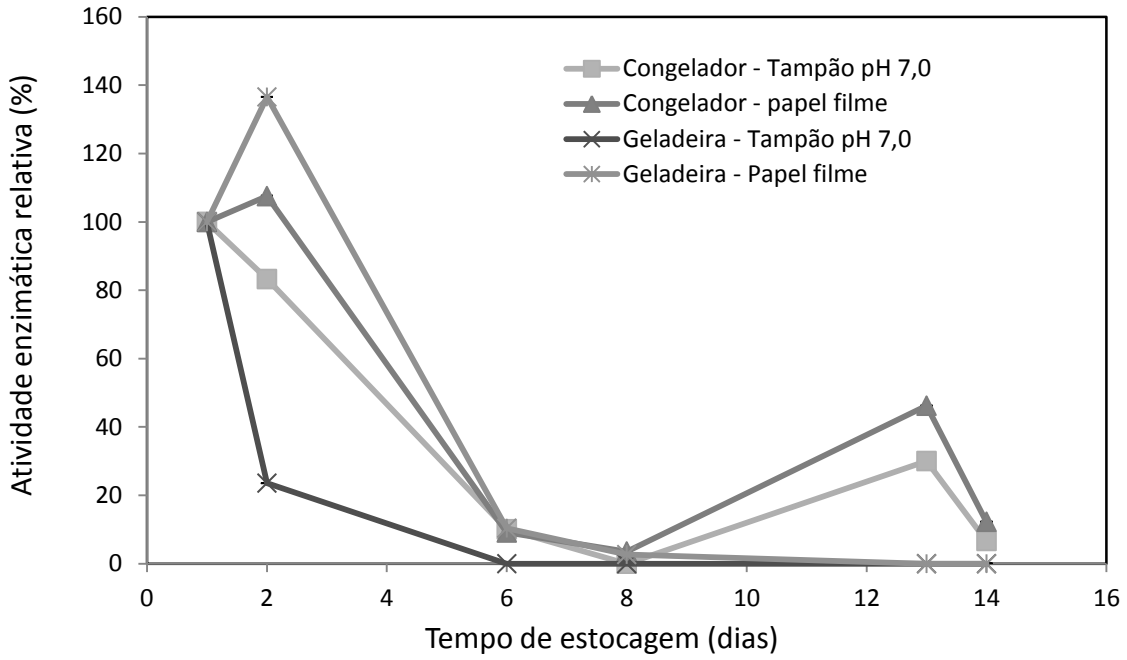

Figura 24: Estudo da forma de armazenamento do pó de feijão imobilizado em tela de nylon usando o ensaio alcalimétrico para quantificação da atividade ureásica.

Frente à análise dos resultados encontrados, percebe-se que a vida útil do biocomponente imobilizado em tela de nylon armazenado, em baixas temperaturas, entre os dias de uso no biossensor, é baixa, sendo a estocagem em congelador e, envolto em papel filme de PVC, a mais apropriada. Assim, esta foi a forma de armazenagem escolhida. A baixa estabilidade também foi relatada por Comerlato (1995) que observou queda de aproximadamente 80% na atividade da urease imobilizada em crisotila ao longo de 7 dias de estocagem em geladeira.

Os sítios ativos da enzima são geralmente compostos por grupos ativos ionizáveis, que devem estar na forma iônica apropriada para manter sua conformação. Assim, a variação do pH contribui para a desativação da enzima, modificando sua estrutura tridimensional afetando a atividade catalítica. Pinto *et al*. (2008) e Oliveira (2008) mostraram que valores de pH acima de 6,0 promove uma redução da atividade

ureásica do biocomponente. Esses trabalhos confirmam as maiores quedas na atividade, nos primeiros oito dias, quando o material foi armazenado em solução tampão fosfato pH 7,0.

A Figura 25 mostra o perfil da variação de atividade ureásica do biocomponente imobilizado, entre os dias de uso no biossensor, quando foi armazenado segundo o modo de estocagem escolhido (congelador e envolto em papel filme de PVC). Como observado anteriormente, o tempo de vida útil é baixa, chegando a 2,4% de atividade ureásica relativa em 16 dias. No entanto, como esse biocomponente imobilizado foi utilizado por mais de 2 meses no biossensor, mostrando atividade, isto é, variação na resposta do eletrodo, em mV, com a variação da concentração do substrato, o método alcalimétrico se mostrou pouco sensível para valores baixos de atividade.

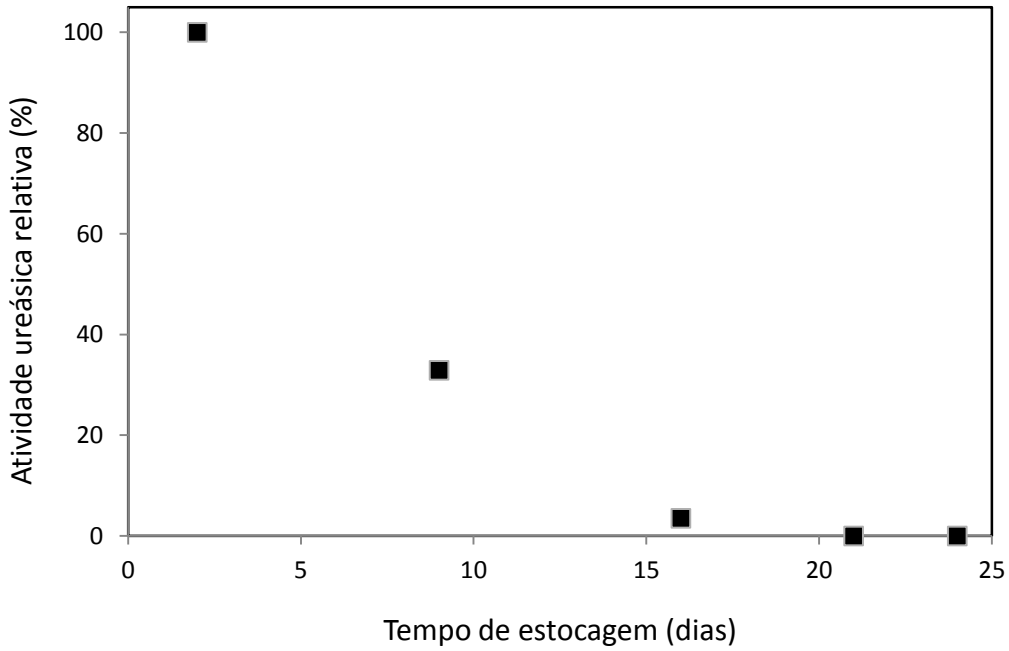

Figura 25: Variação da atividade ureásica do pó de feijão imobilizado em tela de nylon, quando não estava em uso no biossensor, armazenado em congelador e envolto em papel filme de PVC, usando o ensaio alcalimétrico.

6.2.2 Estudo do tempo de estabilidade do tecido vegetal em pó (imobilizado e *in natura*) usando quantificação de amônia produzida pelo eletrodo íon-seletivo a amônio

Como o método alcalimétrico mostrou-se pouco sensível para baixos valores de atividade ureásica, visto que indicavam ausência de atividade da enzima urease, enquanto o biocomponente ainda estava em uso no biossensor com baixas conversões de uréia em amônia, optou-se por analisar o tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em tela de nylon, através da quantificação de amônia produzida pela atividade ureásica do biocomponente. A determinação foi realizada pelo transdutor, eletrodo íon-seletivo, ao longo dos dias de estocagem em congelador, envolto por papel filme (melhor condição de estocagem escolhida). Assim, a unidade de atividade enzimática (U) foi estabelecida através da medida da velocidade de reação a partir da quantidade de produto formado (amônia) em uma dada unidade de tempo. Definiu-se como a quantidade de enzima capaz de produzir 1µmol do produto por minuto sob condições adequadas de atuação, pH 6,0 e temperatura ambiente, da enzima de estudo presente no tecido de feijão de porco.

Esperava-se encontrar o mesmo perfil de variação da atividade ureásica relativa ao longo do tempo encontrado utilizando o método alcalimétrico, isto é, diminuição da atividade com o passar do tempo. No entanto, ao contrário do observado nas Figuras 21-25, a atividade ureásica do biocomponente imobilizado aumentou ao longo do tempo até 44 dias de estocagem, decaindo, posteriormente, de forma acentuada e a atividade do material biológico *in natura* manteve-se praticamente constante ao longo de 44 dias nas duas temperaturas de armazenamento – congelador e geladeira (Figura 26). Possivelmente, o material biológico, consequentemente, a urease, adaptou-se ao suporte, tornando-se mais estável, ao longo do tempo de estocagem. Assim como o mostrado no presente trabalho, Oliveira (2008), utilizando um biossensor de urease de soja imobilizada, encontrou um aumento muito elevado (valores acima de 500%) da resposta relativa até 8 dias de uso, decaindo em seguida, quando utilizou 10µl de extrato de soja na confecção do instrumento.

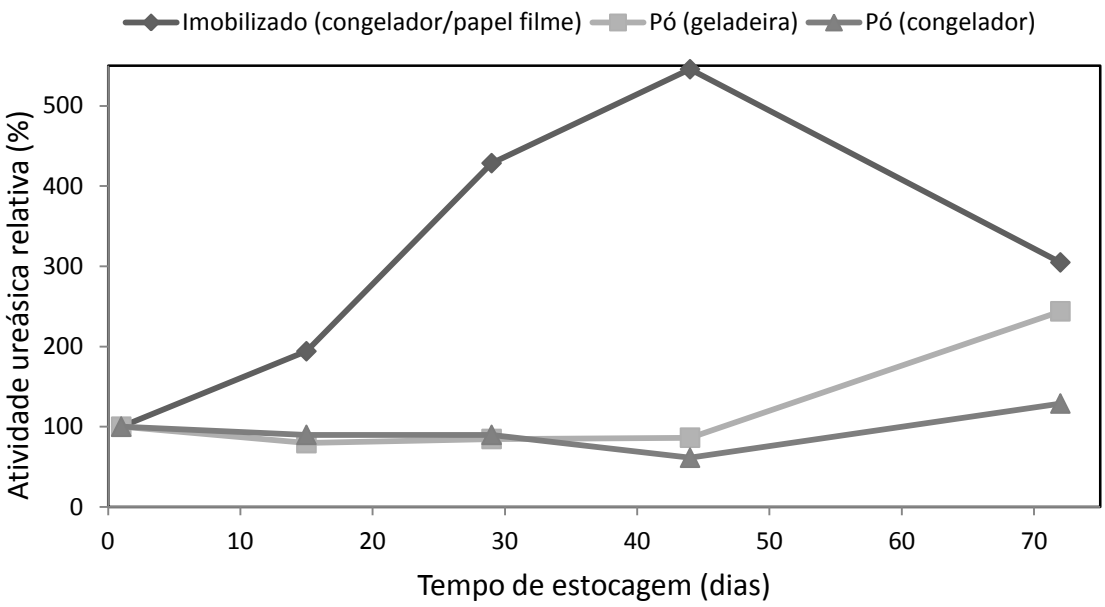

Figura 26: Estudo do tempo de estocagem do pó de feijão *in natura* e imobilizado usando o eletrodo íon-seletivo para quantificação da geração de amônia pela reação enzimática catalisada pela urease.

6.2.3 Estudo do tempo de estabilidade de resposta do eletrodo íon-seletivo a amônio em contato com o pó de feijão de porco *in natura* e imobilizado

A Figura 27 mostra os perfis de variação da resposta do transdutor, ao longo do tempo, quando o biocomponente, *in natura* ou imobilizado, foi imerso na solução padrão de uréia de 10ppm. Observou-se a estabilização da resposta do eletrodo a partir do tempo de 12 e 15 minutos, utilizando o biocomponente *in natura* e imobilizado, respectivamente. A estabilização da resposta do eletrodo frente o material *in natura* ocorreu pouco antes do tempo estabelecido para o imobilizado, mostrando pequena variação na atividade catalítica dos materiais biológicos. Assim como o ocorrido nesse trabalho, Júnior (1995) também encontrou valores menores para a estabilização da resposta quando se utilizou o material biológico *in natura*. Ele achou valores de 5 minutos e 9-10 minutos para a forma *in natura* e imobilizada, respectivamente, quando utilizou como fonte de urease a espécie *Canavalia brasiliensis*.

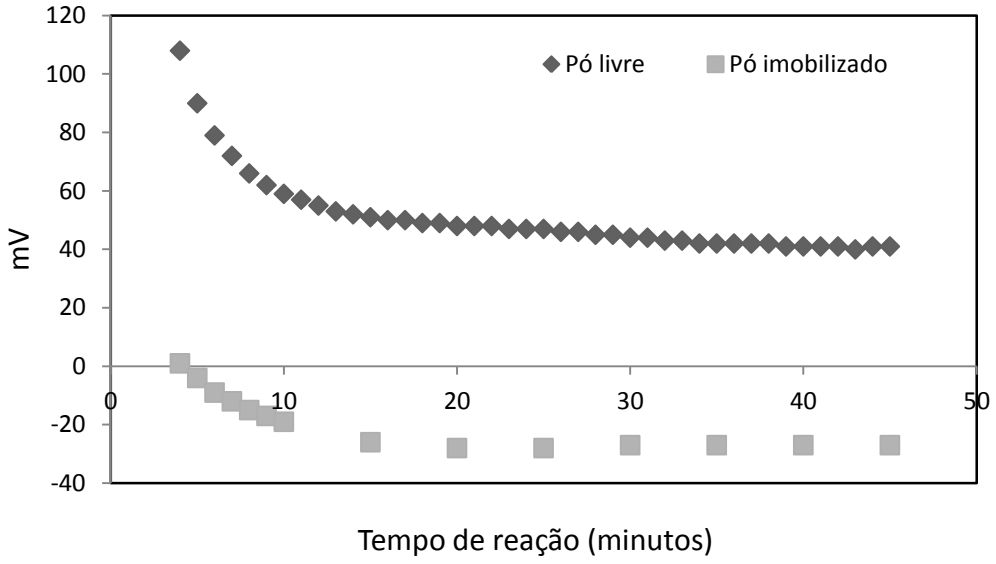

Figura 27: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo íon-seletivo quando se colocou o pó de feijão *in natura* e imobilizado em contato com solução de uréia 10ppm.

Essa variação do tempo de estabilização pode ser decorrente da menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo da imobilização reduz a difusão do substrato nos interstícios do suporte ou pelo decréscimo da velocidade das enzimas presentes no tecido vegetal imobilizado devido às mudanças conformacionais na sua estrutura terciária ou aos impedimentos estéreos que resultam na dificuldade de acesso do substrato ao seu sítio ativo (MATEO *et al*., 2000).

6.2.4 Estudo da variação da atividade da urease imobilizada em função da sua reutilização

O estudo de estabilidade operacional do processo de imobilização foi realizado através do reuso de um mesmo tecido, fonte da enzima, imobilizado em vários ciclos reacionais consecutivos (ROSATTO *et al*., 2001). Os resultados do estudo da variação da atividade do biocomponente imobilizado em função de sua reutilização são mostrados na Figura 28. A reutilização do tecido vegetal imobilizado ocasionou a

redução de 50% na atividade ureásica detectada através da análise do método alcalimétrico.

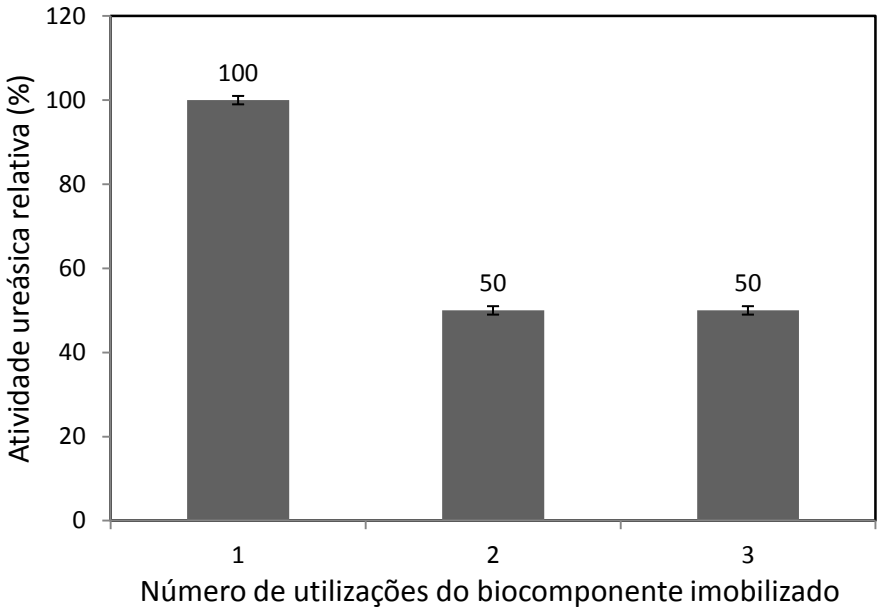

Figura 28: Análise da influência da reutilização do biocomponente vegetal imobilizado na atividade ureásica quando o colocou em contato com solução de uréia 10ppm através do método alcalimétrico.

A atividade ureásica promove a conversão de um substrato neutro, uréia, em um produto básico, amônia. Kistiakowsky & Shaw (1953 *apud* CORMELATO, 1995) observaram que uma solução, inicialmente, neutra, de uréia-urease, rapidamente tem seu pH aumentado para 9,0. A partir de então, o valor permanece constante, visto que os produtos da reação formam um sistema tampão.

Pinto *et al.* (2007) estudaram o melhor valor de pH da solução de uréia para a atuação do pó de feijão de porco imobilizado em tela de nylon, utilizando solução tampão fosfato de sódio como diluente. Os resultados apontaram o valor 6,0 como o melhor para atuação. Além disso, os perfis reacionais, usando o eletrodo íon-seletivo, mostram que o aumento do pH da solução promove redução da atividade ureásica do material biológico.

Assim, pode-se dizer que a atividade enzimática do biocomponente reduziu devido ao aumento do valor de pH da solução que pode ter desativado a enzima. Esse

comportamento também foi encontrado por Cormelato (1995) analisando urease imobilizada em crisotila e por Oliveira (2008) durante o seu trabalho de desenvolvimento de um biossensor potenciométrico a base de soja, onde concluiu que a enzima urease necessita de um longo tempo de permanência no pH de análise, antes de uma nova leitura, a fim de ser reativada, restabelecendo a linha base da medida.

6.2.5 Funcionamento do biossensor potenciométrico para quantificação de uréia

Segundo Oliveira-Neto & Yamanaka (1988 *apud* FATIBELLO-FILHO & CAPELATO, 1992), apesar de haver excelentes monografias na literatura sobre biossensores amperométricos e potenciométricos na década de 80, no Brasil, apenas uma tinha sido publicada. Assim, observa-se que se trata de uma área de estudo recente no país. Os trabalhos brasileiros, na década de 90 e nos primeiros anos do século XXI, na área de biossensores, indicavam uma busca por fontes naturais rica em enzimas (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002), além de métodos de imobilização das mesmas ou do extrato bruto. Atualmente, as publicações internacionais nessa área indicam uma tendência no desenvolvimento de inovações tecnológicas nas áreas elétrica, eletrônica, engenharia química e biotecnologia, buscando novos compostos para a construção de transdutores e suportes, a fim de aumentar a confiabilidade dos biossensores e conseguir a sua miniaturização e aplicação em amostras reais, focando na sua comercialização. No Brasil, observa-se que essa tendência é iniciante, no entanto, crescente ao longo dos anos, sendo observado pelo aumento e conteúdo dos trabalhos publicados.

6.2.5.1 Estudo do tempo reacional do biocomponente no sistema biossensor

O tempo de resposta de um instrumento é uma característica dinâmica, podendo ser definido como o tempo que a leitura do mesmo leva para ir de um valor inicial a um valor final de equilíbrio. Geralmente, os instrumentos comerciais têm esta variável como um parâmetro especificado (MELO, 2008). Vale ressaltar que, quando se tratam

de biossensores, o tempo de resposta geralmente é maior que o de outros instrumentos, devido à necessidade de um tempo de contato entre o analito de interesse e o biocomponente.

O estudo do tempo reacional do biocomponente no sistema biossensor se iniciou utilizando o tempo já estabelecido por Pinto *et al*. (2009), isto é, 2 minutos. No entanto, provavelmente, por se tratar de um novo eletrodo íon-seletivo, não se observou uma boa relação entre a faixa de analito de estudo e a resposta, em mV, do transdutor, além da baixa repetibilidade dos valores de saída do transdutor (desvio padrão relativo, DPR, de, aproximadamente, 10,7%) para o mesmo valor do analito de estudo (20ppm de uréia) (Figura 29).

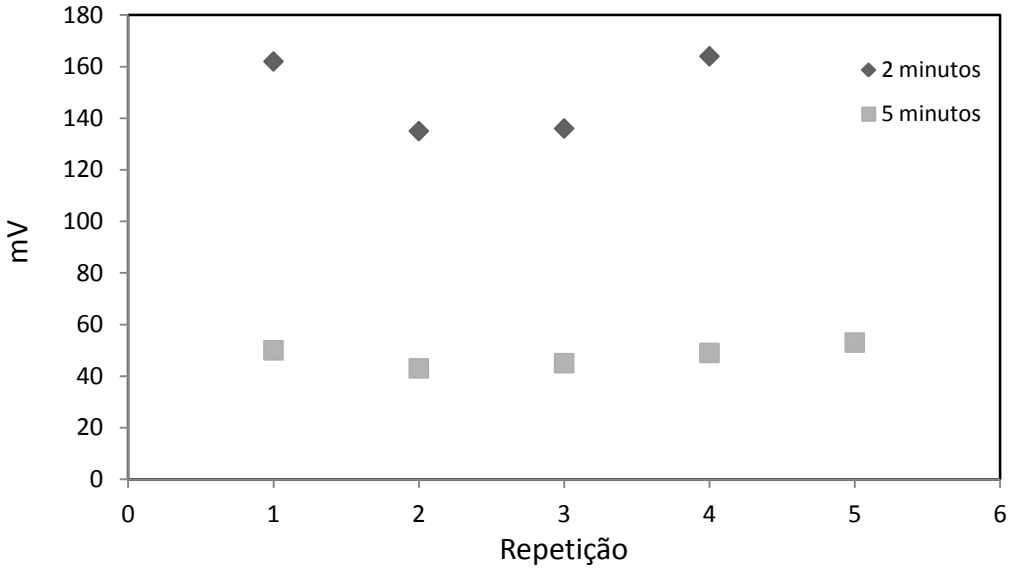

Figura 29: Valores de saída do transdutor, em mV, para o mesmo valor de analito (20 ppm de uréia) e material biológico, usando dois tempos reacionais: 2 e 5 minutos.

Assim, realizou-se um ensaio de estabilização da resposta do eletrodo, ao longo do tempo, frente à reação enzimática promovida pelo biocomponente imobilizado no biossensor potenciométrico em contato com 10ppm de uréia. O resultado é mostrado na Figura 30, onde se percebeu que, a partir de 5 minutos, ocorreu a estabilização da resposta do eletrodo.

Assim, posteriormente, analisou-se a repetibilidade da resposta do mesmo, com o tempo reacional de 5 minutos, frente a uma concentração fixa (20ppm) do analito

(Figura 29). Com a melhor repetibilidade dos resultados com o tempo reacional escolhido, de 5 minutos, apresentando um DPR de, aproximadamente, 8,3%, passou então a ser adotado como o tempo a ser utilizado no desenvolvimento do biossensor potenciométrico.

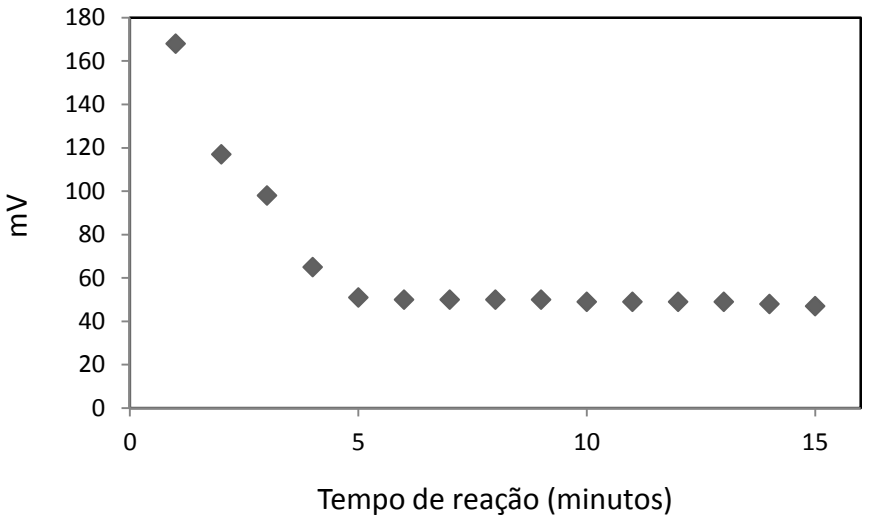

Figura 30: Variação da resposta do eletrodo ao longo do tempo quando inserido em uma solução do analito (10 ppm de uréia) em contato com o material biológico de estudo no biossensor.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi necessária a troca do eletrodo íon-seletivo por outro, de mesma marca, visto que a assistência técnica do fabricante não conseguiu reparar o problema. Assim, com a modificação do eletrodo íon-seletivo a amônio, decidiu-se realizar outro ensaio de estabilização da resposta do eletrodo frente à reação promovida pelo biocomponente imobilizado no biossensor potenciométrico em contato com o substrato (10ppm de uréia). O resultado é mostrado na Figura 31, confirmando a precisão das respostas com o tempo reacional de 15 minutos na Figura 32.

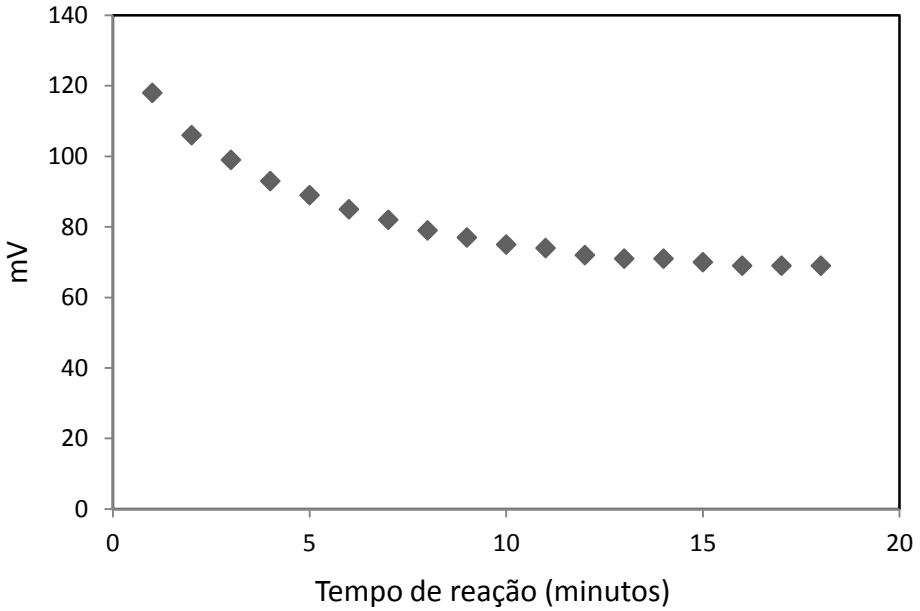

Figura 31: Tempo de estabilização da leitura do novo eletrodo íon-seletivo quando se colocou o pó de feijão imobilizado em contato com solução de uréia 10ppm no biossensor.

A Figura 32 mostra a repetibilidade das respostas do eletrodo íon-seletivo, no biossensor, quando foi inserido em uma solução de 10ppm de uréia, usando o tempo reacional escolhido de 15 minutos. Os resultados mostram que houve um DPR de, aproximadamente, 3,2%.

Segundo o documento do INMETRO (PEREIRA *et al*., 2007), a precisão é um termo utilizado para avaliar a dispersão de resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrão, em condições definidas. Portanto, o DPR se mostra mais útil como critério de comparação, pois é normalizado com base na concentração e, desse modo, é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que não seja muito ampla. Baseando-se nisso, o presente trabalho também o utilizou como parâmetro de comparação e tomada de decisão para a escolha do melhor tempo de resposta do eletrodo. Além disso, outros trabalhos encontraram DPR da mesma ordem de grandeza aqui encontrado, como é o caso do trabalho de Júnior (1995).

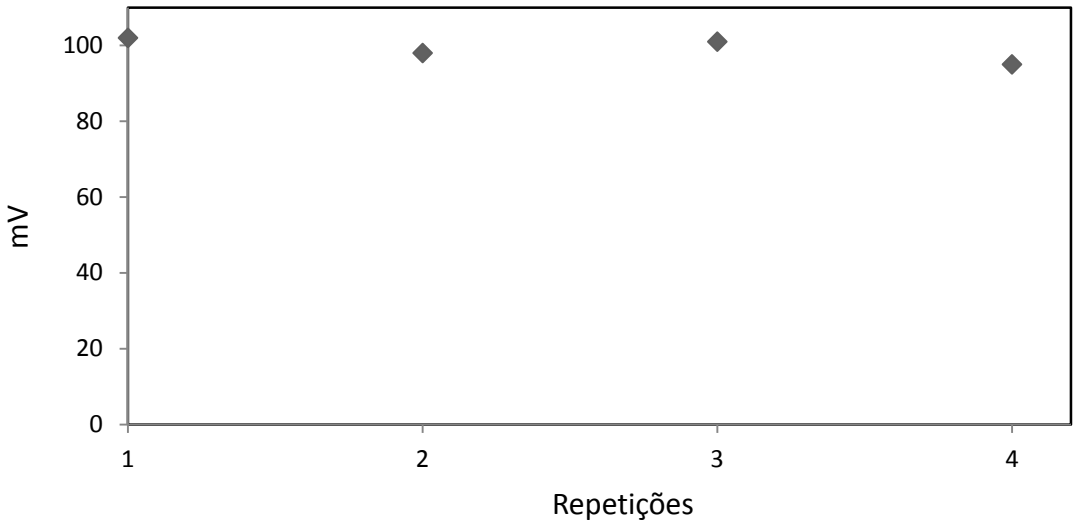

Figura 32: Valores de output do transdutor, em mV, para o mesmo valor de analito e material biológico utilizado, usando o tempo reacional determinado (15 minutos).

Os tempos encontrados para a resposta do biossensor potenciométrico, 5 e 15 minutos, estão de acordo com os dados da literatura que estão na faixa dos minutos quando se utiliza um transdutor comercial (PANPAE *et al*., 2006; KUMAR *et al*., 2009). Os trabalhos que desenvolvem o próprio transdutor para a aplicação no desenvolvimento de biossensores, o tempo, geralmente, fica na ordem de segundos (TRIVEDI *et al*., 2009; CHIRIZZI & MALITESTA, 2011). Isso se deve ao fato dos transdutores serem desenvolvidos especificamente para o analito de interesse na construção do biossensor, sendo, portanto, otimizado para as condições do meio reacional (temperatura, pH, força iônica) e material biológico empregado. Assim, apesar de novas técnicas eletroquímicas terem sido desenvolvidas, por exemplo, ISFET, os estudos na direção das funções resposta-seletividade para os eletrodos íon-seletivo, podem ser um novo caminho para a potenciometria, revitalizando esta metodologia (FERNANDES *et al*., 2001)

6.2.5.2 Estudo da faixa de linearidade do instrumento

As curvas de calibração foram traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída, mV, do primeiro eletrodo íon-seletivo a amônio para um determinado valor do sinal de entrada (faixa de concentração de uréia: 1 a 50ppm). Os resultados que visaram buscar a faixa de linearidade do biossensor são mostrados nas Figuras 33a e 33b, onde a primeira é a exposição dos resultados comparando a faixa de uréia e a de amônia gerada após o tempo reacional e a segunda é ilustração da comparação da faixa do analito e da resposta do eletrodo em mV. A análise dos dados com o *software* STATISTICA Trial Version (StatSoft, Inc. 1984-2011) mostrou uma relação significativa (α=95%) entre os dados de *input* e *output* do transdutor na faixa de estudo, com os R^2 acima de 0,93 em todas as quatro curvas na faixa de 1 a 20ppm de uréia.

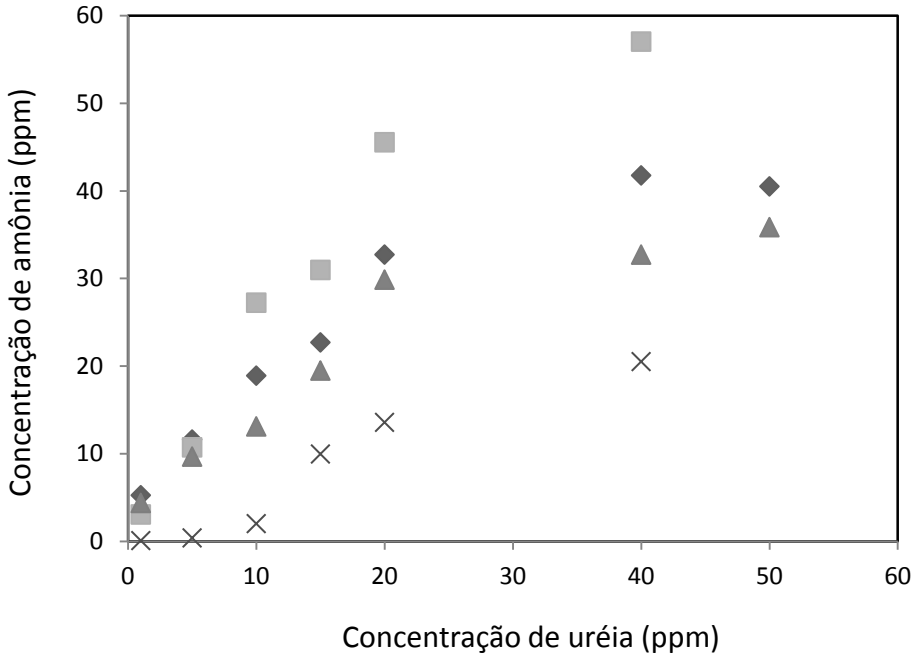

Figura 33a: Estudo da linearidade do instrumento montado, usando o biocomponente imobilizado em tela de nylon, relacionando a concentração do substrato e do produto formado. Cada curva representa um "conjunto" de biocomponente imobilizado em tela de nylon diferente.

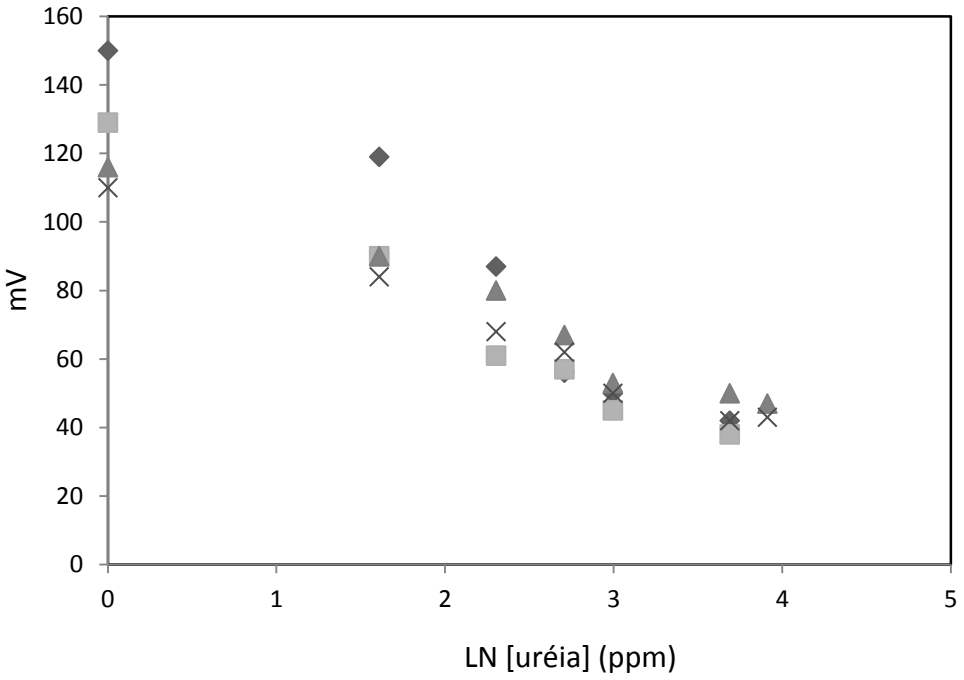

Figura 33b: Estudo da linearidade do instrumento montado, usando o biocomponente imobilizado em tela de nylon, relacionando o logaritmo natural do substrato e a resposta, em mV, do transdutor. Cada curva representa um "conjunto" de biocomponente imobilizado em tela de nylon diferente.

A maioria dos trabalhos que visa desenvolver um biossensor para uréia presentes na literatura apresenta seu foco na área médica e de análises clínicas, visto que a análise da uréia em fluidos biológicos é um importante parâmetro no diagnóstico de doenças renais. Assim, a faixa linear da concentração de uréia dos instrumentos montados situa-se torno de 10^{-6} a 10^{-1}M. Em relação à aplicação ambiental dos biossensores a base de urease, curiosamente, tem sido na detecção de metais pesados em corpos hídricos através do processo de inibição enzimática da urease (SINGH *et al*., 2008; DHAWAN *et al*., 2009).

Como o foco do presente trabalho é o monitoramento e controle ambiental, a escolha da faixa baseou-se na Resolução Conama nº 357/05 que cita os compostos nitrogenados na ordem de alguns ppm e, em relação ao lançamento de efluentes, estabelece 20ppm como valor máximo de lançamento de amônia. Assim, a faixa de linearidade do instrumento em desenvolvimento é condizente com o seu objetivo principal é que é ser aplicado na área ambiental.

6.2.5.3 Estudo do tempo de vida útil do instrumento para análise de uréia

O estudo do tempo de vida útil do biossensor foi realizado através da elaboração de curvas ascendentes do instrumento, ao longo dos dias, onde o biocomponente imobilizado, em uso, foi armazenado da forma escolhida mostrada na seção 6.2.1. Os dados, quando se utilizou o primeiro transdutor e o tempo reacional de 5 minutos, são mostrados nas Figuras 34a e 34b.

Posteriormente, com a aquisição de um novo eletrodo íon-seletivo a amônio, os ensaios mostraram que o tempo reacional deveria ser de 15 minutos e as curvas de calibração realizadas ao longo dos dias são mostradas nas Figuras 35a e 35b.

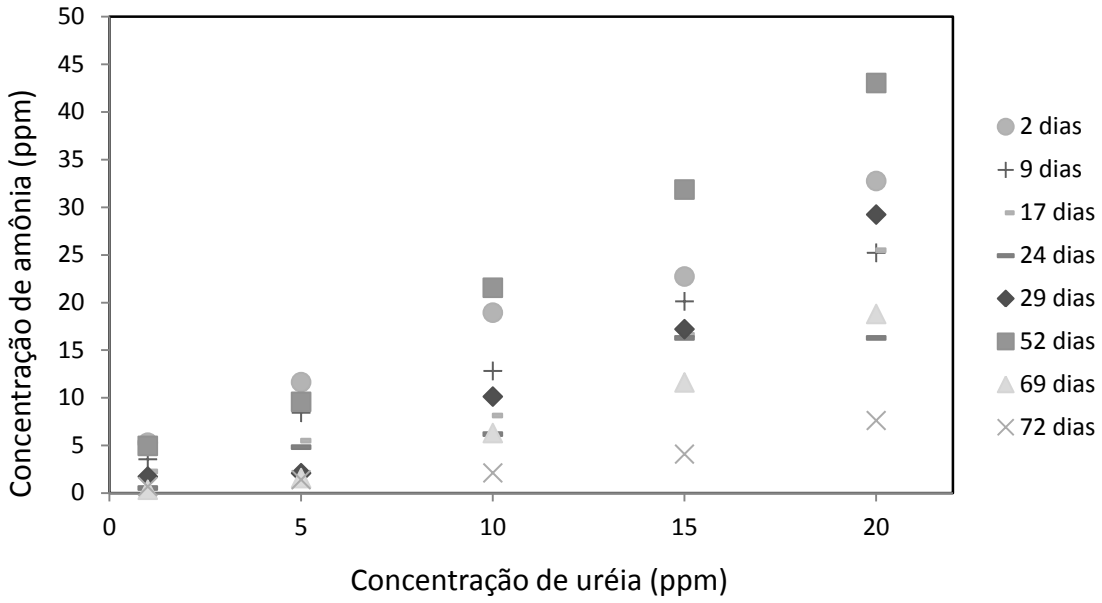

Figura 34a: Curvas de calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira visando o estudo de vida útil do instrumento, levando em consideração o produto formado (amônia).

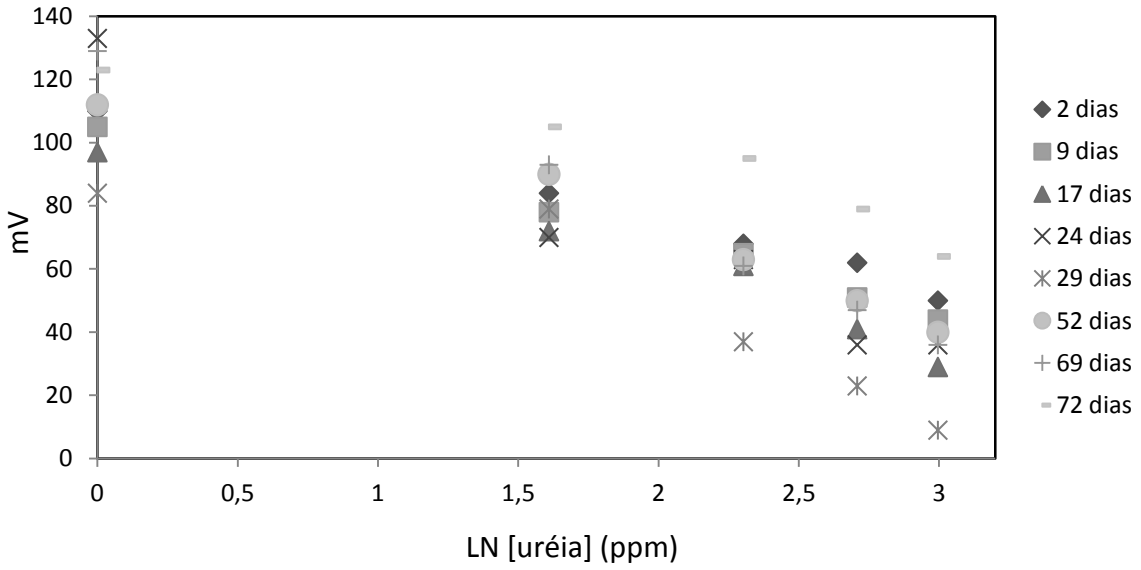

Figura 34b: Curvas de calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira visando o estudo de vida útil do instrumento, levando em consideração a resposta do transdutor.

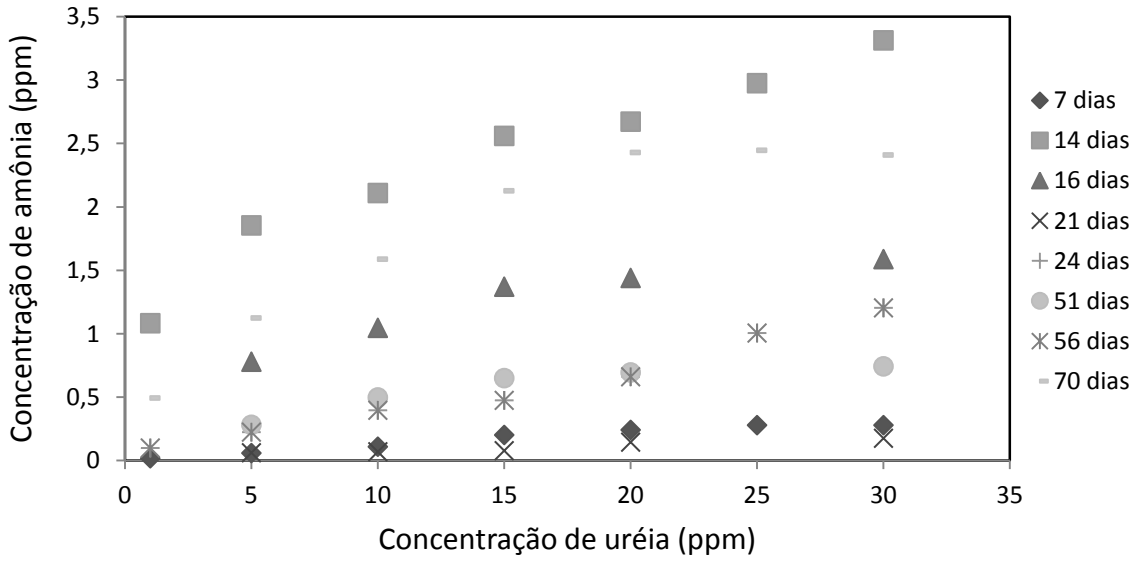

Figura 35a: Curvas calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira, levando em consideração o produto formado (amônia).

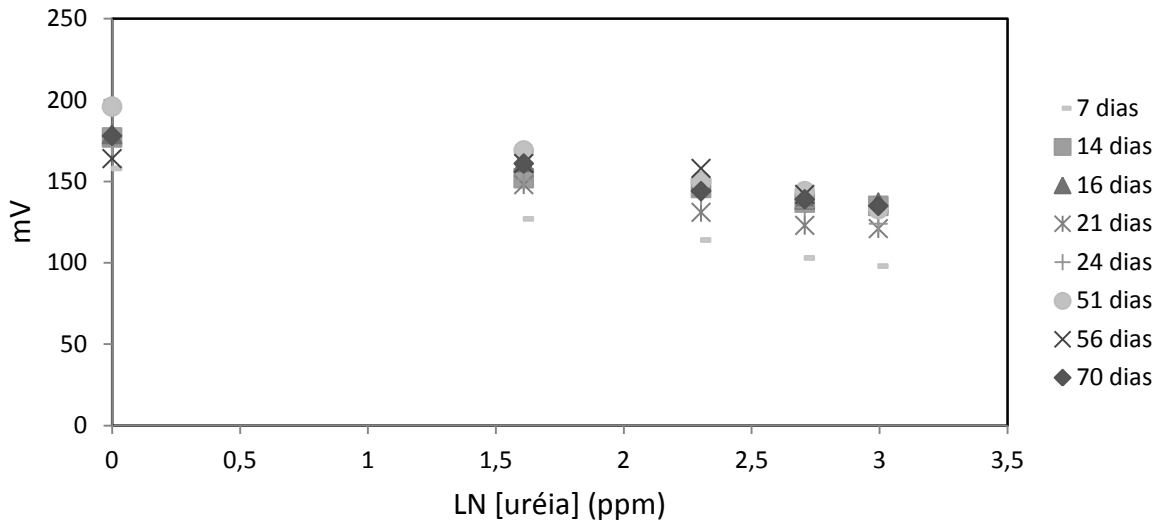

Figura 35b: Curvas calibração ascendentes do sistema biossensor de uréia realizadas ao longo do tempo de estocagem do biocomponente imobilizado em geladeira, levando-se em consideração a resposta do transdutor.

A análise dos dados com o *software* STATISTICA Trial Version (StatSoft, Inc. 1984-2011) dos resultados mostrados nas Figuras 34b e 35b mostrou uma relação linear significativa (α=95%) entre os dados, em mV, do transdutor e faixa do analito, com os R^2 acima de 0,93 em todas as curvas. Assim, concluiu-se que existe relação linear entre a resposta do eletrodo, em mV, e a concentração de uréia. Além disso, o tempo de vida útil do instrumento foi de, aproximadamente, 70 dias. O resultado está de acordo com a literatura onde são encontrados valores que variam de algumas semanas a meses (SINGH *et al*., 2008; DHAWAN *et al*., 2009).

Ademais, com ambos os eletrodos também foram elaboradas curvas descendentes da faixa de concentração onde se observou linearidade do instrumento, 1 a 20ppm de uréia. As Figuras 36 e 37 são referentes aos resultados encontrados com o primeiro e segundo eletrodos utilizados, respectivamente.

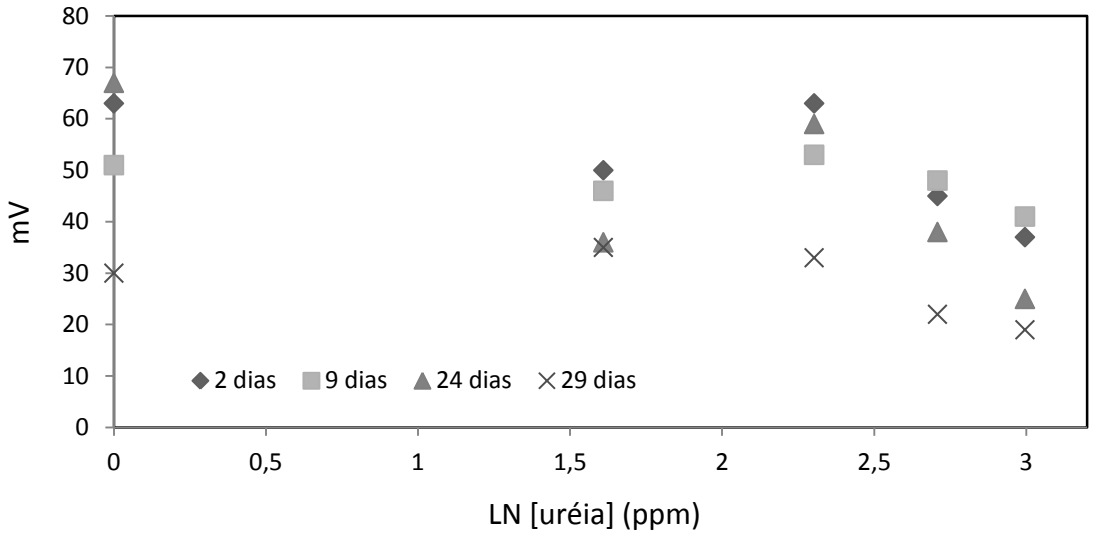

Figura 36: Curvas descendentes construídas ao longo dos dias de estocagem do material biológico em geladeira, usando o primeiro transdutor adquirido.

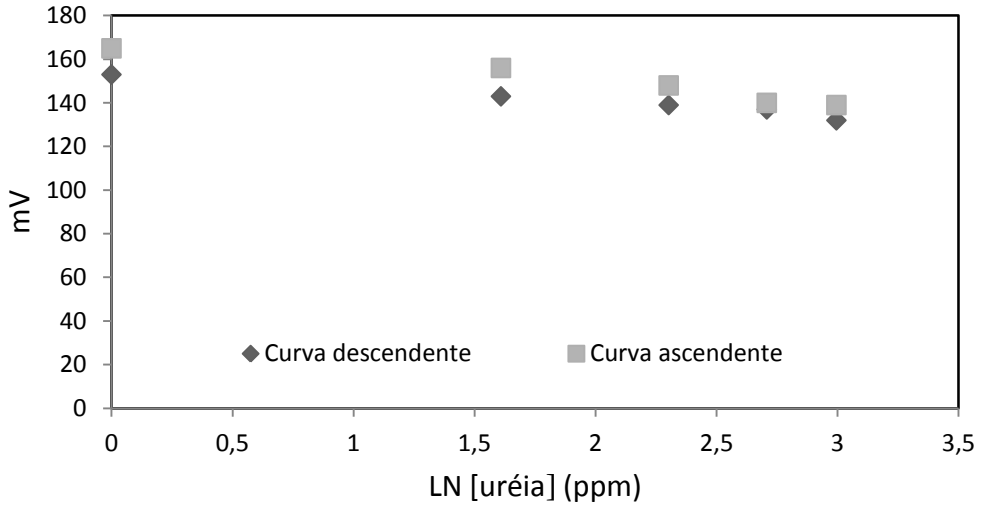

Figura 37: Comparação entre as curvas ascendente e descendente construídas com o biossensor potenciométrico, usando o segundo transdutor adquirido.

A Figura 36 mostra que as curvas descendentes construídas não indicam a mesma relação de linearidade entre o valor, em mV, do transdutor e a faixa de concentração de estudo do analito encontrada na construção das curvas ascendentes. Já na Figura 37 a diferença mostrada entre as curvas ascendente e descendente

construídas com o segundo eletrodo íon-seletivo não é significativa (α=95%) segundo análise com o *software* STATISTICA Trial Version (StatSoft, Inc. 1984-2011). A discrepância mostrada na Figura 36 pode ser explicada por vários fatores, dentre eles: desativação do material biológico por conta do aumento do valor de pH da solução provocado pela reação enzimática de hidrólise da uréia, com aumento da concentração de solução amostra, e/ou histerese do transdutor. Além disso, a interferência de diversos íons e compostos no eletrodo íon-seletivo também foi constatada por outros autores que desenvolveram seus transdutores para aplicação em um biossensor eletroquímico, como é o caso do trabalho de Júnior (1995). Além disso, Fernandes *et al*. (2001) relatam que, inicialmente, a comunidade científica considerou que os eletrodos potenciométricos eram específicos, mas com o passar do tempo, descobriram que a especificidade dos sensores não era tão grande como se pensava e o termo seletivo foi consagrado, em substituição ao específico. Em potenciometria, é bem conhecido o estudo de interferentes, através da determinação dos coeficientes de seletividade potenciométricos pelos métodos da interferência fixa ou das soluções separadas.

O estudo da histerese é importante para avaliar o retorno das propriedades do biossensor em relação à sua linha base com a repetição das análises. Essa característica do eletrodo íon-seletivo a amônio pode ser observada aumentando a resposta em função do crescimento da concentração de uréia (curva ascendente) e, posteriormente, com a diminuição desta (curva descendente). Assim, os resultados mostrados na Figura 37 indicam uma histerese, pois as respostas no sentido crescente da concentração são maiores do que as encontradas no sentido da diminuição da concentração do analito. No entanto, o efeito desse fenômeno não provocou variação significativa, utilizando o nível de significância de 95%.

6.2.5.4 Estudo da repetibilidade do instrumento para análise de uréia

A repetibilidade do biossensor potenciométrico para análise de uréia foi investigada através do desenvolvimento das curvas de calibração ascendentes na faixa

de 1 a 20ppm de uréia. A Figura 38 mostra os resultados referentes à utilização do primeiro transdutor e a Figura 39 mostra os resultados com o uso do segundo eletrodo íon-seletivo. Assim como observado na seção anterior, as curvas encontradas nos ensaios referentes ao presente item, também mostraram a presença de histerese dos eletrodos íon seletivos utilizados. No entanto, a repetibilidade do biossensor é satisfatória, visto que a diferença mostrada entre as curvas construídas nas Figuras 38 e 39 não é significativa (α=95%) segundo análise com o *software* STATISTICA Trial Version (StatSoft, Inc. 1984-2011).

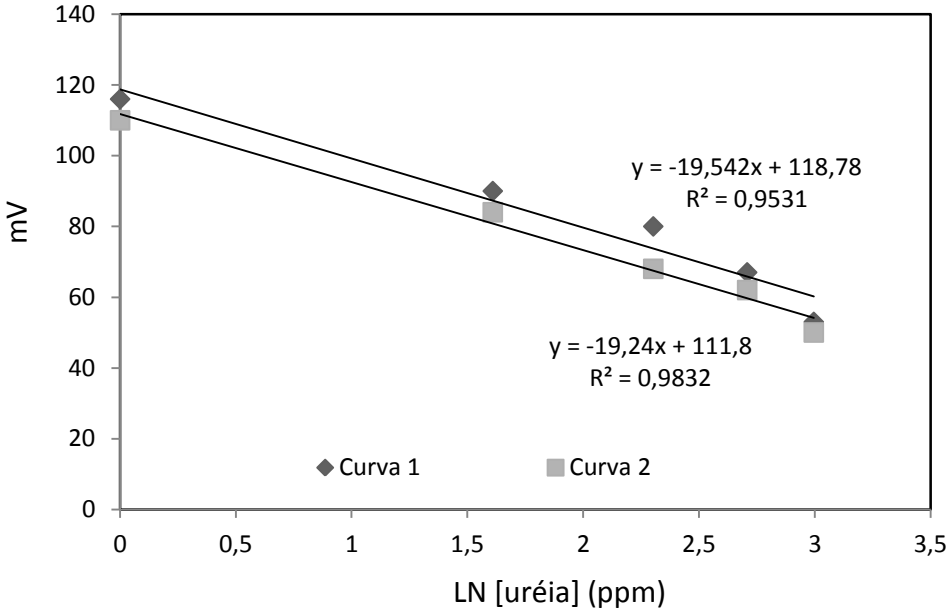

Figura 38: Curvas de calibração visando o estudo da repetibilidade da curva de calibração do instrumento em desenvolvimento, utilizando o primeiro transdutor. A curva 1 representa a primeira curva de calibração elaborada e a curva 2, a repetição da curva 1.

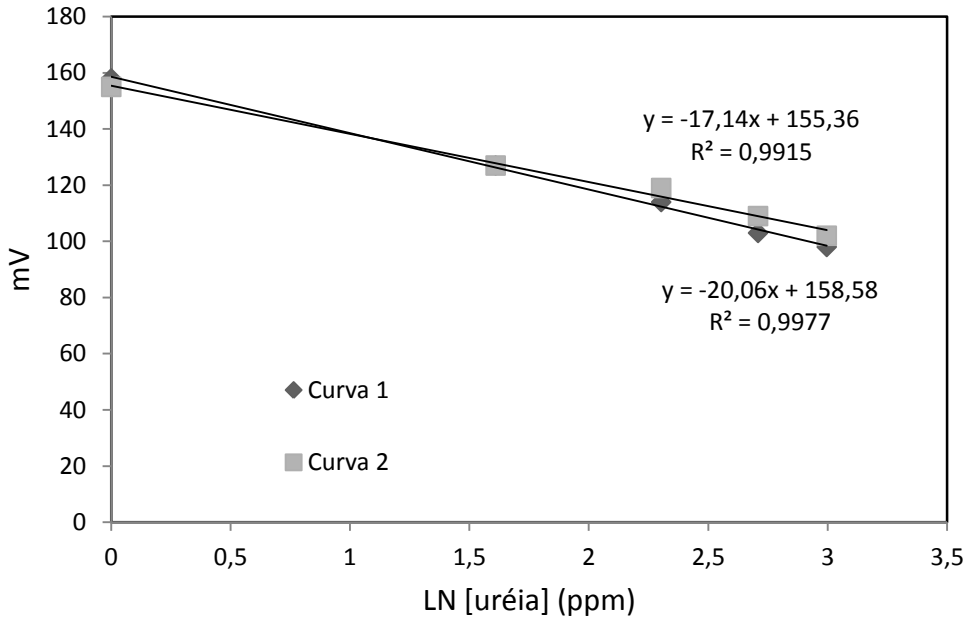

Figura 39: Curvas de calibração visando o estudo da repetibilidade da curva de calibração do biossensor potenciométrico, usando o segundo transdutor. A curva 1 representa a primeira curva de calibração elaborada e a curva 2, a repetição da curva 1.

6.2.5.5 Análise de perda de biocomponente imobilizado pela lavagem do sistema biossensor

A fim de analisar a possível perda do material biológico imobilizado decorrente da lavagem do sistema biossensor com água destilada entre as análises, foi realizada a quantificação de três alíquotas retiradas ao longo de 2 horas de lavagem conforme descrito na seção 5.4.9.4. Os resultados não mostraram valores significativos de proteína na solução de lavagem através do método de Lowry, mostrando não haver arraste do biocomponente imobilizado na tela de nylon. Desse modo, conclui-se que a vazão de escoamento da solução padrão de uréia para análise e da água destilada para a limpeza do sistema é adequada para o uso no projeto de biossensor potenciométrico.

6.2.5.6 Utilização do biossensor potenciométrico em amostra real

A Tabela 7 mostra os resultados encontrados quando se aplicou o biossensor potenciométrico para uréia em uma amostra real de vinhoto doada pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química/UFRJ. Decidiu-se adicionar uma concentração do analito que estivesse dentro da faixa de linearidade do instrumento construído, a fim de estudar o seu funcionamento. Além disso, por se tratar de uma matriz complexa, optou-se por diluí-lo 1000x, a fim de reduzir as concentrações dos diversos interferentes ao biocomponente, como fenóis.

Tabela 7: Resultados da aplicação do biossensor potenciométrico de uréia em uma amostra real.

Tempo de armazenagem da amostra em geladeira (dias)	Equação da Reta (curva de calibração do biossensor)	Amostra real (sem adição)	Amostra real (com adição de 10ppm de uréia)	Variação das concentrações estimadas pela curva de calibração
7	y = -6,411x + 105,33	8,00ppm	10,93ppm	2,93ppm
20	y = -4,6277x + 97,1	8,87ppm	13,66ppm	4,79ppm
23	y = -8,3291x + 152,82	15,48ppm	25,03ppm	9,55ppm

A observação dos resultados das análises realizadas da amostra real estocada ao longo de 23 dias, em geladeira, retrata um aumento do valor lido da concentração de uréia adicionada, indicando que algum(ns) componente(s) presente(s) na amostra real, que poderiam estar inibindo a urease presente no biocomponente imobilizado do sistema, estava(m) sofrendo processo de degradação ao longo dos dias de estocagem e os compostos gerados respondendo positivamente ao transdutor. A análise dos dados presentes na Tabela 7 mostra que o biossensor foi capaz de responder, qualitativamente, ao incremento de uréia (10ppm) na amostra real em todas as análises realizadas. Assim, o biossensor se mostrou promissor na aplicação ambiental, porém são necessários mais ensaios para sua aplicação em demais amostras reais.

A aplicação dos biossensores em amostras reais, principalmente na área ambiental, ainda é um desafio, sendo pouco observada na literatura, em comparação com outras áreas de estudo, encontrando apenas estudos com soluções padrão. As matrizes a serem analisada apresentam alta complexidade o que promove a interferência nas análises através, por exemplos, morte e/ou inibição do componente biológico presente no biossensor.

6.3 Resultados relativos ao tecido fúngico para aplicação no biossensor amperométrico para fenol

6.3.1 Extração enzimática e atividade tirosinásica do tecido fúngico

A extração da enzima tirosinase do tecido fúngico de *Agaricus bisporus* seguiu o protocolo desenvolvido por Kameda (2003). Além do sobrenadante inicial, o primeiro extrato enzimático, foi realizada uma segunda etapa de extração da enzima ainda contida na pasta obtida. Os resultados das atividades enzimáticas dos primeiro e segundo extratos dos lotes de cogumelos utilizados variaram de, aproximadamente, 611U.ml^{-1} a 1810U.ml^{-1}. Essa grande variação entre lotes de cogumelos também foi observada por Trejo-Hernandez *et al*. (2001) quando analisou a utilização de resíduos do cultivo de *Agaricus bisporus* como fonte da enzima lacase para oxidação de compostos fenólicos, encontrando valores de atividade enzimática variando de 120 a 1000 U.ml^{-1}.

A tirosinase proveniente de tecido fúngico, como é o caso de *Agaricus bisporus*, encontra-se no citoplasma (VAN GELDER *et al*., 1997). Portanto, a presença de maior atividade no segundo extrato enzimático em relação ao primeiro pode ser devido ao maior rompimento celular durante o processo de re-extração, facilitando a difusão da enzima do interior celular para o meio aquoso (extrato). Além disso, Ingebrigtsen *et al.* (1989) relataram que um fator que influencia a atividade da tirosinase no extrato é o grau de maturação dos cogumelos. Portanto, provavelmente, os cogumelos estavam em grau de maturação distinto.

Assim, a fim de minimizar as variações, decorrentes da atividade enzimática do biocomponente, na realização dos ensaios no desenvolvimento do biossensor amperométrico, optou-se por utilizar sempre o mesmo lote de cogumelos em cada parâmetro analisado.

6.3.2 Estudo do tempo de estabilidade do tecido fúngico liofilizado e tecido *in natura* embalado a vácuo

O tempo e o modo de estocagem do tecido fúngico cortado em cubos de 1cm de lado foram investigados através do percentual de remoção de fenol ao longo de 1 hora de reação. Os cogumelos íntegros e frescos, quando guardados em geladeira na embalagem em que foram comprados, duraram, no máximo, 5 dias, apresentando, em seguida, mau cheiro e aspecto desagradável. Assim, decidiu-se confinar o biocomponente, cortado em cubos, em embalagem apropriada, de poli nylon, a vácuo. O material armazenado durou 12 dias, visto que, após esse tempo, apesar de ainda possuírem atividade tirosinásica, não se apresentaram em condições de manuseio adequadas. A Figura 40 mostra o perfil de remoção de fenol pelo material biológico por 1 hora ao longo dos dias de estocagem em geladeira.

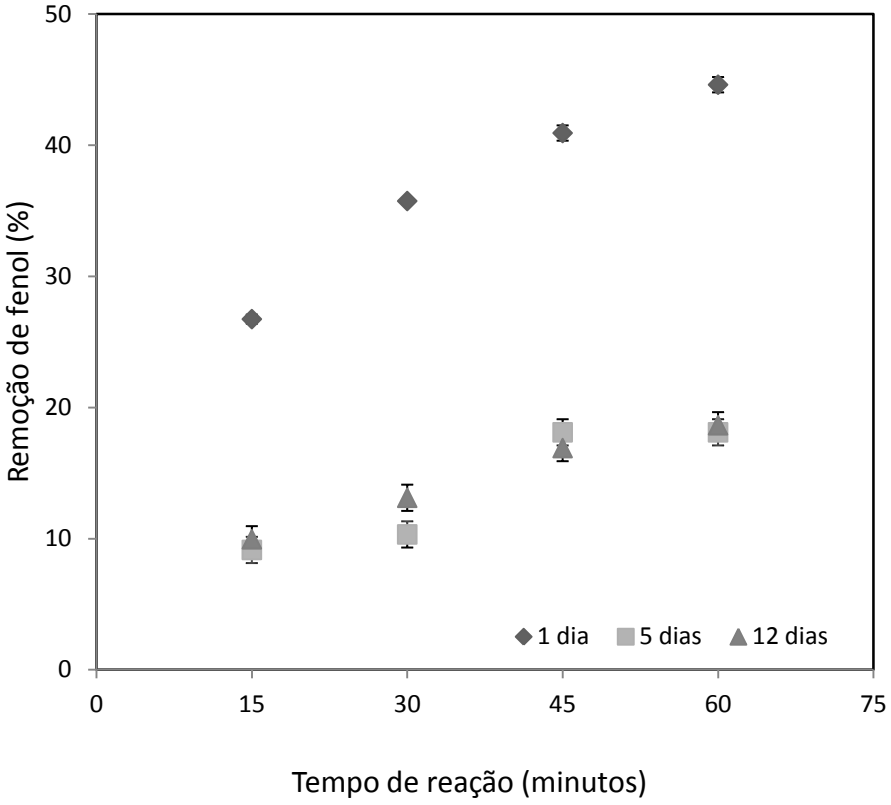

Figura 40: Remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação com os cogumelos *in natura* embalados a vácuo e estocados em geladeira.

Devido ao baixo tempo de estocagem do material biológico, por se tratar de um material altamente perecível, investigou-se a possibilidade da utilização do material biológico liofilizado. Para isso, analisou-se a influência da utilização do procedimento de liofilização no percentual de remoção de fenol, comparando os perfis mostrados na Figura 41.

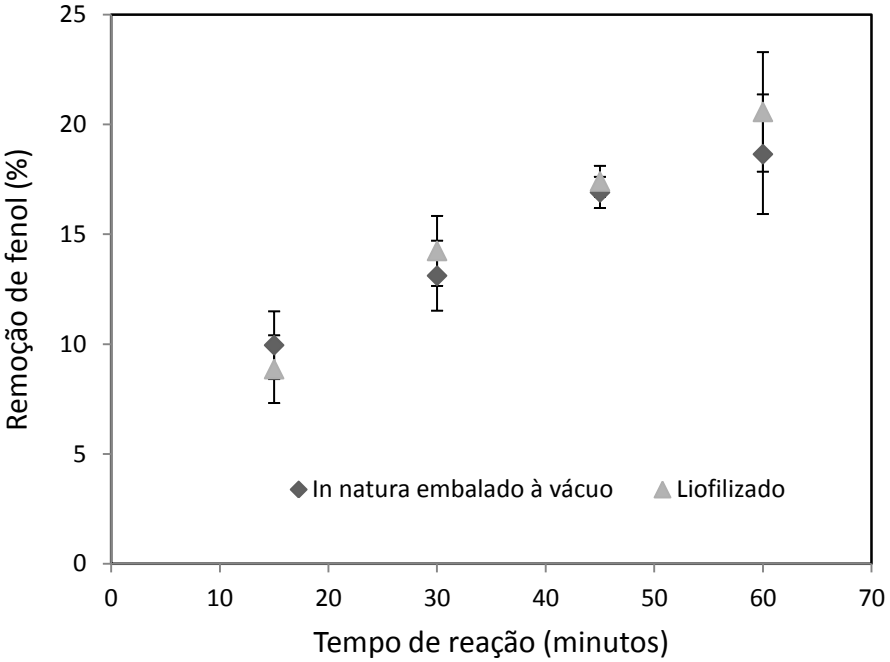

Figura 41: Comparação entre o percentual de remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação entre os cogumelos *in natura* embalados a vácuo e os liofilizados estocados em geladeira após 12 dias de adquiridos.

Pela análise das curvas da Figura 41, observa-se que não houve variação significativa entre os percentuais de remoção de fenol ao longo dos 60 minutos utilizando o biocomponente nas duas maneiras de preparo. Ademais, estudou-se a influência da liofilização no tempo de estocagem do material biológico em geladeira ao longo dos dias, os resultados são mostrados na Figura 42. Assim, após a análise de ambos os resultados, optou-se por se utilizar o material fúngico liofilizado nas análises posteriores e aplicação no biossensor amperométrico, visto que apresentou maior tempo de estocagem e, não mostrou diferença significativa na remoção de fenol em relação ao material *in natura* embalado a vácuo.

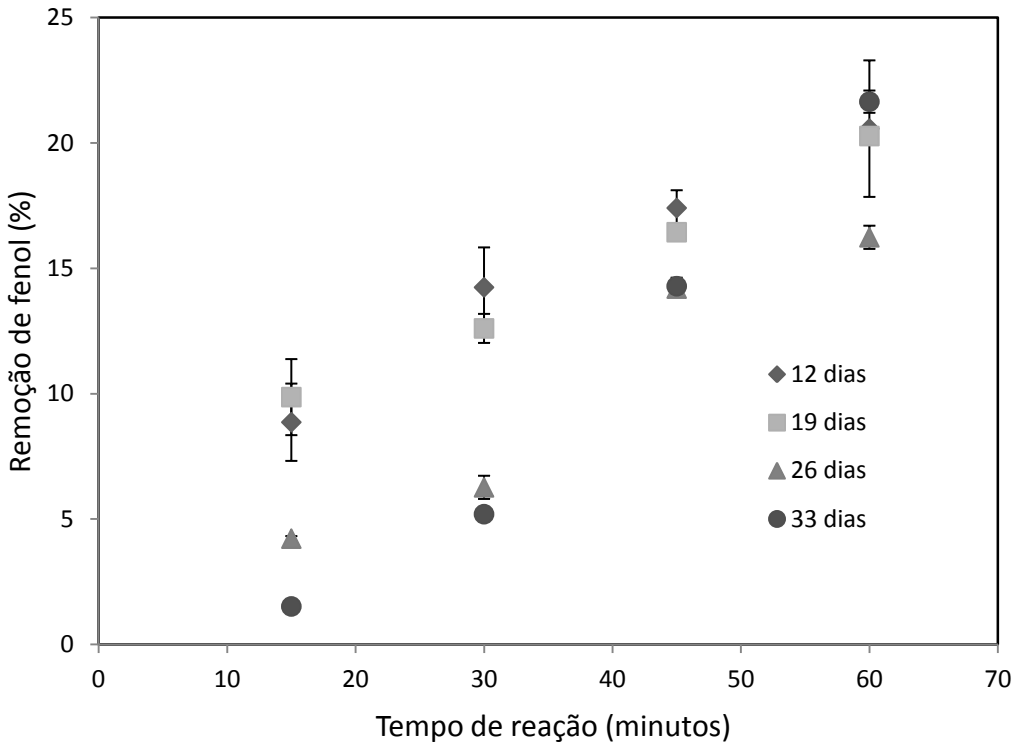

Figura 42: Ensaios preliminares do tempo de estocagem do tecido fúngico liofilizado em geladeira através da análise de remoção de fenol ao longo de 60 minutos de reação.

Posteriormente, com outro lote de cogumelos, utilizado nos ensaios de escolha dos melhores parâmetros do biossensor, foram realizados estudos do percentual de remoção em 60 minutos ao longo de 72 dias de estocagem do material liofilizado. Os resultados do tempo de vida útil do tecido fúngico liofilizado cortado em cubos de 1cm de lado através do seu percentual de remoção de fenol após 1 hora de ensaio são exibidos na Figura 43.

Os resultados mostram que, a remoção de fenol no tempo zero, usando os cubos de 1cm de lado de tecido fúngico *in natura*, mostraram um teor de remoção de 45,2% em 1 hora de reação. Ao longo 73 dias de estocagem em geladeira, houve uma queda acentuada no teor de remoção de fenol pelo biocomponente chegando ao valor de 3% no tempo final. Assim, optou-se por utilizar o material estocado até o período máximo de 23 dias.

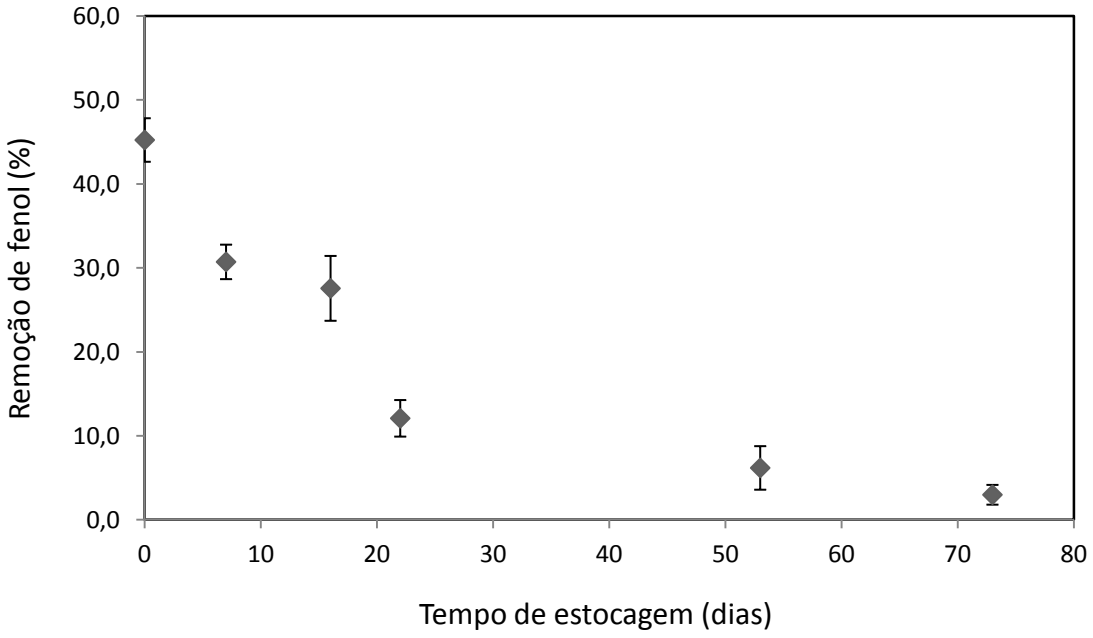

Figura 43: Ensaio do tempo de estocagem do tecido fúngico liofilizado em geladeira analisando a remoção de fenol ao final de 60 minutos de reação.

Posteriormente, a fim de escolher o melhor modo de estocagem do material liofilizado, o estudo de tempo de vida útil do material liofilizado foi estendido para outros modos de estocagem além da geladeira – congelador e temperatura ambiente. A Figura 44 mostra os resultados desse estudo, onde, conclui-se que a armazenagem em congelador foi o melhor método de estocagem, além de ratificar os baixos valores de remoção de fenol ao final de, aproximadamente, 2 meses, mostrados na Figura 43.

Esse comportamento de subidas e descidas visualizado na Figura 44 também foi observado no trabalho de Polesel *et al*. (2010) analisando o tempo de armazenamento da polpa e casca de berinjela (*Solanum melongena* L.) utilizados como fonte de catecolase.

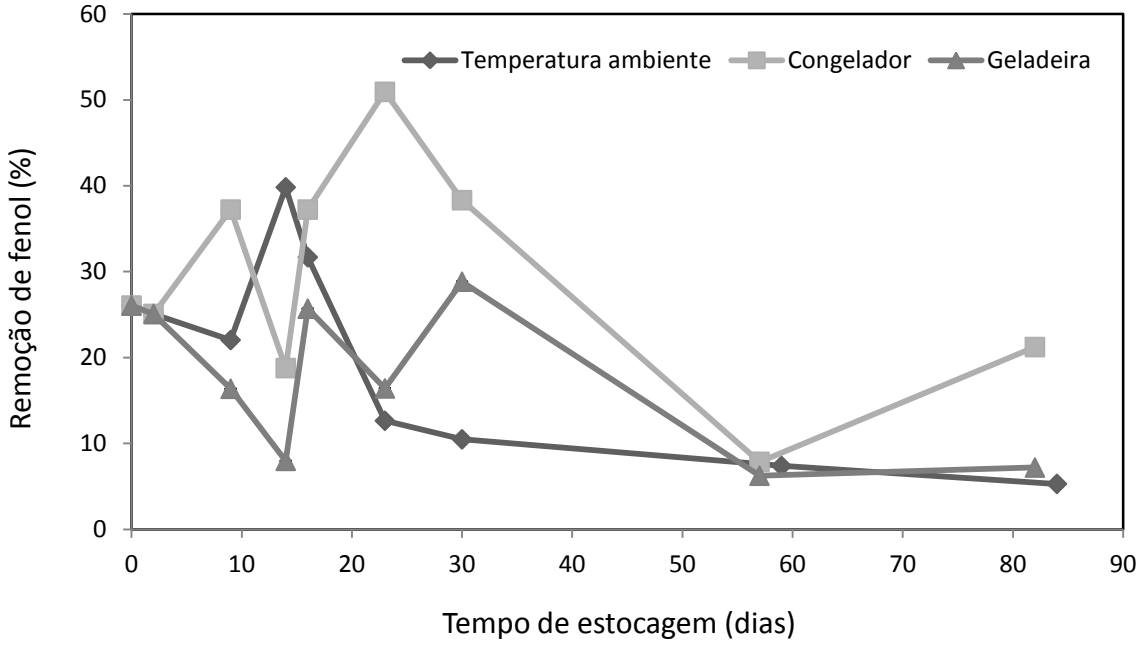

Figura 44: Estudo de melhor forma de estocagem (geladeira, congelador, temperatura ambiente - dissecador) dos cogumelos liofilizados usando como comparação o percentual de remoção de fenol ao final de 60 minutos de reação.

6.3.3 Funcionamento do biossensor amperométrico para quantificação de fenol

6.3.3.1 Estudo das melhores condições para a construção da curva de calibração do biossensor amperométrico para determinação de fenol

Analisando todas as seis possibilidades de combinação usando duas posições do biocomponente no sistema biossensor e três vazões de escoamento da solução de fenol (ml/min), apenas a configuração composta pela posição A e vazão de escoamento de 40ml/min (Figura 45) mostrou relação entre o aumento da variação de oxigênio dissolvido (mg/l) com o aumento da concentração de fenol (ppm) da solução padrão. Ademais, os melhores resultados foram encontrados quando o tempo de reação foi contabilizado após o enchimento completo da câmara reacional do biossensor. Assim como foi observado em Silva (2009), existe uma tendência de

aumento linear da variação de oxigênio com o aumento da concentração de fenol da solução padrão de análise a partir da concentração de 4ppm de fenol.

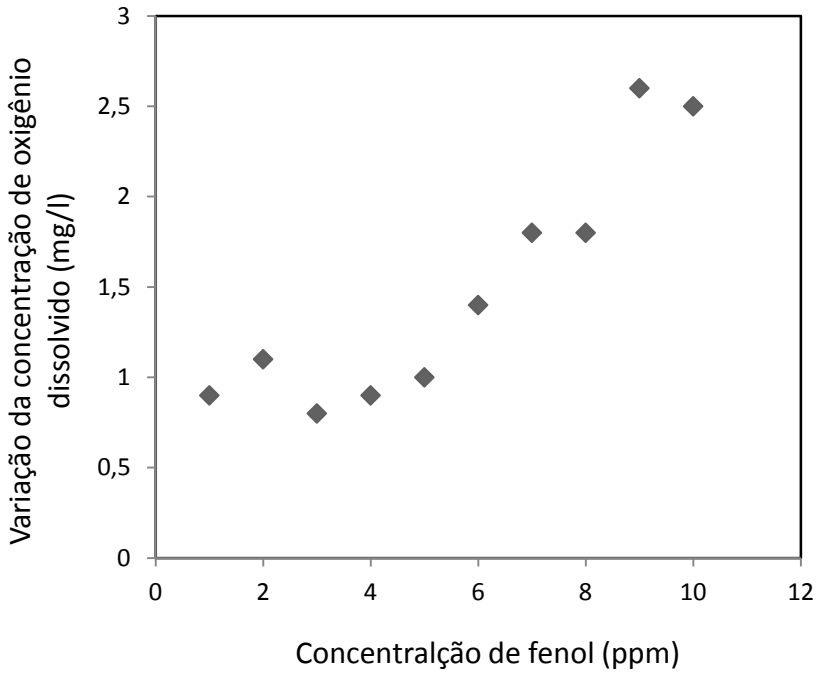

Figura 45: Relação entre a variação da concentração de fenol (ppm) e a variação de oxigênio dissolvido (mg/l) usando 5 minutos como tempo reacional do biocomponente na posição A do biossensor e vazão de escoamento da solução padrão de fenol de 40ml/min.

Posteriormente, outros ensaios foram realizados, buscando estudar a repetibilidade e reprodutibilidade da curva mostrada na Figura 45, a fim de estabelecer a faixa de linearidade do biossensor. No entanto, não se observou a repetibilidade dos dados usando tecido fúngico liofilizado de 1,0cm de lado sob as condições escolhidas.

O problema de baixa reprodutibilidade das características analíticas dos biossensores que utilizam tecido fúngico e vegetal é relatado na literatura por Fatibello-Filho & Vieira (2002), se agravando quando se tratam de polifenol oxidases devido à formação das quinonas que promovem diminuição na sensibilidade do sistema. Além disso, Rosatto *et al*. (2001) mostram que biossensores que utilizam eletrodo do oxigênio do tipo Clark apresentam a desvantagem de terem sua resposta influenciada por flutuações na concentração de oxigênio dissolvido resultantes de variações de pH, temperatura, força iônica ou pressão parcial. Portanto, percebe-se que desenvolver um

instrumento que utilize tecido fúngico e eletrodo de oxigênio como transdutor é uma tarefa difícil por estar suscetível a grande influência externa e dos próprios compostos inerentes ao biocomponente.

Assim, como não se conseguiu repetibilidade da curva mostrada na Figura 45, estudou-se a estabilização da resposta do oxigênio dissolvido ao longo do tempo quando foi carreada uma solução de fenol 10ppm pelo biossensor nas seis possibilidades de estudo (três vazões de escoamento da solução padrão de fenol e duas posições do biocomponente no sistema). Os resultados dos ensaios são mostrados nas Figuras 46 e 47.

Os melhores resultados foram encontrados quando o tecido fúngico foi colocado na posição A na câmara reacional, possivelmente devido à proximidade do transdutor com o biocomponente e, portanto, com a variação de oxigênio dissolvido decorrente da reação enzimática da tirosina. Dentre esses resultados, observou-se boa variação, em um menor espaço de tempo, usando a vazão de escoamento da solução padrão de 40ml/min. A estabilização ocorreu, nessas condições, no sexto minuto de reação. Assim, os ensaios seguintes foram feitos com os 3 parâmetros definidos (6 minutos de reação, 40ml/min e posição A), buscando uma relação entre a variação de oxigênio dissolvido e as concentrações de fenol (1 a 50ppm).

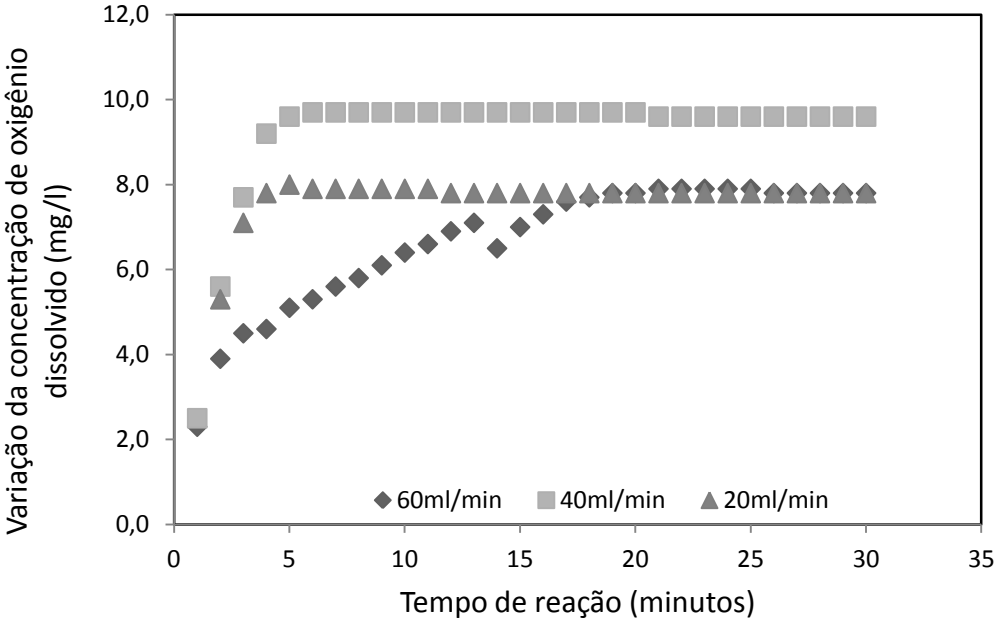

Figura 46: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente na posição A em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor usando as três vazões de escoamento estudadas.

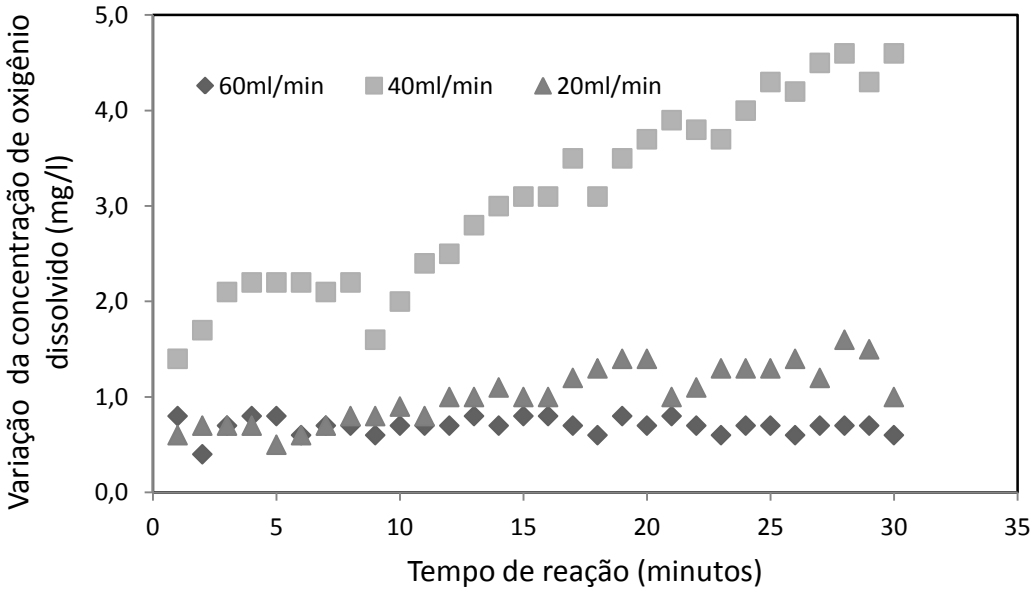

Figura 47: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente na posição B em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor usando as três vazões de escoamento da solução analisadas.

Os resultados referentes à análise da repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a uma concentração fixa de substrato, 10ppm de fenol, no biossensor são mostrados na Figura 48, utilizando três tempos reacionais. O tempo reacional de 6 minutos se mostrou o mais adequado a ser utilizado na configuração escolhida do biossensor amperométrico para fenol, visto que apresenta o menor desvio padrão entre as leituras, ±0,54mg/l. No entanto, vale ressaltar que o DPR encontrado, apesar de ter sido o menor entre os três tempos, é extremamente elevado (47,83%). Possivelmente, essa grande variação é decorrente do biocomponente e seu grau de maturação que tem sido observado desde o trabalho de Mestrado (SILVA, 2009).

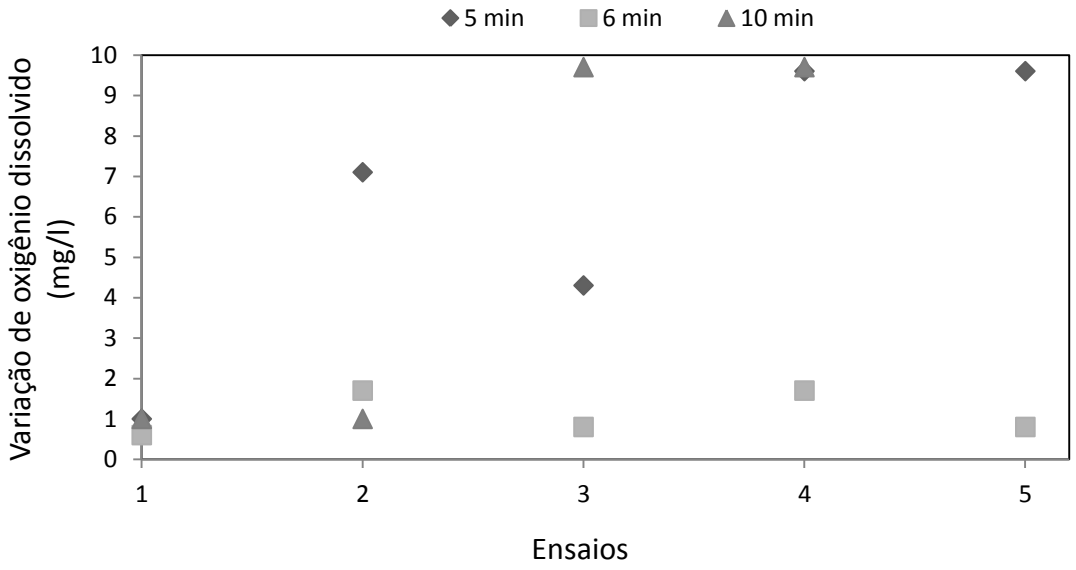

Figura 48: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/ml), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, utilizando três tempos reacionais: 5, 6 e 10 minutos.

O valor de tempo reacional determinado nesse trabalho é condizente com os demais trabalhos da literatura que utilizaram material vegetal ou fúngico *in natura* no desenvolvimento de biossensores. Uchiyama *et al.* (1988 *apud* FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002) utilizaram tecido de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea*) picadas e suportadas por uma membrana de diálise no desenvolvimento de biossensor para catecol, apresentando um tempo de resposta de 5-10 minutos. Timur *et al*. (2004) e

Abdullah *et al*. (2006), desenvolvendo seus respectivos biossensores para detecção de compostos fenólicos, encontraram o tempo de resposta de 5 minutos. Usando o mesmo transdutor do trabalho, Tomita *et al*. (2005) desenvolveram um biossensor amperométrico para ácido ascórbico, onde o melhor tempo de resposta foi de 60 segundos e o tempo de estabilização também foi de 60 segundos e, Campanella *et al*. (1993), usando 3mg de tirosinase colocados sob o transdutor, obtiveram um tempo de resposta de 2 minutos.

Os resultados da construção das curvas de calibração são mostrados na Figura 49. Essas foram traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando a variação do sinal de saída do eletrodo de oxigênio, em mg/l, para um determinado valor do sinal de entrada (faixa de concentração fenólica de 1 a 50ppm). A análise dos dados com o *software* STATISTICA Trial Version (StatSoft, Inc. 1984-2011) mostrou uma relação significativa (α=95%) entre os dados, com os R^2 acima de 0,93, em todas as três curvas na faixa de 5 a 25ppm de fenol, indicando que há uma relação direta entre o *input* (concentração de fenol) e *output* (variação do sinal do eletrodo de oxigênio).

Os trabalhos na literatura sobre biossensores que utilizam a tirosinase comercial imobilizada em diversas matrizes encontram a sua faixa linear na faixa de 10^{-9} a 10^{-4}M para diversos compostos fenólicos (KOCHANA *et al*., 2008a; ADAMSKI *et al*., 2010). O presente trabalho se encontra nessa faixa de concentração, mas, em relação à legislação brasileira, CONAMA 357/05, a faixa linear está acima do valor máximo aceito para descarte de efluentes que é de 0,5ppm.

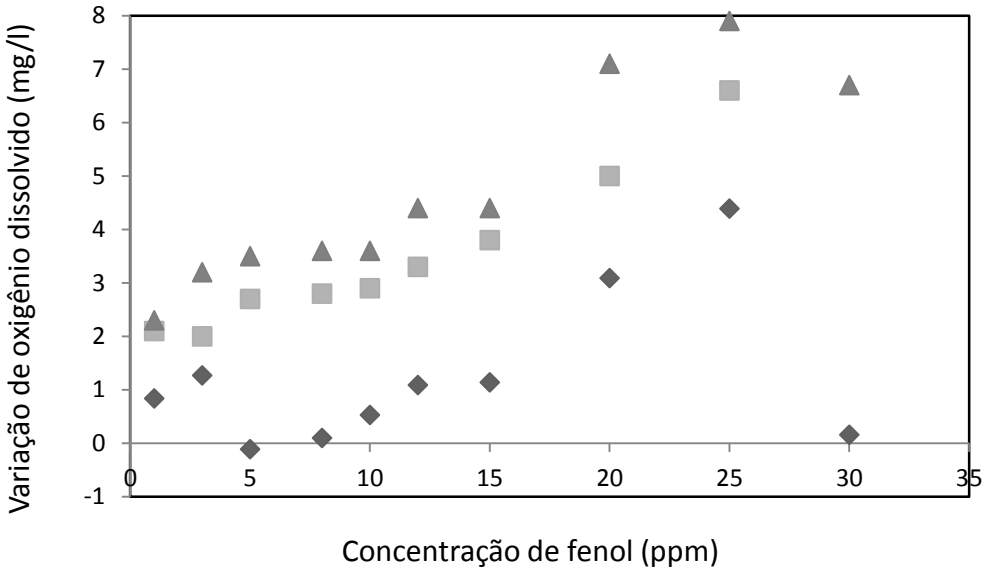

Figura 49: Curvas de calibração ascendentes do biossensor amperométrico utilizando as condições escolhidas (6 minutos de reação, vazão de 40ml/min e posição A do biocomponente na câmara reacional). Cada curva foi realizada com 5g de cogumelos liofilizados diferentes.

Apesar de ser observada uma linearidade em uma faixa de fenol, como mostrado na Figura 49, essa relação linear mostrada na referente figura não foi observada em todas as tentativas de construção da curva de calibração, mostrando que o biossensor na presente configuração apresenta baixa repetibilidade. Assim, buscou-se uma nova opção através do estudo da utilização do material liofilizado na forma de pó.

A repetibilidade do biossensor de TOPÇU *et al*. (2004) foi testada através da repetição do experimento por oito vezes, encontrando o valor baixíssimo de ± 0,002mM como desvio padrão. AKYILMAZ & DINCKAYA (2000) estudaram a repetibilidade do instrumento através da execução de dez repetições, encontrando um valor de desvio padrão de ± 0,23mM.

6.3.3.2 Análise da reutilização do biocomponente na construção da curva de calibração ascendente do sistema biossensor para quantificação de fenol

Os resultados dos ensaios que visaram estudar a reutilização do biocomponente na construção da curva de calibração do biossensor são mostrados na Figura 50. Além de se observar a não possibilidade de reuso do material biológico liofilizado, percebe-se que não há linearidade das curvas na faixa mostrada na Figura 49.

Assim, devido a não possibilidade de reuso, o tempo de vida útil do biocomponente em uso no biossensor não foi estudado. O tecido fúngico liofilizado foi descartado ao final do ensaio, tratando-se, portanto, de um material descartável. Na literatura, os poucos trabalhos que utilizam o material biológico *in natura*, faz seu uso na forma de extrato bruto imobilizado, apresentando tempo de vida útil de até 1 mês (SEZGINTÜRK *et al*., 2005; MARIN-ZAMORA *et al*., 2006).

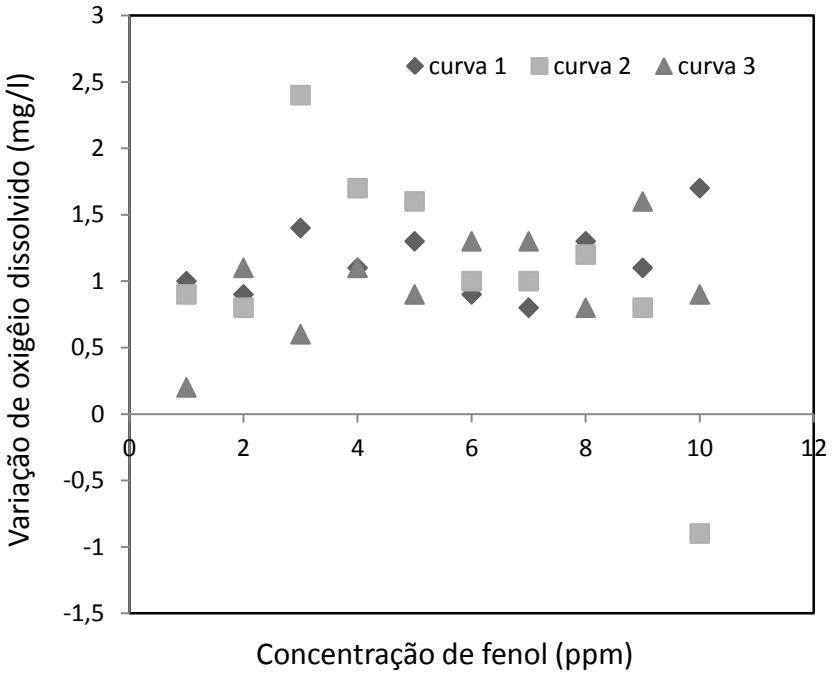

Figura 50: Ensaios visando o estudo da repetibilidade na construção da curva ascendente do biossensor amperométrico utilizando o mesmo biocomponente sob as condições escolhidas (6 minutos de reação, vazão de 40ml/min e posição A do biocomponente na câmara reacional).

6.3.3.3 Estudo do tempo de reação para a construção da curva de calibração do biossensor para fenol usando o pó de tecido fúngico liofilizado na posição A do sistema

Por não encontrar uma curva de calibração reprodutível usando a configuração do biossensor escolhida na seção 6.3.3.1, o cogumelo liofilizado cortado na forma de cubos de 1cm de lado na posição A do sistema, estudou-se a possibilidade da utilização do material biológico liofilizado em pó. Para isso, analisou-se o tempo de resposta de estabilização do eletrodo, quando se colocou 0,5g ou 1,0g do pó do biocomponente liofilizado na posição A do sistema e passou uma solução de 10ppm de fenol por ele. Os resultados são mostrados na Figura 51. A tendência de estabilização da resposta do eletrodo é observada aos 10 minutos e 13 minutos quando se utilizou 0,5 e 1,0g do biocomponente respectivamente.

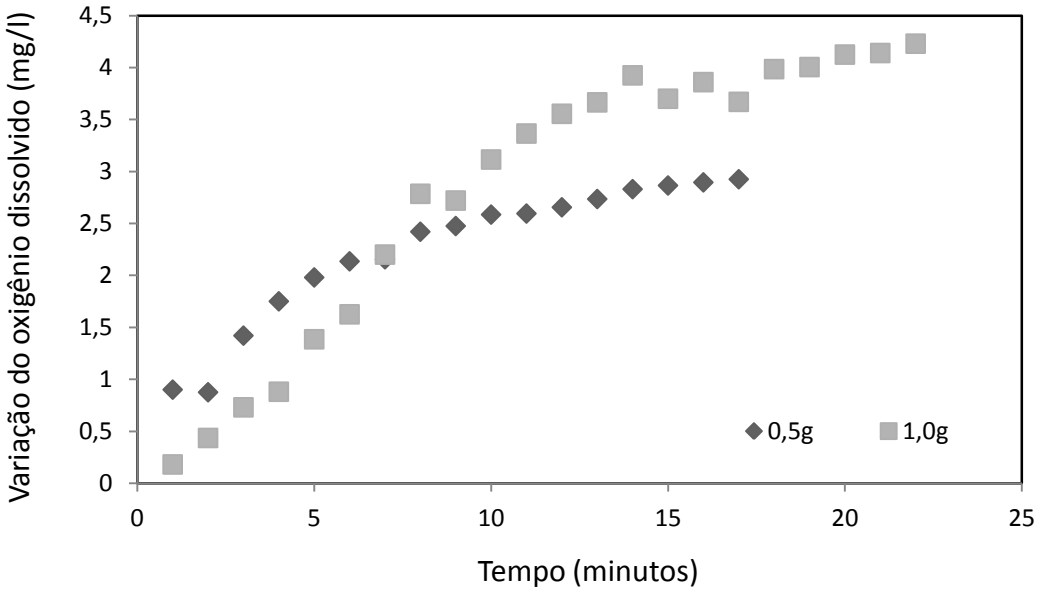

Figura 51: Tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio quando se colocou o biocomponente, em pó, na posição A em contato com solução de fenol 10ppm no biossensor.

Os resultados referentes à repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor são mostrados nas Figuras 52 e 53, utilizando três tempos reacionais para 0,5g e 1,0g do

biocomponente, respectivamente. A Tabela 8 mostra a análise da precisão dos dados mostrados nas figuras supracitadas.

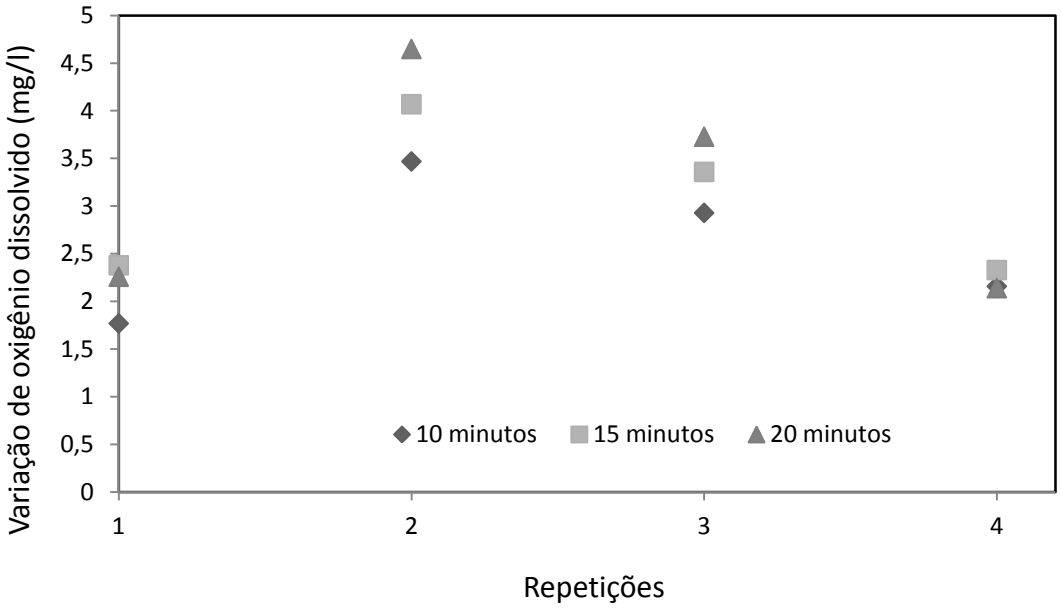

Figura 52: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, usando 0,5g de pó do biocomponente liofilizado, utilizando três tempos reacionais: 10, 15 e 20 minutos.

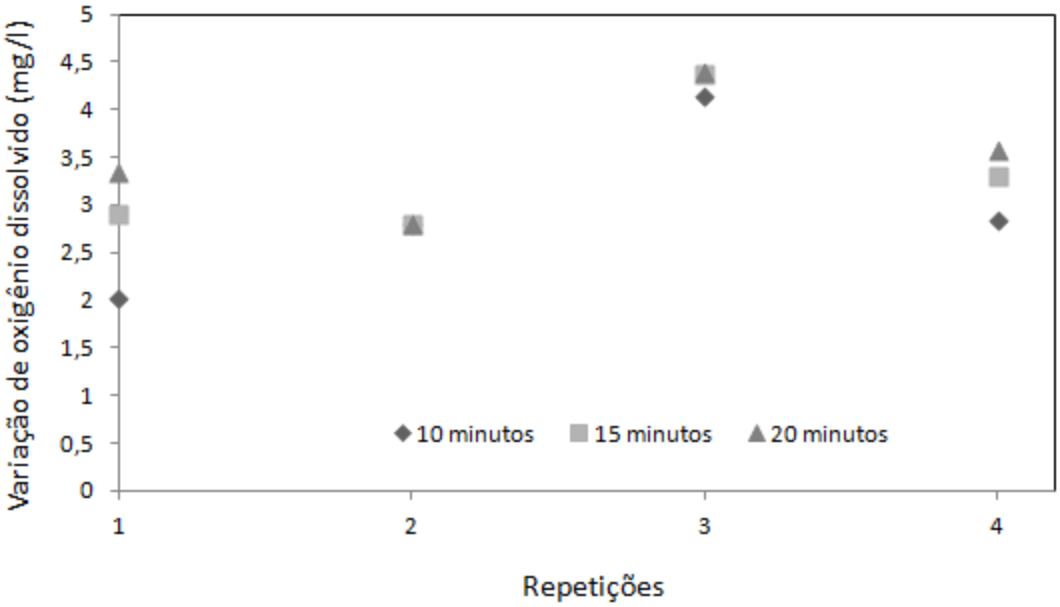

Figura 53: Repetibilidade da resposta do eletrodo, variação de oxigênio dissolvido (mg/l), frente a concentração de 10ppm de fenol, no biossensor, usando 1,0g de pó do biocomponente liofilizado, utilizando três tempos reacionais: 10, 15 e 20 minutos.

Tabela 8: Análise dos dados presentes nas Figuras 52 e 53.

0,5g de pó de cogumelo liofilizado		
Tempo (minutos)	**Desvio Padrão (mg/l)**	**DPR (%)**
10	0,76	29,55
15	0,84	27,59
20	1,21	37,86
1,0g de pó de cogumelo liofilizado		
Tempo (minutos)	**Desvio Padrão (mg/l)**	**DPR (%)**
10	0,88	29,95
15	0,73	21,71
20	0,66	18,74

Os desvios encontrados entre as leituras em ambas as Figuras 52 e 53 são maiores do que os encontrados quando se utilizou o biocomponente na forma de cubos de 1cm de lado, no entanto, a precisão das leituras foi maior, encontrando a melhor precisão quando se utilizou 1,0g do biocomponente e o tempo de 20 minutos. Assim, apesar do tempo reacional ser maior do que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura, novos testes são necessários para se estudar a faixa linear e construir a curva de calibração do biossensor, utilizando soluções padrão de fenol, dessa nova configuração (1,0g do pó do biocomponente na posição A e tempo de resposta de 20 minutos).

CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES

7.1 Biossensor potenciométrico para uréia

O material biológico escolhido para a confecção do biossensor potenciométrico para uréia, o feijão de porco, apresentou teor de umidade de, aproximadamente, 11,4% ± 0,17%. O baixo teor de água explica o longo de tempo de vida útil dos feijões que estão armazenados desde 2003 quando foram doados pela empresa Sementes na Terra & Produtores Associados. Quando estocados na forma de pó, escolheu-se como mais apropriado o armazenamento em frasco hermeticamente fechado, a temperatura ambiente, por, aproximadamente, 30 dias. No entanto, quando o material biológico esteve na forma imobilizada em tela de nylon e, em uso no biossensor, entre as leituras diárias, a estocagem em congelador e, envolto em papel filme de PVC, por 8 dias, foi a mais adequada.

No desenvolvimento do biossensor, utilizou-se o eletrodo íon-seletivo a amônio como transdutor e *Canavalia ensiformis*, na forma de pó imobilizado em tela de nylon, como fonte da urease. Com a utilização do primeiro eletrodo, a concepção do projeto teve melhor desempenho quando se utilizou o tempo de resposta de 5 minutos e vazão de escoamento da solução padrão de 40ml/min. A faixa linear encontrada para as curvas ascendentes foi de 1 a 20ppm de uréia, no entanto, problemas na leitura do eletrodo, como exemplo, histerese, provocaram curvas descendentes não lineares nessa faixa de substrato. O componente biológico usado no instrumento apresentou vida útil de 72 dias, não sendo confiável quando aplicado em amostras reais. Já, quando se utilizou o segundo eletrodo, o biossensor apresentou melhor desempenho, utilizando tempo de resposta do transdutor de 15 minutos e vazão de escoamento da solução padrão de 40ml/min. A faixa linear das curvas ascendentes e descendentes foi de 1 a 20ppm, visto que o fenômeno de histerese não provocou variação significativa ao nível de significância de 95%. A vida útil do componente biológico do biossensor foi de 70 dias e, quando aplicado em amostra real, o vinhoto, apresentou aplicação promissora ao indicar, qualitativamente, com o aumento da resposta do biossensor, a

adição do analito de estudo (10ppm de uréia) a amostra real. Vale ressaltar que ambos os projetos apresentaram boa repetibilidade, mostrando-se instrumentos baratos e de fácil manuseio.

7.2 Biossensor amperométrico para fenol

Os cogumelos, *Agaricus bisporus*, escolhido como fonte da tirosinase para desenvolvimento do biossensor amperométrico para fenol, são altamente perecíveis, apresentando teor de umidade de, aproximadamente, 93,5% ± 5,7%. A alta porcentagem de água indicou que o procedimento de liofilização era indicado para aumentar o tempo de estocagem do biocomponente. Por não se observar diferença entre a remoção de fenol entre o material liofilizado e *in natura*, escolheu utilizar esse procedimento no material biológico aplicado ao biossensor. Ademais, a armazenagem em congelador foi escolhida como o melhor método de estocagem por, no máximo, 2 meses.

Visando construir um biossensor barato e de simples concepção, utilizou o biocomponente supracitado liofilizado e na forma de cubos de lado de 1cm (5g) e o eletrodo de oxigênio como transdutor. No projeto de biossensor montado, a melhor concepção foi encontrada quando se utilizou vazão de escoamento das soluções padrão de fenol de 40ml/min; tempo de resposta de 6 minutos; e o biocomponente liofilizado foi colocado na posição A do sistema, região mais próxima ao posicionamento do eletrodo de oxigênio. Apesar de ter sido encontrada uma faixa de linearidade durante a construção da curva ascendente de calibração, 5 a 25ppm de fenol, a repetibilidade do instrumento foi baixa. Desse modo, foi preciso investigar nova forma de utilização do material biológico, o pó do biocomponente imobilizado, na quantidade de 1,0g, que apresentou boa precisão (DPR de 18,74%) nas leituras da solução padrão de fenol, utilizando tempo de estabilização do eletrodo de 20 minutos. Assim, o biossensor amperométrico ainda não teve sua melhor confecção escolhida, precisando ainda mais ensaios para verificar sua futura aplicação em amostras ambientais reais.

7.3 Comparação entre os biosssensores desenvolvidos durante a Tese

A Tabela 9 é um resumo comparativo dos projetos de biossensor desenvolvidos ao longo da Tese – os biossensores potenciométricos para uréia, usando os dois transdutores, e o biossensor amperométrico para fenol.

Tabela 9: Comparação entre os projetos de biossensor desenvolvidos ao longo da Tese.

Parâmetros	**Projetos de biossensor**		
	Uréia		**Fenol**
Transdutor	eletrodo íon-seletivo a amônio		eletrodo de oxigênio
	1° transdutor	2° transdutor	
Material biológico	0,2g de pó de *Canavalia ensiformis* imobilizado em tela de nylon com glutaraldeído 12,5%		5g de *Agaricus bisporus* cortados na forma de cubos de 1cm de lado e liofilizados
Posição do material biológico no sistema	N.R		Posição A (mais próxima ao transdutor)
Temperatura	Temperatura ambiente (24°C ±1°C)		
pH da solução padrão	6,0		8,0
Fluxo de escoamento da solução (ml/min)	40		
Tempo reacional (minutos)	5	15	6
Faixa linear da curva ascendente (ppm)	1-20		5-25
Faixa linear da curva descendente (ppm)	N.E	1-20	N.R
Tempo de vida útil (dias)	72	70	material descartável
Repetibilidade	sim	sim	não
Reprodutibilidade	sim	sim	não
DPR (%)	8,30	3,20	47,83

DP (mg/l)	4,00	3,20	0,54
Aplicação real	N.R	em amostra de vinhoto com atuação qualitativa promissora	N.R

Onde:

N.R: não realizado;

N.E: não encontrado;

DP: desvio padrão.

CAPÍTULO 8 SUGESTÕES

8.1 Biossensor potenciométrico para uréia

Como sugestões para a continuação dos ensaios com o projeto de biossensor montado, tem-se:

- ✓ Aplicar o biossensor potenciométrico a base de urease de *Canavalia ensiformis* em outras amostras reais, ambientais ou de demais interesses, como leite e cosméticos;
- ✓ Comparar o instrumento desenvolvido com a metodologia clássica de análise utilizada;
- ✓ Estudar a possibilidade de desenvolver o transdutor íon-seletivo a amônio, visando minimizar os interferentes e o fenômeno de histerese, além de permitir a miniaturização do instrumento.

8.2 Biossensor amperométrico para fenol

Como sugestões para a continuação do desenvolvimento do projeto de biossensor em desenvolvimento, tem-se:

- ✓ Buscar a faixa de linearidade e construir a curva de calibração do biossensor, utilizando o biocomponente fúngico lioflizado na forma de pó, 1,0g, na posição A do sistema, vazão de escoamento de 40ml/min das soluções padrão e 20 minutos de tempo de resposta do transdutor;
- ✓ Aplicar o biossensor amperométrico em outros compostos fenólicos de interesse ambiental, além do fenol, como o bisfenol A;
- ✓ Aplicar o biossensor desenvolvido em amostras reais ambientais, avaliando os possíveis interferentes;
- ✓ Comparar o instrumento desenvolvido com a metodologia clássica de análise utilizada (teste colorimétrico);

- ✓ Escolher uma nova fonte natural, barata e rica em tirosinase que seja menos perecível que o tecido fúngico de *Agaricus bisporus*, caso todas as possibilidades de uso com o presente biocomponente sejam esgotadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, J. et al. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 604-609, 2006.

ADAMSKI, J.; NOWAK, P.; KOCHANA, J. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 2363–2367, 2010.

AKYILMAZ, E.; DINCKAYA, E. A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum. **Talanta**, v. 53, p. 505–509, 2000.

ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2008.

AMEER, Q.; ADELOJU, S.B. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, n. 1, p. 5-11, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 18 ed., Inc. New York, 1992.

ARAUJO, R.F.F. **Aplicação de polímeros como matrizes no desenvolvimento de biossensores e na purificação de proteínas**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

ARNOLD, M.A.; GLAZIER, S.A. Jack bean meal as biocatalyst for urea biosensors. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 5, p. 313-318, 1984.

ARNOLD, M.A.; RECHNITZ, G.A. Biosensors based on plant and animal tissue. In: TURNER, A.P.F.; KARUBE, I.; WILSON, G.S. **Biosensors: Fundamentals and Applications**. New York, Oxford University Press, 1987. p. 30-59.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1083-1100, 2008.

ATLOW, S.C.; BONADONNA-APARO, L.; KLIBANOV, A.M. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. **Biotechnology and Bioengineering***,* v. 26, p. 599-603, 1984.

AZONANO. **Biosensors Market to Reach $6.1 Billion by 2012**. 2008. Disponível em <http://www.azonano.com/news.aspx?newsID=8571> acesso em 10 jul. 2011.

BERTOCCHI, P.; COMPAGNONE, D.; PALLESCHI, G. Amperometric ammonium ion and urea determination with enzyme-based probes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 1-2, p. 1-10, 1996.

BEVILAQUA, J.V. **Utilização de tirosinase de** *Agaricus bispora* **no tratamento de efluente contendo fenóis**. 2000. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BRASIL. Portaria MS n. 518. Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Resolução Conama n. 357. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005.

CAMPANELLA, L. et al. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. **Analyst**, v. 118, p. 979-986, August, 1993.

CAMPOS, C.F.et al. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation***,* v. 20, p. 487-500, 1996.

CASTILHO, T.J. **Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores**. 2003. 126 f.Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CESTARI, A.R. et al. Factorial design evaluation of some experimental factors for phenols oxidation using crude extracts from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 260-265, 2002.

CHAGAS, A.P. A síntese da amônia: alguns aspectos históricos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 240-247, 2007.

CHIRIZZI, D.; MALITESTA, C. Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electrosynthesized poly (*o*-phenylenediamine) film with buffering capability. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 157, n. 1, p. 211-215, 2011.

CLARK, L.C.; JR LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962.

CLUBE DE ENGENHARIA. Disponível em <http://www.clubedeengenharia.org.br/> acesso em 18 dez. 2008.

COMERLATO, M.H. **Imobilização de enzimas no suporte de crisotila**. 1995. 100 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

COOKSEY, C.J. et al. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. **Journal of Biological Chemistry***,* v. 272, n. 42, p. 26226-26235, 1997.

DANIELSSON, B. et al. Fermenter monitoring and control by enzyme thermistors, **Advances in Biotechnology***,* v. 1, p. 445-453, 1981.

DHAWAN, G.; SUMANA, G.; MALHOTRA, B.D. Recent developments in urea biosensors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 42-52, 2009.

DI FUSCO, M. et al. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta**, v. 81, n. 1-2, p. 235-240, 2010.

DIXON, N. E. et al. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) metalloenzyme. Simple biological role for nickel. **Journal of American Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, p. 41-69, 2003.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, p. 149–156, 2008.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 30, p. 953-971, 2000.

EGGENSTEIN, C. et al. A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, p. 33-41, 1999.

FARIA, R.O. **Análise de polissacarídeos e tirosinase de** *Lentinula boryana* **(Berk & Mont) Pegler: um macrofungo com potencial biotecnológico**. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FARIA, R.O. et al. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 287-294, 2007.

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

FATIBELO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FENOLL, L. G. et al. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable *o*-quinones. **Biochimica et Biophysica Acta/Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1548, p. 1-22, 2001.

FERNANDES, J.C.B.; KUBOTA, L.T.; NETO, G.O. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 120-130, 2001.

FERNANDES, J.R. et al. Use of sorghum seed tissue as a biocatalyst in a stirred reactor for oxalic acid determination. **Analytical Communications**, v. 33, p. 397-399, 1996.

FERNANDES, R. **Adsorventes alternativos para remoção de fenol em solução aquosa**. 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
FIORENTINO, D. et al. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2033-2037, 2010.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 18-28, 2008.

FOLLMER, C. et al. Canatoxin, a toxin protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC. 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, v. 360, p. 1357-1363, 2001.

FOLLY, R.O.M. Projeto e desempenho de um biossensor de glucose. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

FREE, A.H.; FREE, H.M. A simple test for urine bilirubin. **Gastroenterologia**, v. 24, p. 414-416, 1953.

FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Electrochemical biosensor-based devices for continuos phenols monitoring in environmental matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n. 4, p. 456-462, 2002.

FUHRMANN, B.; SPOHN, U.; MOHR, K-H. Enzymatic assays based on the coulometric microflow titration of ammonia and carbon dioxide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 9, p. 653-660, 1992.

GUERRA, R.R. **Aspectos biológicos e estruturais das ureases de** *Canavalia ensiformis*. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GUILBAULT, G.G.; MONTALVO, J. Urea specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, p. 2164-2569, 1969.

HEDAYATOLLAH, G.; AHMAD, M.R.; HOSSEIN, E. A conductometric urea biosensor by direct immobilization of urease on Pt electrode. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 55-63, 2004.

HICKS, G.P.; UPDIKE, S.J. The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis. **Analytical Chemistry**, v, 38, n. 6, p. 726–730, 1966.

HOIRE, H.; RECHNITZ, G.A. Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin. **Analytica Chimica Acta**, v. 306, p. 123-127, 1995.

HUANG, Y.; WU, F. Plant tissue-based chemiluminescence biosensor for ethanol. **Analytical Sciences**, v. 22, p. 965-969, July, 2006.

INGEBRIGTSEN, J.; KANG, B.; FLURKEY, W.H. Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. **Journal of Food Science***,* v. 54, n. 1, p. 128-131, 1989.

JHA, S.K.; TOPKAR, A.; D'SOUZA, S.F. Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 1145-1150, 2008.

JOBIM, C.C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p. 101-119, 2007.

JUNIOR, L.R. **Construção e avaliação de biossensor potenciométrico para determinação de uréia, com eletrodo íon-seletivo a amônio, usando** *Canavalia brasiliensis* **com fonte enzimática**. 1995. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

JUNQUEIRA, M.S. **Conservação do cogumelo shiitake por congelamento**. 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

KAMEDA, E. **Estudo do processo de obtenção de extrato enzimático de** *Agaricus bisporus* **para remoção de fenol em efluente sintético**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

KARUBE, I.; NOMURA, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 10, p. 177-181, 2000.

KIM, G.Y. et al. Improvement of an enzyme electrode by poly(vinyl alcohol) coating for amperometric measurement of phenol. **Talanta**, v. 71, p. 129-135, 2007.

KOCHANA, J. et al. Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1275-1281, 2008a.

KOCHANA, J. et al. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. **Microchemical Journal**, v. 89, p. 171-174, 2008b.

KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A.M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 138-145, 2009.

KUTSCHENKO, F. et al. Análise potenciométrica – um levantamento histórico, princípios e aplicações. **Iniciação científica CESUMAR**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2005.

LOUZADA, E.S.; LUCCAS, P.O.; MAGALHÃES, C.S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, n. 11, p. 52-56, Jun./Jul., 2004.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosas como fonte natural da enzima urease. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 191-194, 2001.

MANA, H.; SPOHN, U. Selective flow injection procedures for the determination of nitrogen containing analytes by gasdialytic-fluorimetric detection of enzymatically generated ammonia. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, n. 1-2, p. 93-104, 1996.

MANAHAN, S.E. **Environmental Chemistry**. 6 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994, 811 p.

MANZI, P. et al. Comercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food chemistry**, v. 84, p. 201-206, 2004.

MARIN-ZAMORA. M.E. et al. Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on d-sorbitol cinnamic ester. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 295–303, 2006.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of encimes immobilized on epoxy-activated supports by favoring aditional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.

MATSUMOTO, K.; YAMADA, K.; OSAJIMA, Y. In: **Analytical Chemistry**, 1981, p. 53.

MELLO, L.D., KUBOTA, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**, v. 72, p. 335–348, 2007.

MELO, A.F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MOCCELINI, S.K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C. Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 381-387, 2008.

MOHAPATRA, D. et al. Development and validation of a model to predict enzymatic activity during storage of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* spp.). **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 39-48, 2008.

NARANG, J. et al. A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, doi:10.1016/j.molcatb.2011.06.016., 2011

NIKOLELI, G-P.; NIKOLELIS, D.P.; METHENITIS, C. Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 58-63, 2010.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química. Nova***,* v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA, K.C.S. **Desenvolvimento de um biossensor potenciométrico à base de soja, para determinação de uréia**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

OZCAN, H.M.; SAGIROGLU, A. A novel amperometric biosensor based on banana peel (*Musa cavendish*) tissue homogenate for determination of phenolic compounds*.* **Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 208-214, 2010.

PAGLIAI, R.L. **Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PAITAN, Y. et al. On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. **Biotechnology Advances**, v. 22, p, 27-33, 2003.

PANDEY, P.C.; PANDEY, V.; MEHTA, S. A glucose sensor based on graphite paste modified with tetracyanoquinodimethane. **Indian Journal of Chemistry A**, v. 32, p. 667-672, 1993.

PANPAE, K.; KRINTRAKUL, S.; CHAIYASIT, A. Development of a urea potentiometric biosensor based on gelatin-immobilized urease. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v. 40, p. 74-81, 2006.

PAPA, G. et al. *Agaricus bisporus* tyrosinase [monophenol monooxygenase] - I. Progress made in preparative methods *International* **Journal of Biochemistry***,* v. 26, n. 2, p. 215-221, 1994.

PASSOS, C.T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de** *Aspergillus* sp. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2006.

PATACAS, R.C. **Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2007.

PEREIRA et al. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2007. 24 p.

PEREZ, E.F. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato**. 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PERONE, C.A.S.; QUEIROZ, A.S.; DALOSSO, V.M. Determinação de paracetamol (acetaminofenol) em produtos farmacêuticos usando um biossensor de polifenol oxidase, obtida de extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 133-139, 2007.

PINTO, A.C.S.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Otimização das condições de reação de um biossensor de uréia usando tecido vegetal de feijão de porco imobilizado em membrana de nylon. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 2007, Curitiba. **Anais**: 2007. v. 1, p. 312.

PINTO, A.C.S.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Otimização de um biossensor de uréia usando tecido vegetal de feijão de porco (*Canavalia ensiformis dc*) e estudo dos parâmetros cinéticos da enzima presente no tecido vegetal. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 2008, Recife.

PINTO, A.C.S.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Otimização de um biossensor de uréia usando tecido vegetal de feijão de porco (*Canavalia ensiformis dc*) e estudo dos parâmetros cinéticos da enzima presente naturalmente neste tecido imobilizado em suporte de PVC e com glutaraldeído. In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 2009, Natal.

POLACCO, J.C.; HOLLAND, M.A. Roles of urease in plant cells. **Internacional Review of Cytology**, v. 145, p. 65-103, 1993.

POLESEL, D.N.; SINHORINI, A.L.C.; PERONE, C.A.S. Caracterização cinética da enzima catecolase (polifenol oxidase) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28, n. 2, p. 175-180, 2010.

PORRAS, F.C. **Sistema de medida baseado em ISFETs (Ion Sensitive Field Effect Transistor) para determinação de ácidos e bases em soluções aquosas**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

POSTAL, M. **Estudos para identificação de tecidos alvos das ureases da** *Canavalia ensiformis* **em** *Dysdercus peruvianus*. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PORTACCIO, M. et al. A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 9, p. 2003-2008, 2010.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, P.J.F. **Desenvolvimento de um sensor potenciométrico para ibuprofeno**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RIGUEIRA, R.J.A.; LACERDA FILHO, A.F.; VOLK, M.B.S. Avaliação da qualidade do feijão armanezado em ambiente refrigerado. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n.4, p. 649-655, 2009.

ROMANI, A. et al. Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric bisensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1197-1203, 2000.

ROS, J.R.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N.; GARCIA-CANOVAS, F. Tyrosinase: kinetics analysis of transient phase and steady state. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1204, p. 33-42, 1994.

ROSA, L.H. Dossiê técnico: cultivo de cogumelos comestíveis. **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais**, CETEC, Maio, 2007.

ROSATTO, S.S. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada**. 2000. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

SALGADO, A.M. **Biossensor enzimático para determinação de sacarose**. 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SALGADO, A.M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SANCHEZ-FERRER, A. et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochimica and Biophysica Acta***,* v. 1247, p.1-11, 1995.

SANTOS, L.G. Resposta técnica: Ministério da Ciência e Tecnologia, Rio Grande do Sul, SENAI/RS – Departamento Regional, 2005.

SANTOS DE ARAUJO, B. et al. Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. **Chemosphere**, v.63, n. 4, p. 642-651, 2006.

SCOGNAMIGLIO, V. et al. Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. **Microchimica Acta**, v. 170, p. 215–225, 2010.

SEO, S.Y.; SHARMA, V.K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, n. 10, p. 2837-2853, 2003.

SEZGINTÛRK, M.K.; DINÇKAYA, E. A novel amperometric biosensor based on spinach (*Spinacia oleracea*) tissue homogenate for urinary oxalate determination. **Talanta**, v. 59, p. 545-551, 2003.

SEZGINTÛRK, M.K.; DINÇKAYA, E. Development of a biosensor for controlling of thiourea in fruit juices. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 128-134, 2010.

SEZGINTÛRK, M.K.; GÔKTUG, T.; DINÇKAYA, E. Detection of benzoic acid by an amperometric inhibitor biosensor based on mushroom tissue homogenate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 43, n. 4, p. 329-334, 2005.

SHAN, D. et al. A highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. **Sensors and Actuators B**, v. 134, p. 1016-1021, 2008.

SIGNORI, C.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor amperométrico de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorhiza*). **Química Nova**, v. 17, n. 1, p. 38, 1994.

SILVA, A.F. **Construção de eletrodos Ag/Ag_2S de configuração convencional, com membrana sinterizada e não sinterizada, para determinação potenciométrica de sulfeto em fluxo**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SILVA, F.C. et al. Desenvolvimento preliminar de um biossensor tecido para monitoração de uréia. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife.

SILVA, L.M.C. **Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de** *Agaricus bisporus* **como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol**. 2009. 134 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, L.M.C.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. *Agaricus bisporus* as a souce of tyrosinase for phenol detection for future biosensor development. **Environmental Technology**, v. 31, n. 6, p. 611 – 616, 2010.

SILVA, L.M.C.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Development of an amperometric biosensor for phenol detection. **Environmental Technology**, v. 32, n. 5, p. 493 – 497, 2011a.

SILVA, L.M.C.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Amperometric biosensor for phenol determination. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 1249-1254, 2011b.

SILVA, L.M.C. et al. Development of potentiometric urea biosensor based on *Canavalia ensiformis* urease. In: INTECH International Offices- Mirla Cvijc-Pier Andrea Serra. (Org.). **Biosensors – Emerging Materials and Applications**, book 1, 1ed.· Rijeka-Croatia: Intech International Offices, 2011c, v. 1, p. 01-14.

SILVA, R.L.L. **Remoção de cor de efluente sintético com cogumelos** *Agaricus bispora*. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SINGH, M. et al. Urea biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, p. 345-351, 2008.

SIRKO, A.; BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica***,* v. 47, n. 4, p. 1189-1195, 2000.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Analytical Chemistry: An Introduction**, 6 ed., Saunders: Chicago, 1994.

SMIDERLE, F.R**. Caracterização estrutural de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de** *Pleurotus pulmonarius* **e aplicações**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências: Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 357-64, 2002.

SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, p. 435-441, 1926.

TEMBE, S. et al. Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 80–85, 2007.

THÉVENOT, D.R. et al. Eletrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.

THUSU, R. Strong growth predicted for biosensors market. Sensors, October 1, 2010. Disponível em:< http://www.sensorsmag.com/specialty-markets/medical/strong-growth-predicted-biosensors-market-7640>. Acesso em 18 abril 2011.

TIMUR, S. et al. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. **Sensors and Actuators B**, v. 97, p. 132–136, 2004.

TOMITA, I.N. et al. Amperometric biosensor for ascorbic acid. **Eclética Química**, v. 30, n. 2, p. 37-43, 2005.

TOPÇU, S.; SEZGINTÜRK, M.K.; DINÇKAYA, E. Evaluations of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 592-597, 2004.

TORRES, K.Y.C. **Desenvolvimento de um eletrodo íon-seletivo para cálcio e sua aplicação em FIA na análise de soro sanguíneo**. 2001. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

TREJO-HERNANDEZ, M.R.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; RAMIREZ, R.Q. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compouns. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 635-639, 2001.

TRIVEDI, U.B. et al. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. **Sensors and Actuators B**, v. 140, p. 260–266, 2009.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Biosensors for environmental monitoring**, March, 2003.

VAN GELDER, C.W.; FLURKEY, W.H.; WICHERS, H.J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. **Phytochemistry***,* v. 45, n. 7, p. 1309-1323, 1997.

VAN LEEUWEN, J.; WICHERS, H. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. **Mycological Research**, v. 103, p. 413-418, 1999.

VELASCO-GARCIA, M.N.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. **Biosystems Bioengineering**, v. 84, p. 1-12, 2003.

VERMA, N.; SINGH, M. A disposable microbial based biosensor for quality control in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p.1219-1228, 2003.

VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, p.681-689, 2002.

VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova***,* v. 26, n. 1, p. 39-43, 2003.

VOSTIAR, I. et al. Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe. **Bioelectrochemistry**, v. 56, n. 1-2, p. 113-115, 2002.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WICHERS, H.J.; GERRITSEN, Y.A.M.; CHAPELON, C.G.J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus.* **Phytochemistry***,* v. 43, n. 2, p. 333-337, 1996.

YILDIZ, H.B. et al. Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer. **Microchimica Acta**, v. 159, p. 27–34, 2007.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZEJLI, H. et al. Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol–gel immobilization. **Analytica Chimica Acta**, v. 612, p. 198-203, 2008.

ZHANG, S.; ZHAO, H.; JOHN, R. A dual-phase biosensig system for the determination of phenols in both aqueous and organic media. **Analytica Chimica Acta**, v. 441, p. 95-105, 2001.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. **Bioorganic Chemistry**, v. 19, p. 116-131, 1991.