

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ENGENHARIA  
DO MEIO AMBIENTE – PPGEMA/ UFG

ELI JOSÉ MIRANDA RIBEIRO JÚNIOR

**APRIMORAMENTO DE BIOSSENSOR DE LACASE PARA DETERMINAÇÃO  
DE MICROPOLUENTES FENÓLICOS EM ÁGUAS CONTAMINADAS**

Goiânia/2015

ELI JOSÉ MIRANDA RIBEIRO JÚNIOR

**APRIMORAMENTO DE BIOSSENSOR DE LACASE PARA DETERMINAÇÃO  
DE MICROPOLUENTES FENÓLICOS EM ÁGUAS CONTAMINADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

**Área de Concentração:** Recursos Hídricos, Saneamento Ambiental, Engenharia Sanitária.

**Orientador:** Prof. Dr. Eric de Souza Gil

**Co-orientador:** Prof. Dr. Paulo Sérgio Scalize

Goiânia /2015

## RESUMO

A lacase é uma enzima polifenoloxidase que catalisa a oxidação de compostos fenólicos nas correspondentes quinonas. A corrente obtida neste processo redox pode ser usada para a análise quantitativa da concentração dos fenóis na água. Neste trabalho, é proposto o uso de um biossensor modificado para a determinação de fenol. O biossensor de pasta de carbono com sílica funcionalizada foi modificado com glutaraldeído e um extrato enzimático de fungos "*Pycnoporus sanguineus*" como uma fonte de lacase. O efeito da pasta de carbono e da composição de electrólito, permite trabalhar com pH compreendido entre 3,0 - 8,0, e um potencial inicial entre 0,55 - 0,25mV. A velocidade de varrimento foi de 5 a 25mV s<sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 10 a 60mV, estudando-se na resposta voltamétrica de pulso diferencial. Uma correlação linear de R<sup>2</sup> = 0,9946 foi obtida para o teor de fenol (catecol) na gama de concentrações de 50 a 500nMol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 30nMol L<sup>-1</sup>. Este biossensor foi utilizado para a determinação de diferentes tipos de compostos fenólicos, apresentando uma melhor resposta para o catecol.

**Palavras-chave:** Biossensor. Lacase. Micropoluentes fenólicos. Catecol. *Pycnoporus sanguineus*. Sílica funcionalizada.

## ABSTRACT

Laccase is a poliphenoloxidase enzyme that catalyzes the oxidation of phenolic compounds in the corresponding quinones. The current obtained in this redox process can be used for quantitative analysis. In this work, a carbon paste biosensor modified gluteraldehyde functionalized silica and an enzymatic extract of the "*Pycnoporus sanguineus*" fungi as a lacase source is proposed for phenol determination. The effect of carbon paste and electrolyte composition, pH from 3,0 to 8,0, start potential from 0,55 to 0,25mV, scan rate from 5 to 25 mV s<sup>-1</sup> and potential pulse amplitude from 10 to 60mV on the differential pulse voltammetric response was investigated. A linear correlation of R<sup>2</sup> = 0,9946 was obtained for the phenol content (catechol) in the concentration range from 50 to 500nMol L<sup>-1</sup>, with a detection limit of 30nMol L<sup>-1</sup>. This biosensor was used for the determination of different kinds of phenolic compounds, presenting a better response for catechol.

**Keywords:** Biosensor. Laccase. Phenolic micropollutants. Catechol. *Pycnoporus sanguineus*. Functionalised silica.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>12</b>
2.1	Biossensores para Análise Ambiental.....	12
2.1.1	Classificação dos biossensores.....	13
2.1.2	Biossensores baseados em enzimas.....	17
2.1.3	Biossensores amperométricos baseados em lacase.....	18
2.1.4	Imobilização de enzimas.....	19
2.1.5	Organofuncionalização da sílica.....	20
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>21</b>
3.1	Geral.....	21
3.1.1	Específicos.....	211
<b>4</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>22</b>
4.1	Produção de Enzima Lacase.....	222
4.2	Materiais e Reagentes.....	22
4.3	Sílica Funcionalizada.....	22
4.4	Preparações do Biossensor.....	23
4.5	Ensaio Eletroquímico.....	23
4.6	Tratamento dos dados Eletroquímicos.....	24
<b>5</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
5.1	Síntese e Caracterização da Sílica Modificada.....	25
5.2	Estabilidade, Sensibilidade e Tempo de Resposta.....	27
5.3	Ensaio de Afinidade.....	28
5.4	Parâmetros Experimentais.....	28
5.4.1	Efeito do potencial e repetibilidade.....	28
5.4.2	Curvas de calibração.....	29
5.5	Determinação de Fenol Água Superficial.....	30
5.6	Determinação de Fenol em Águas de Lavagem.....	31
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Referências.....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Anexo.....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gerações de biossensores amperométricos .....	16
Figura 2: Reações bioquímicas de fenol oxidases representativas.....	18
Figura 3: Processo de síntese utilizado para produzir SIN.....	25
Figura 4: Isotérmicas de adsorção de nitrogênio a partir de sílica .....	26
Figura 5: Estado sólido NMR pelo espectro Si-29.....	26
Figura 6: Resposta dos biossensores de pasta de carbono.....	27
Figura 7: Ensaio de aplicação do biossensor em amostra real .....	29
Figura 8: Curva de calibração .....	30
Figura 9: Efluente coletado em posto de combustível.....	31
Figura 10: Ensaio de aplicação do biossensor BSGL em amostra real.....	32

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de classificação de biossensores não comportamentais ...	13
Tabela 2: Características dos tipos de biossensores .....	14
Tabela 3: Classes de enzimas com base em suas reações bioquímicas.....	17
Tabela 4: Recuperação dos valores adicionados nas mostras .....	31

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**μL:** microlitro

**APTES:** 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES)

**BSGL:** Biossensor de Sílica funcionalizada com Glutaraldeído e Lacase

**(I):** Corrente

**h:** altura

**LOD:** limites de detecção

**mg L<sup>-1</sup> :** miligramas por litro

**ml:** mililitros

**mV:** milivolts

**PAHs:** Hidrocarbonetospoliaromáticos

**PC:** Pasta de carbono

**PCL:** Pasta de Carbono Lacase

**(E):** potencial

**ppm:** parte por milhão

**(R):** resistência

**SPR:** Ressonância Plasmon de Superfície

**s:** segundos

**SiGlu:** sílica funcionalizada com glutaraldeído

**USEPA:** United States Environmental “Protection Agency”

**VPD:** Voltametria de Pulso Diferencial



## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Agência Nacional das Águas (2011), a qualidade dos recursos hídricos mundiais está sob ameaça à medida que aumentam os aglomerados humanos e conseqüentemente se expandem as atividades industriais e agrícolas sem o devido planejamento ambiental.

Em decorrência do elevado nível de urbanização, cria-se um cenário em que as mudanças climáticas poderão provocar grandes alterações no ciclo hidrológico. Sendo assim, o tratamento de água para abastecimento público passa a ser um desafio que deve ser conduzido à busca de alternativas que possibilitem garantir a qualidade da água (MIERZWA et al., 2008).

Os critérios adotados para assegurar a qualidade da água, têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que, se propriamente implementadas junto à população, garantirão a segurança do fornecimento de água por meio da eliminação ou redução à concentração mínima de constituintes na água conhecidos por serem perigosos à saúde (D'AGUILA et al., 2000).

Dentre os que representam riscos ambientais estão inclusos metais pesados e uma grande variedade de poluentes orgânicos, hidrocarbonetos poliaromáticos IE (PAHs), hidrocarbonetos halogenados, compostos fenólicos, herbicidas, pesticidas, drogas e outras substâncias químicas com atividade toxicológica, mutagênica ou cancerígena.

De acordo com Bielicka-Daszkiwicze colaboradores (2004), o sério problema ambiental está relacionado às características do fenol, devido à elevada solubilidade em água juntamente com a alta reatividade. Tanto por via aeróbia como por anaeróbia o fenol é tóxico, embora seja biodegradável, isso para a maioria dos microorganismos, principalmente para os não aclimatados em concentração de  $10\text{mgL}^{-1}$ , sendo inibidor do desenvolvimento para espécies que o utilizam como substrato, podendo trazer problemas em estações de tratamento de efluentes.

O fenol e seus derivados são prejudiciais ao meio ambiente. Possuem efeito tóxico cumulativo tanto em plantas como em animais penetrando facilmente em membranas celulares, provocando mutações, comprometimento hepático e também afetando reações bioquímicas, respiração e fotossíntese.

Os compostos fenólicos podem afetar ainda o gosto e odor em água potável, mesmo em pequena quantidade. Dentre os compostos fenólicos; os mais tóxicos são nitro-fenóis e cloro-fenóis(RUSSELL e BURTON, 1999; ORTEGA et al., 1994).

Em face desta diversidade, o desenvolvimento de ferramentas analíticas sensíveis e de baixo custo deve ser prioridade. No contexto do monitoramento da qualidade da água e solo, pode-se fazer uso de biossensores, que são capazes de determinar espécies poluentes químicas, físicas ou biológicas com robustez e precisão.

Biossensores são dispositivos analíticos que permitem a detecção de compostos específicos, aliando agentes de reconhecimento biológico altamente seletivos a transdutores físicos adequados(SOUZA, 2001; AMINE et al., 2006).

O biossensor pioneiro, desenvolvido por Clark e Lyons (1962)possuía princípio amperométrico baseado em enzimas, destinado à detecção de glicose. Desde a década de 1970 até os dias atuais o campo de aplicação de biossensores vem sendo desenvolvidos. Dentre as vantagens destes estão: baixo custo, portabilidade, robustez, sensibilidade, seletividade (VAN DER LELIE et al., 1994).

A interação entre componente biológico seletivo e substância a ser analisada resulta num sinal bioquímico que se transforma via transdutor em resposta elétrica amplificada e processada de forma convenientemente pelo sistema instrumental(GRAHAM e MOO-YOUNG, 1985; LOWE, 1990).

A seletividade de um biossensor a uma molécula alvo depende do agente biológico empregado. Dentre estas, merece destaque as enzimas. A transdução eletroquímica é o método mais popular, geralmente empregando técnicas potenciométricas ou amperométricas.

Por sua vez a concentração do analíto é proporcional ao sinal gerado, que pode ser segundo transdutor potenciométrico, piezelétrico, amperométrico, óptico, condutimétrico, etc.(LOWE, 1990).

A combinação da seletividade da enzima para o reconhecimento de um determinado analíto com a transdução direta da velocidade da reação biocatalítica para um sinal de corrente, permite uma determinação rápida, simples e direta de vários compostos.

Assim os biossensores são hoje aplicados em diversificadas áreas e setores como: mineração, segurança militar, engenharia, agricultura e ambiental, bem como para uma diversidade de analítos incluindo íons, gases, produtos voláteis, hormônios, proteínas, etc.

Atualmente, no site da United States Environmental “Protection Agency” (USEPA) é possível encontrar métodos de análises baseados em biossensores, reconhecidos e regularizados, para análises de patógenos e substâncias tóxicas em águas e solos.

Exemplos incomuns de biossensores comerciais para aplicações ambientais são produzidos pela Bioacore AB, Uppsala da Suécia e Spreetas do Texas Instruments Inc., Dallas, EUA (SADANA, 2006).

Entretanto, dado às mudanças constantes no meio ambiente o desempenho dos biossensores pode ser comprometido, por perda da atividade e redução da vida útil (ROGERS, 1995; BATZIASeSIONTOURO, 2007).

Deste modo, o estudo de novos tipos de transdutores e sistemas de biorreconhecimento permanece aberto (RODRIGUEZ-MOZAZ, ALDA e MARCO, 2005; LUONG, MALE e GLENNON; 2008).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOSSENSORES PARA ANÁLISE AMBIENTAL

A emissão de poluição é cada vez mais presente nas atividades produtivas, por isto é preciso que a legislação ambiental crie um rigoroso controle e monitoramento confiável de poluentes no ar, solo, e principalmente na água (DENNISON e TURNER, 1995; SADANA, 2006).

Devido à contaminação ambiental diversificada que causa riscos ambientais cada vez maiores, torna-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para uso em campo para análise de poluentes como: hidrocarbonetos poliaromáticos IE (PAHs), hidrocarbonetos halogenados, compostos fenólicos, herbicidas, pesticidas ou drogas.

Embora a análise ambiental tenha experimentado grandes avanços na extração e procedimentos de pré-concentração, microfluídica, design de chips, sistemas de detecção, engenharia e software, fatores como alto custo e lentidão nos tempos de resposta, mantém em aberto as necessidades de pesquisas associadas ao monitoramento ambiental de poluentes (SADANA, 2006). Além disso, fatores como confiabilidade, simplicidade, robustez e custo relativo afetam a seleção de métodos (ROGERS e WILLIAMS, 1995).

Sendo assim, a junção de componentes biológicos de reconhecimento como células inteiras ou biomoléculas a transdutores de sinal, representa uma forma de ultrapassar os métodos tradicionais. Surgem então dispositivos capazes de fornecer resultados em tempo real, simples de usar, portáteis e de baixo custo (ROGERS, 1995; RODRIGUEZ-MOZAZet al.; 2005; BATZIASeSIONTOURO, 2007).

A utilização de novos materiais para a construção de biossensores, juntamente com o uso de técnicas distintas de imobilização de materiais biológicos, constituem uma gama de potencialidades que podem ser empregadas na área de biossensores, que está em constante desenvolvimento (SANTOS, 2014).

Biossensores podem ser desenvolvidos para uso em locais estratégicos viabilizando o monitoramento de compostos tóxicos *in loco* (ROGERS, 1995). Estes dispositivos podem detectar substâncias individuais ou grupos de

substâncias de interesse ambiental (por exemplo, emissões industriais, pesticidas, inseticidas), bem como os efeitos biológicos (como a genotoxicidade, toxicidade imunológica e respostas endócrinas) (ROGERS; 1995; BATZIAS e SIONTOURO, 2007).

Por sua vez, a gama de analitos alvo, os metais pesados (IVASK, VIRTÁ, e KAHRU, 2002), dioxinas (SHIMOMURA et al., 2001), fenóis (WANG e CHEN, 1995), surfactantes (NOMURA et al., 1998), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (D'AGUILA et al., 2000), nitratos (GLAZIER, CAMPBELL e CAMPBELL, 1998) gases (GIL et al., 2002), desreguladores endócrinos (GOBI et al., 2004), antibióticos (PATEL et al., 2002), pesticidas (TSCHMELAK, PROL e GAUGLITZ, 2005) dentre outros materiais tóxicos de interesse da defesa (PADDLE, 1996).

### 2.1.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser classificados consoantes diferentes critérios. A destacar princípio de interação, tipo agente de reconhecimento e sistema de transdução. Como se mostra na tabela 1.

**Tabela 1:** critérios de classificação de biossensores não comportamentais

<b>Critério</b>	<b>Classes</b>
Modo de interação	Catalítico Afinidade
Elemento de reconhecimento	Enzimático Imunossensores Biossensores baseados em DNA Biossensores baseados em organelas Biossensores baseados em células inteiras Biossensores baseados em tecidos
Sistema de transdutor	Eletroquímica Óptico Piezo-elétrico Térmico Nanomecânico

Fonte: RUMAYOR et al., 2005.

Quanto aos componentes biológicos de reconhecimento, os biossensores podem ser baseados em tecidos, células, enzimas, anticorpos ou DNA (VAN DER LELIE et al., 1994).

Entretanto a forma mais conveniente utilizada para classificar biossensores se baseia no sistema de transdução.

De acordo com o elemento de transdução (tabela 2), os biossensores podem ser divididos nas categorias seguintes: eletroquímicos, ópticos, térmicos, microelecronicos, piezo-eléctricos, magnéticos e manométricos (RODRIGUEZ- MOZAZ et al., 2005; SERRA, ZORIS e HALL, 2006).

**Tabela 2:** características dos tipos de biossensores

Biossensor	Sistema de transdução	Características
Eletroquímicos	Amperométrico	Mede corrente quando é aplicado sobre-potencial requerido para um processo redox é aplicado. (GRIESHABER et al., 2008)
	Potenciométrico	Mede diferença de potencial entre eletrodo de referência e eletrodo íon seletivo.
	Condutimétrico	Mede mudanças da condutância da solução entre eletrodos
	Impedanciométrica	Detecta variação da impedância no eletrodo sensor. (wang, 1999)
Ópticos	Ressonância Plasmon de Superfície (SPR)	As ondas de luz são guiadas por meio de fibras ópticas para detectores apropriados (MACCRAITH et al., 1995; GERARD et al., 2002).
Térmicos	Bioluminescência	A luz emitida pelas bactérias de detecção é proporcional às concentrações de poluentes. (PAITAN, 2004).
	Alteração de entalpia	Reações bioquímicas envolvem uma este é o princípio básico de biossensores térmicos (GERARD et al., 2002, MOSBACH, 1991).
Microeletromecânicos (microcantilevers)	Interações biomoleculares, quando combinado com uma plataforma microcantilever.	A frequência de ressonância de um microcantilever varia sensivelmente com adsorção molécula (RAITERI et al., 2002; HANSEN, 2005).
Piezo-eléctricos	Sinais eléctricos por meio de ondas sonoras	Capacidade de alguns cristais em gerar corrente eléctrica por resposta a uma pressão mecânica (VARELA et al., 2000).

Magnéticos	A seletividade do agente biológico acoplado a NMPs	Detector magnético (BASELT et al., 1998). DNA/RNAm, proteínas, enzimas, fármacos, agentes patogênicos e células tumorais (PEDANO e RIVAS, 2003).
Manométricos	Enzimas que consomem ou envolvem um gás	Transdução manométrica pode ser explorada pela conexão de com baixa solubilidade em meio aquoso (SERRA et al., 2006).

Os biossensores eletroquímicos seguidos pelos ópticos são as abordagens mais empregadas. Neste trabalho foi escolhido o método de transdução eletroquímica devido a sua capacidade de aplicação para o monitoramento da qualidade da água em loco

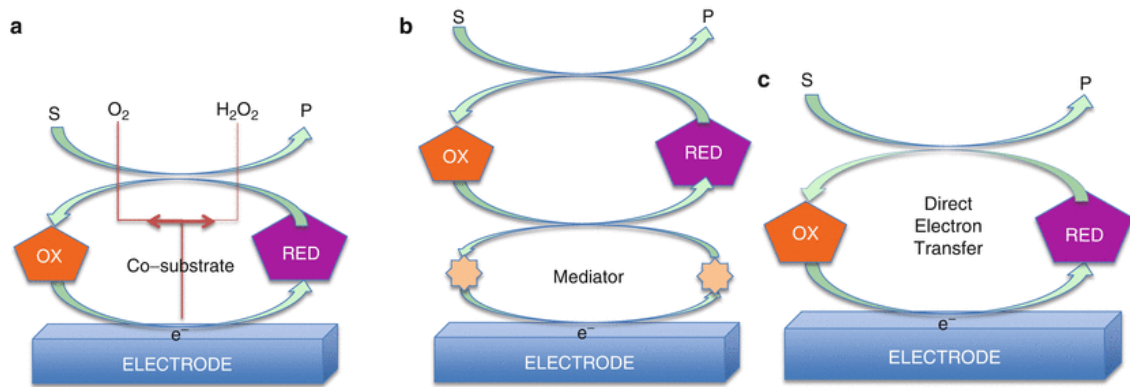
### 2.1.1.1 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos, condutimétricos e impedimétricos, de acordo com sua propriedade elétrica.

Em biossensores eletroquímicos a transdução se baseia nas grandezas elétricas, potencial (E), corrente (I) e resistência (R) conforme configuração. Dentre os biossensores eletroquímicos mais promissores e sensíveis destacam-se os amperométricos (ASHLEY, 2003).

#### 2.1.1.1.1 Biossensores amperométricos

Esse tipo de biossensores mede a corrente produzida durante a oxidação ou a redução de um produto ou o reagente geralmente a um potencial aplicado constante. O que primordialmente afeta o funcionamento de biossensores amperométricos é a transferência de elétrons entre molécula catalítica, geralmente oxidase ou desidrogenase, e a superfície do eletrodo. Conforme o acoplamento eletrônico ou mecanismo de transferência de elétrons entre enzimas redox e eletrodos de apoio, sensores amperométricos baseados em enzimas são classificados em: primeira, segunda e terceira geração (figura 1).



**Figura 1:** gerações de biossensores amperométricos: a) Primeira geração; b) segunda e c) terceira. Fonte: Roberts, 2012.

#### A) Primeira geração de biossensores

Baseando-se na eletroatividade do substrato ou um produto de enzimas, originou-se a primeira geração de biossensores amperométricos. Tanto a formação de produto quanto o consumindo reagente pode ser utilizada para aferir a concentração do analíto. Os biossensores de primeira geração freqüentemente apresentam desvantagens como potenciais aplicados muito elevados. Entretanto, o maior potencial requerido, conduz à utilização de mediador, resultando assim na segunda geração (GUILBAULT e LUBRANO, 1973).

#### B) Biossensores de segunda geração

Buscando tornar mais fácil o intercâmbio de elétrons correspondentes, a enzima e o eletrodo, utilizam de pequenas moléculas para mediar o processo redox, evidenciando-o e colocando-o em foco. Assim, para tornar possível a redução do potencial aplicado aderiu-se a utilização de mediadores como: derivados de ferroceno, ferrocianeto, sais orgânicos condutores e quinonas, para vários biossensores baseados em enzimas redox.

A utilização de mediadores redox tanto livre em solução ou imobilizados com a biomolécula compôs a segunda geração de biossensores. No entanto, os mediadores redox usados em conjunto com as enzimas de redox não só facilitam a transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima, mas também várias reações interferentes (OLIVEIRA et al., 2013).



### C) *Biossensores de terceira geração*

A abordagem mais próspera para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é estabelecer uma difusão elétrica direta entre as biomoléculas e a superfície dos eletrodos. Ao levar as melhorias no processamento de sinal eletrônico aumentando com os avanços da microeletrônica, tendo como consequência sistemas de detecção miniaturizados e multifuncionais.

Portanto, em biossensores de terceira geração, a transferência de elétrons ocorre diretamente a partir da biomolécula redox-ativa para a superfície do eletrodo (SCHELLER, 1991; FREIRE, PESSOA E KUBOTA, 2003).

#### 2.1.2 Biossensores Baseados em Enzimas

As enzimas purificadas ou o extrato bruto têm sido amplamente utilizados para a construção de biossensores, devido à elevada especificidade analítica. Entretanto, as enzimas puras são caras e não apresentam grande estabilidade, prejudicando assim as suas aplicações na biotecnologia (SOUZA, 2001). Assim, o uso de extratos brutos ou parcialmente purificados vem sendo a preferência.

Vários micropoluentes são substratos enzimáticos potenciais, dentre os quais os compostos fenólicos, além de configurarem dentre as classes mais representativas, conseqüentemente, fenol-oxidases têm sido vastamente utilizadas no desenvolvimento de biossensores para o monitoramento de fenóis. Assim, vários tipos de enzimas podem ser empregadas na confecção de biossensores (tabela 3).

**Tabela 3:** classes de enzimas com base em suas reações bioquímicas

Classe	Tipos de reação bio-catalítica
Oxiredutases	Transferência de elétrons, reações de oxido-redução.
Transferases	Reações de transferência em grupos funcionais
Hidrolases	Reação de hidrólise
Liasas	Adição de grupos para ligações duplas ou conversão
Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula produzindo formas isométricas
Ligases	Formação de CC, CS, CO e CN ligações por condensação à clivagem de ATP.

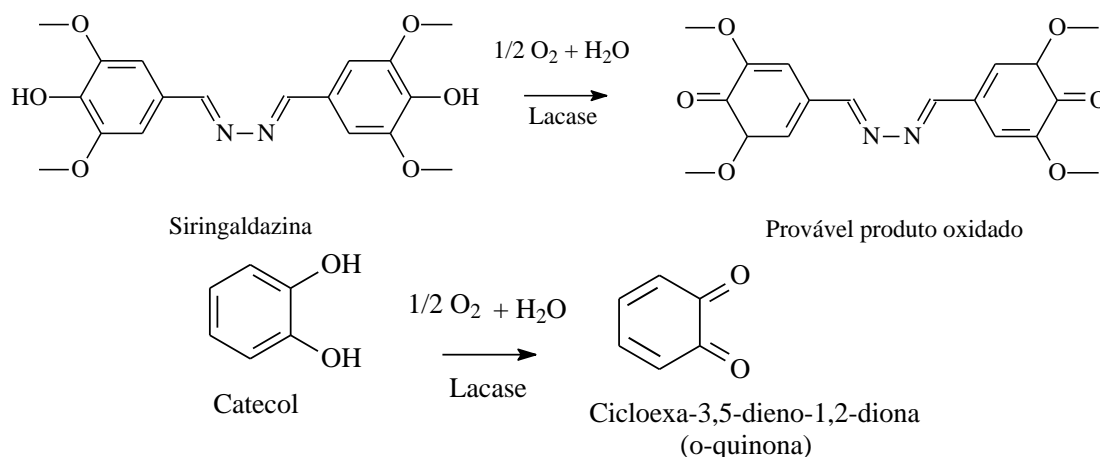
Fonte: Adaptado de Motta, 2009.

Por outra parte, ao considerar o princípio analítico (reação catalítica), o uso de enzimas redox atadas aos transdutores amperométricos se destaca dentre as alternativas mais adequadas e exploradas para análise de poluentes fenólicos.

### 2.1.3 Biossensores Amperométricos Baseados em Lacase

A lacase Lcc, (benzenodiol: oxigênio oxidorreductase, EC 1.10.3.2), é uma enzima extracelular produzida por fungos decompositores brancos, pertencente às polifenol oxidases que possuem cobre em sua estrutura e catalisa a oxidação de uma série de substâncias inorgânicas e aromáticas; particularmente fenóis, com a concomitante redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) a água ( $H_2O$ ) (XU, 1997 *apud* PINTO, 2010).

A massa molecular das lacases dos basidiomicetos varia entre 50 e 70kDa, geralmente menor que as lacases das plantas (THURSTON, 1994 *apud* PINTO, 2010), e o ponto isoelétrico (pI) situa-se entre valores de 3,0 e 4,0 (HATAKKA, 1994 *apud* PINTO, 2010). As enzimas lacases pertencem ao grupo dos fenóis oxidases, catalizando fenóis com participação de oxigênio molecular e água (SADANA, 2006) como se mostra na figura 2.



**Figura 2:** reações bioquímicas de fenol oxidases representativas.

Os Eléttodos baseados em lacase são geralmente concebidos para a determinação seletiva de compostos fenólicos. O seu funcionamento baseia-se

na detecção amperométrica redutiva das espécies de quinona produzidas, enzimaticamente (WANG et al., 2010).

Dentre as vantagens da eletrorredução de quinonas geradas enzimaticamente, comparando com aferições de oxigênio, enumera-se:

- a) Reciclagem dos compostos fenólicos entre o eletrodo e a enzima leva a uma amplificação considerável do sinal do analíto,
- b) As reações de polimerização de quinonas na superfície do eletrodo de trabalho são reduzidas devido ao processo de reciclagem,
- c) O potencial de trabalho é geralmente menor, reduzindo assim o risco de reações eletroquímicas interferentes, resultando em grandes quantidades de ruído e correntes de fundo, e permitindo baixos limites de detecção (LOD),
- d) O dispositivo de medição é mais simples de construir e de manusear e não está dependente de uma concentração constante de oxigênio na amostra, e tampões.

#### **2.1.4 Imobilização de Enzimas**

Quando isoladas as enzimas possuem um curto prazo de vida operacional, limitando sua aplicação na indústria e na pesquisa científica. (GARCIA 2013).

A imobilização do componente biológico na construção de um biossensor é de grande importância. Tem como objetivo alcançar um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo (transdutor), mantendo sua atividade, viabilizando livre difusão de substratos e produtos através da camada biocatalítica. Do ponto de vista analítico o processo de imobilização enzimática deve possibilitar a reutilização reduzindo custo de análise, garantindo estabilidade e quando possível minimizar interferências de compostos indesejáveis (GUILBAULT, 1976).

Em relação à eficiência da imobilização da enzima o material suporte tem influência sobre a estabilidade e atividade. Esses materiais devem ser insolúveis em água, com alta superfície específica e possuem sites potenciais de ligação ser quimicamente inerte e mecanicamente estável.

### **2.1.5 Organofuncionalização da sílica**

A sílica apresenta propriedades como a capacidade de adsorção química ácido-base, estabilidade térmica, avantajando sua exploração, podendo citar o acúmulo de espécies eletroativas antes da detecção eletroquímica. Ela pode ser ainda enxertada com variedades de grupos funcionais obtendo considerável enriquecimento de suas propriedades de superfície. A sílica gel apresenta um grande potencial de aplicação eletroquímica (SHANGGUAN et al., 2009). A alta área superficial de sílicas sintéticas, quando combinada à sua química de superfície, torna esse material útil como suporte para vários catalisadores.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Aprimorar um biossensor de pasta de carbono para monitoramento ambiental de acordo com a Portaria 2914 de 2011 sobre qualidade das águas e as normas CONAMA 357 e 430 de caracterização de água e esgoto.

##### **3.1.1 Específicos**

- Promover maior estabilidade do biossensor utilizando sílica funcionalizada com glutaraldeído para imobilização de lacase.
- Aplicar biossensor para determinação de micropoluentes fenólicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PRODUÇÃO DE ENZIMA LACASE

Para a obtenção da enzima foi utilizado o fungo *Pycnoporussanguineus* que faz parte da coleção de micro-organismos do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. A cepa, cuja identificação é CCT-4518, foi adquirida da Fundação André Tosello, em Campinas-São Paulo. *P. sanguineus* foi cultivado em placa de Petri com Agar Dextrose de batata (PDA) a 37 ° C, durante 7 dias. Cinco colônias, com diâmetro maior a 5 mm, foram transferidas para balões de Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio líquido, contendo 1,25% (w/v) de extracto de malte, 0,0005% (w/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , e 50  $\text{mgL}^{-1}$  de 2,5-xilidina (GARCIA, SANTIAGO, e ULHOA, 2006). A atividade da lacase foi monitorizada a intervalos de 24 horas.

### 4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Clorofenol, fenol, catecol, resorcinol, nitrofenol, cresol, BHT e metilparabeno. Todas as soluções padronizadas foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água purificada ( $\leq$  condutividade 0.1  $\text{mS cm}^{-1}$ ), utilizando um sistema Millipore Milli-Q (Millipore S.A., Molsheim, França). Os tampões empregados como eletrólito suporte foram preparados de acordo com procedimentos bem estabelecidos (GIL et al., 2012).

### 4.3 SÍLICA FUNCIONALIZADA

Uma amostra de 30,0g de sílica gel ativada, foi suspensa em 50,0ml de xileno anidro e submetida à agitação mecânica sob refluxo (140°C) e purga de nitrogênio gasoso por 1h. A esta suspensão, foram então juntados 10,0 ml de 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), gota a gota. A mistura foi submetida a refluxo por mais 72 horas e o sólido foi então filtrado e lavou-se com água e etanol. Esta superfície imobilizada (então designada  $\text{SiNH}_2$ ) foi seca em vácuo à temperatura ambiente durante 12 horas. Nesta etapa 10,0g da sílica

modificada ( $\text{Si}(\text{NH}_2)$ ), foram suspensos em 50,0ml de xileno e 5,0ml de glutaraldeído.

Manteve-se o sistema reacional sob agitação mecânica em atmosfera de nitrogênio a 80°C durante 24h. O sólido formado foi denominado de SiGlu. Após resfriamento da suspensão, separou-se o SiGlu por filtração a vácuo. Em seguida o material foi lavado com xileno e etanol, respectivamente e finalmente, seco por 12 h a 80°C por 24h sob vácuo.

#### 4.4 PREPARAÇÕES DO BIOSENSOR

Os biossensores foram preparados a partir de misturas físicas de diferentes proporções de grafite, óleo mineral e sílica funcionalizada. O biossensor de melhor sinal e menor tempo de resposta foi obtido com uma mistura 85mg de grafite, 15mg de SiGlu e 500 $\mu\text{L}$  de extrato de lacase purificada.

A mistura foi homogeneizada em almoriz com pistilo por 15 minutos e após secagem a temperatura ambiente, foram adicionados 35 mg de óleo mineral a fim de se obter pasta homogênea. O biossensor assim desenvolvido a partir de pasta de carbono modificada com sílica funcionalizada com glutaraldeído e lacase foi designado BSGL.

#### 4.5 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS

Os ensaios voltamétricos foram realizados em um Potenciostato/Galvanostato  $\mu\text{Autolab III}^{\text{®}}$  integrado ao software GPES 4.9 $^{\text{®}}$ . A cela eletroquímica utilizada apresenta volume de 10ml e um sistema de três eletrodos. O biossensor de lacase acoplado ao suporte foi o eletrodo de trabalho; o eletrodo saturado de calomelano Dropsens $^{\text{®}}$  (Oviedo, Spain) usado como eletrodo referência e o eletrodo de Platina como contra-eletrodo ou auxiliar.

Os parâmetros eletroanalíticos utilizados para Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foram: tempo de equilíbrio 60s; tempo de modulação 0,05s; tempo de intervalo 0,5s; passo potencial 4,95mV; amplitude de modulação

50mV; potencial inicial 0,35V e potencial final -0,1V. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

#### 4.6 TRATAMENTO DOS DADOS ELETROQUÍMICOS

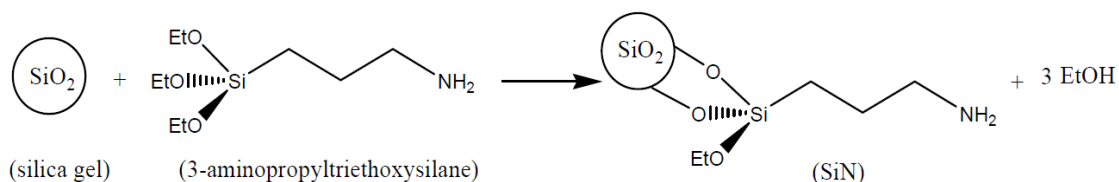
Os dados obtidos no software GPES 4.9<sup>®</sup> foram tratados com a finalidade de melhorar a visualização e identificação dos picos sem introduzir qualquer artefato. Embora, em alguns casos, haja redução da intensidade do pico (<10%) no voltamograma em relação ao voltamograma não tratado. Os picos de corrente apresentados no trabalho foram avaliados em voltamogramas não tratados. A plotagem para apresentação final dos voltamogramas foi realizada no software Origin Pro 8<sup>®</sup>.



## 5 RESULTADOS

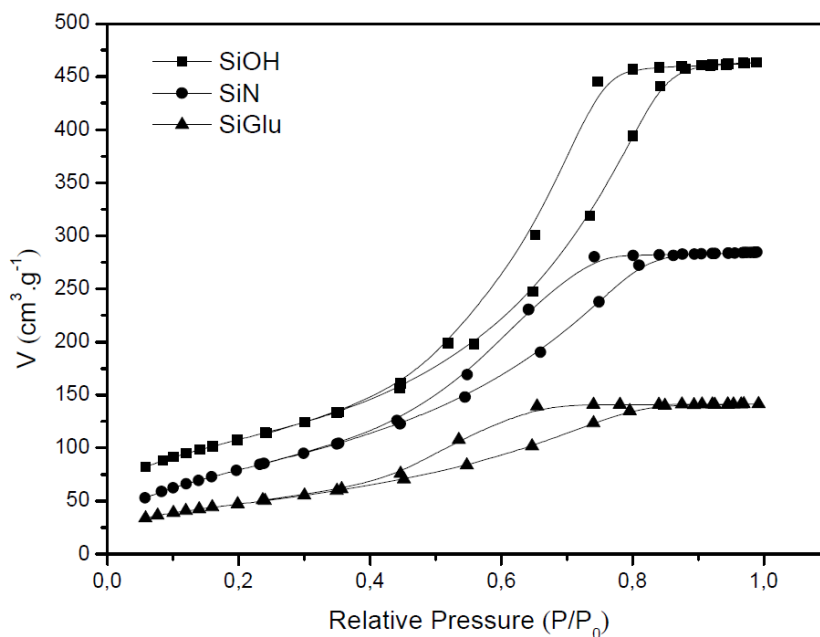
### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA MODIFICADA

O procedimento de síntese utilizado para produzir SIGLU foi baseado na modificação de sílica gel de 3-amino propyl triethoxysilane para obter o precursor SIN de acordo com a equação da figura 3 (GIL et al., 2014). A quantidade de glutaraldeído ligado a superfície de sílica gel foi determinado por análise elementar utilizando analisador elementar PE-2400 (Perkin Elmer - USA) e o valor obtido foi 1,57mM de glutaraldeído por grama de sílica.



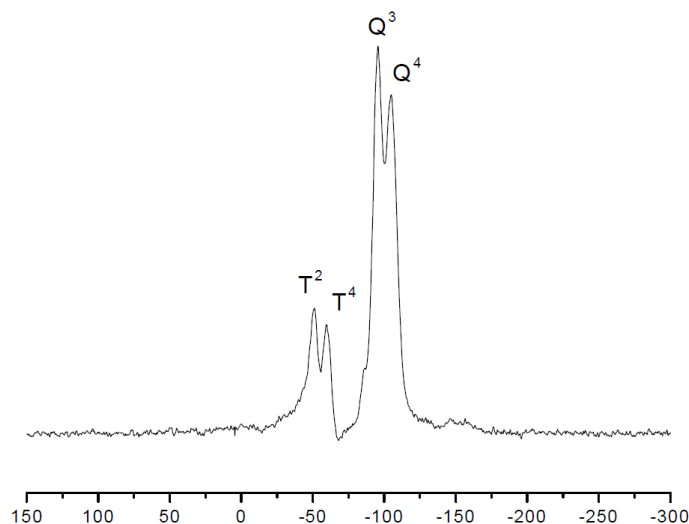
**Figura 3:** processo de síntese utilizado para produzir SIN. Fonte: GIL et al., 2014, disponível no anexo do trabalho.

As isotermas de adsorção dessorção em nitrogênio para SIGLU são mostrados na figura 4 (GIL et al., 2014 - vide anexo), essas isotermas mostram que o processo de adsorção dessorção não é reversível. Isto é uma consequência da volta de estereose de condensação capilar. A isoterma é reversível até uma pressão relativa de cerca de 0,5 unidades. A irreversibilidade é observada entre 0,5 e 0,85 unidade, ao passo que a condensação dos mesoporos primários toma lugar sutilmente acima de limites de pressão superiores, mas os ramos de adsorção dessorção não são paralelos entre si resultando em um ciclo de estereose. A área específica de  $174\text{m}^2\text{g}^{-1}$  determinado pelo método BRET.



**Figura 4:** isotérmicas de adsorção de nitrogênio a partir de sílica (SiOH) e sílicas modificadas (SiN e SiGlu) utilizado para produzir SIN. Fonte: GIL et al., 2014.

O estado sólido NMR pelo espectro  $\text{Si}^{-29}$  apresentado por picos típicos como é mostrado na figura 5, pelo átomo de silício do agente de silanização que foi unido um grupo hidroxila determinado pelo sinal  $\text{T}^3$  [ $\text{Rsi}(\text{Osi})_2(\text{OH})$ ].



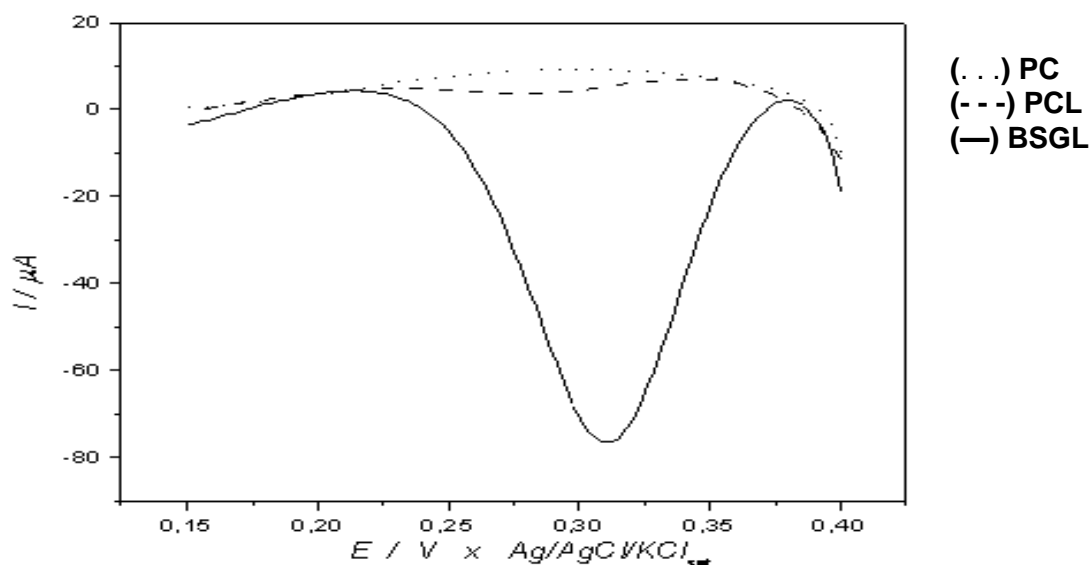
**Figura 5:** estado sólido NMR pelo espectro  $\text{Si}^{-29}$ . Fonte: GIL et al., 2014.

O segundo pico (a -59 ppm) foi relacionado a  $\text{RSi}(\text{Osi})_3$  (sinal  $\text{T}^4$ ), o sinal  $\text{T}^3$  e  $\text{T}^4$  confirmam que os grupos orgânicos foram covalentemente ligados a matriz sílica. Outros dois picos a -95 e -105 ppm foram relacionados a superfície pura dos sinais  $\text{Si}(\text{Osi})_3\text{OH}_2$ , nomeado sinal  $\text{Q}^3$ , e  $\text{Si}(\text{OSi})_4$  correspondente ao sinal  $\text{Q}^4$  respectivamente.

O  $^{13}\text{C}$  NMR é um espectro do produto sólido da reação da sílica com o glutaraldeído (SiGlu), pois eles pertencem ao mesmo ambiente químico, alguns dos picos do espectro desse material não podiam ser visualizados, mas é possível claramente ver a presença de alguns picos característicos nos picos 9 e 23 ppm ascendendo de carbonos (-CH<sub>2</sub>-) agrupamento de propano do APTES, e o segundo pico foi quase determinado por um pico da mesma região do CH<sub>2</sub>, fragmento de glutaraldeído quimicamente unido ao suporte ao pico em 41 ppm referindo  $\alpha$  carbonil carbono, um pico de baixa intensidade a 65 ppm designado ao carbono (-CH<sub>2</sub>-) anexado a nitrogênio amina. E finalmente, um pico a 148 ppm atribuido ao carbono não saturado (-CH=) conectado ao nitrogênio amina devido a mudança de ambientes químicos que causa o deslocamento de picos sobrepostos, alguns grupos e picos não puderam ser caracterizados.

## 5.2 ESTABILIDADE, SENSIBILIDADE E TEMPO DE RESPOSTA

Os níveis de corrente obtidos para redução da quinona a catecol foram vezes maior àquela obtida para o biossensor Pasta de Carbono Lacase (PCL), mostrando que a incorporação da SiGlu acarreta em grande ganho de sensibilidade para BSGL, (figura 6). Quanto ao tempo de resposta quando comparado com biossensor PCL, o BSGL apresenta ligeira redução, porém esta não foi estatisticamente significativa.



**Figura 6:** resposta dos biossensores de pasta de carbono, pasta de carbono com lacase e pasta de carbono com lacase e glutaraldeído.

A estabilidade dos biossensores foi avaliada segundo o período de armazenamento e estabilidade operacional. O BSGL, no que diz respeito à estabilidade operacional, mostrou-se expressamente superior durante uso contínuo, condizendo com o ganho em estabilidade oferecido pela enzima covalentemente imobilizada e redução da lixiviação.

Estes resultados são consistentes pela estabilidade oferecida pela enzima sendo covalentemente durante a construção do biossensor que mais a frente reduz a lixiviação. Já quanto à vida útil, o BSGL manteve 90% da atividade relativa inicial, mesmo depois de 20 dias de armazenamento.

### 5.3 ENSAIOS DE AFINIDADE

A afinidade da lacase foi avaliada frente a diferentes soluções equimolares, obtidas de diferentes compostos fenólicos. A sensibilidade ao catecol e hidroquinona provou ser superior aos monofenóis, cuja sensibilidade relativa varia de 10 a 40% da observada para catecol a hidroquinona.

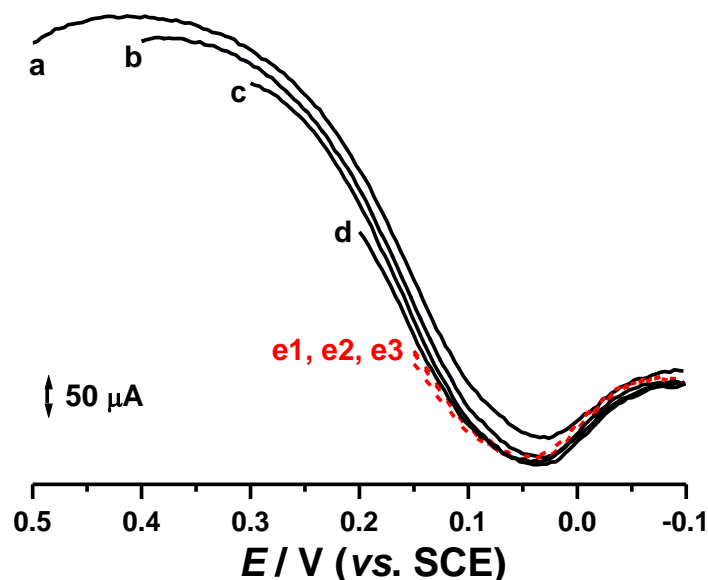
### 5.4 PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

Os parâmetros instrumentais para o pulso aplicado de amplitude e análise de taxa de varredura foram rigorosamente avaliados em estudos prévios e confirmados durante a otimização de afinidade neste estudo. O pulso de amplitude encontrado que tem melhor funcionamento durante o experimento estava na ordem de 20 a 60mV. Os resultados obtidos mostraram valores maiores para o pulso de amplitude ganhando maior sensibilidade, porém tendo perda de resolução como observado. Assim, o valor de 50mV provou ser bem satisfatório. Por sua vez, considerando que a resolução do teste é em geral comprometida para Voltametria de Pulso Diferencial, quando a velocidade de escaneamento é maior que  $10\text{mVs}^{-1}$ , esta foi utilizada em todos os ensaios.

#### 5.4.1 Efeito do Potencial e Repetibilidade

O biossensor BSGL testado em diferentes potenciais de partida manteve constante seu pico de redução tendo como ponto de partida a) 0,5V; b) 0,4V; c)

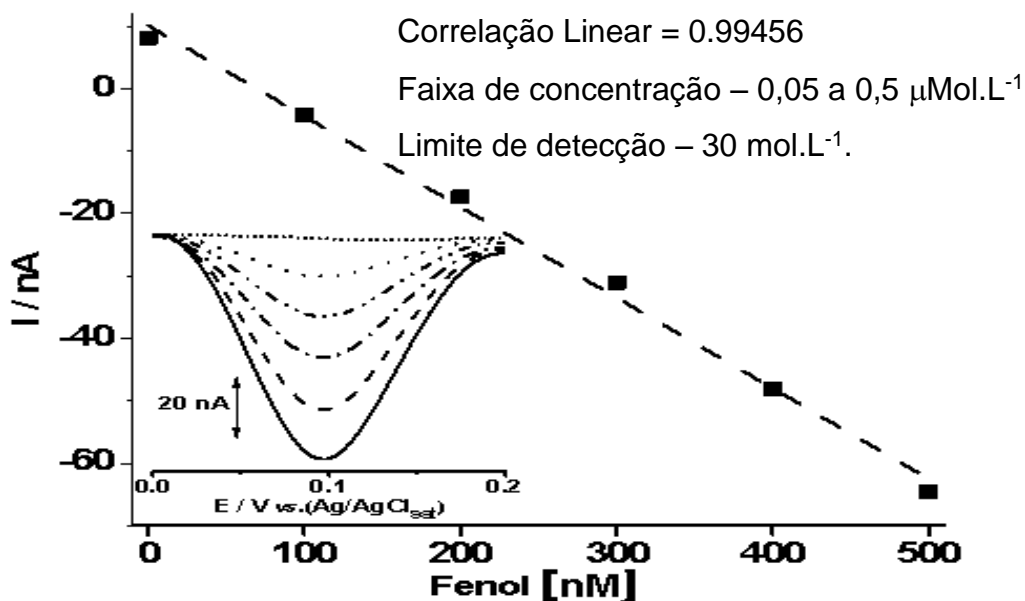
0,3V e d) 0,2V, todos ao limite de  $-0,1V$ . Mesmo com três repetições com partida de 0,15 a  $-0,1V$  o sensor demonstrou estabilidade e foram mantidos os padrões experimentais de amplitude de pulso de 50mV, velocidade de varredura de  $10mV s^{-1}$  (figura 7).



**Figura 7:** ensaio de aplicação do biossensor BSLG em amostra real obtida de posto de gasolina, contendo 4ppm de fenóis totais. a→ e correspondendo a diferentes potenciais de partida (—), e1, e2 e e3 três repetições realizadas na faixa de 0,15 a  $-0,1 V$  (---). Todos os voltamogramas foram obtidos com BSLG em Tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 contendo 250  $\mu L$  de amostra. Amplitude de pulso de 50mV, velocidade de varredura de  $10mV s^{-1}$ .

#### 5.4.2 Curvas de Calibração

A figura 8 mostra os resultados obtidos com o fenol (com maior sensibilidade ao catecol obtido) sobre ótimas condições. Observa-se uma correlação linear com  $R^2 = 0.99456$  na faixa de concentração de 0.05 a  $0.5\mu M$  com limite de detecção de  $30nM L^{-1}$ , muito menor aos  $9 \mu g L^{-1}$  estabelecidos no marco jurídico do Brasil.



**Figura 8:** curva de calibração demonstrando melhor estabilidade do biossensor.

Portanto, dado ao baixo custo de produção dos extratos da enzima lacase, excelente estabilidade observada para sistema mobilizado que manteve 90% de sua atividade retida por mais de 20 repetições após 20 dias de armazenagem, a aplicabilidade do biossensor em amostras reais se mostra promissora. A eficácia do BSLG para a determinação específica de micropoluentes fenólicos em águas do manacial superficial destinado ao abastecimento público do município de Trindade (Goiás) foi então investigada.

### 5.5 DETERMINAÇÃO DE FENOL ÁGUA SUPERFICIAL

A caracterização de amostras de água não tratada foram também formadas em razão do mostruário para a construção do biossensor em amostras reais para análise. A tabela 4 mostra os resultados obtidos em determinação de quantidade recuperada de catecol às amostras de água de fonte pública de abastecimento da cidade de Trindade (Goiás).

A recuperação de valores obtidos na variação entre 95 e 103% do valor adicional. Posteriormente, apresentou recuperação mais alta onde a concentração de fenol adicionada era igual ou menor de  $100\text{nMolL}^{-1}$  (amostra A). Quando concentrações maiores de fenol foram adicionadas (mais de  $100\text{nMolL}^{-1}$ ) as recuperações foram melhores e ligeiramente menores que 100%. Marcas similares foram observadas na avaliação da amostra B.

**Tabela 4:** recuperação dos valores adicionados nas mostras

Amostras	Fenol adicionado (nM)	Recuperação (%)
A	50	103
	100	101
	200	99
	300	98
	400	95
	500	97
B	50	102
	100	102
	200	99
	300	98
	400	99
	500	101

Ressalta-se ainda que a análise pelo método da adição padrão, em nenhuma das amostras detectou-se a presença de compostos fenólicos.com base em suas reações bioquímicas. Também deveria se notar que a análise pelo método de adição padrão em qualquer amostra detectará a presença de compostos fenólicos e subtração de fundo foi empregada para superar essa levitação.

Obtiveram-se valores de recuperação entre 95 a 103% do valor adicionado, indicando a ausência de interferência positiva ou negativa deste tipo de matriz.

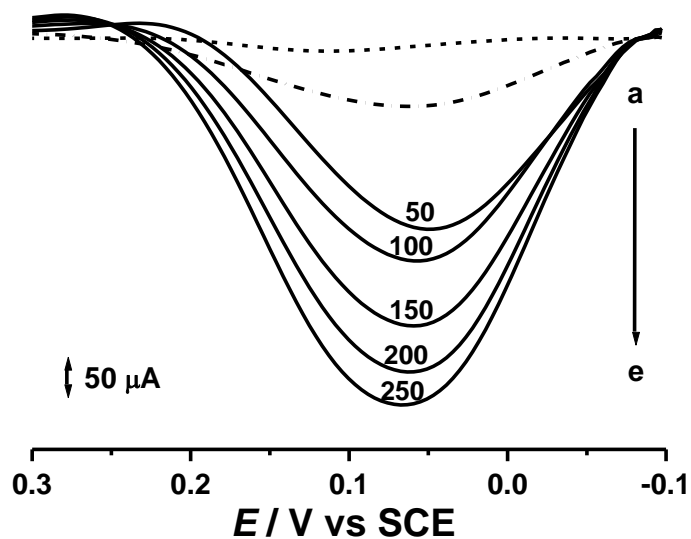
## 5.6 DETERMINAÇÃO DE FENOL EM ÁGUAS DE LAVAGEM DE POSTO DE COMBUSTÍVEL

Para avaliar a robustez do biossensor, este foi empregado em amostras de água com alto índice de contaminação de hidrocarbonetos(Figura 9).



**Figura 9:** efluente coletado em posto de combustível, com contaminação confirmada de fenóis 4ppm.

O biossensor BSGL respondeu a adição de fenol após 8 adições de 4 ppm, mostrando sensibilidade a cada adição (figura 10).



**Figura 10:** Ensaio de aplicação do biossensor BSGL em amostra real obtida de posto de gasolina, contendo 4ppm de fenóis totais. a→ e correspondendo a 8 adições sucessivas de 50  $\mu\text{L}$  da amostra contaminada (—); BSLG versus branco (-●-), PC versus branco (—). Todos os voltamogramas foram obtidos em Tampão fosfato 0,1M, pH 5,0. Amplitude de pulso de 50mV, velocidade de varredura de 10mV s<sup>-1</sup>.



## 6 CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado foi possível concluir que a imobilização da enzima lacase em sílica funcionalizada com glutaraldeído apresentou uma melhora na estabilidade, sensibilidade e eficiência na determinação de micropoluentes fenólicos em águas de abastecimento público.

Para a construção do biossensor foram utilizados parâmetros específicos que são importantes para a otimização do uso do biossensor BSGL que incluiu uma quantidade de pasta de carbono e eletrólito na composição, pH de 3,0 a 8,0, potencial inicial de 0,55 a 0,25mV, taxa de escaneamento de 5 a 25mVs<sup>-1</sup> e amplitude de pulso potencial de 10 a 60mV em VPD de respostas investigadas.

A operação do biossensor BSGL também entregou uma correlação linear de  $R^2 = 0.9946$  que foi obtido com fenol (catecol) na concentração que varia entre 50 a 500nMolL<sup>-1</sup>, com a detecção limite de 30 nMol L<sup>-1</sup>. A aplicação do biossensor BSGL para a recuperação de estudos usando amostras de água municipal mostraram que contaminando a água com concentrações do fenol maiores que 200 nMolL<sup>-1</sup>, resultaram em melhores recuperações comparadas para quando as concentrações do fenol eram iguais ou menores que 100 nMolL<sup>-1</sup>.

Notou-se que na aplicação da lacase imobilizada na bioconversão dos derivados fenólicos estudados neste trabalho, torna-se relevante destacar que a estrutura química é um fator essencial para avaliação da atividade catalítica da enzima, pois sua maior atividade está em estruturas orto e para.

Com relação à estabilidade operacional da enzima imobilizada em vários ciclos de bioconversão, observou-se que não é possível reutilizar a enzima por vários ciclos, podendo ser a causa da diminuição da atividade enzimática possível formação de filtros na superfície do eletrodo.

Para avaliação da estabilidade do biossensor de lacase e sílica funcionalizada em vários ciclos, os resultados demonstraram que a atividade dosensor se mantém aceitável por até 7 ciclos com acréscimo de mais analito e diferentes velocidades de varredura, sempre em temperatura ambiente.

Portanto, o estudo mostra que se pode garantir o uso do biossensor em vários ciclos de oxidação, o processo de imobilização viabilizou a aplicação da

enzima em sensores mais sensíveis, estáveis e com resultados mais robustos, devido ao fato de a enzima e a sílica se manterem estáveis no dispositivo por um tempo prolongado.

Modificação dos parâmetros velocidade de varredura e variação no ciclo de potencial demonstra que o biossensor possui funcionalidade, rapidez e sensibilidade, tornando-se assim uma ferramenta para o monitoramento ambiental.

## 7 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Águas. *Cuidados das Águas Soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos*, 2011.

AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, v. 21, p. 1405-1423, 2006.

ASHLEY, K. Developments in electrochemical sensors for occupational and environmental health applications. *Journal of Hazardous Materials*, v. 102, Issue 1, n. 15, p. 1-12, aug./2003.

BASELT, D.R. LEE, G.L.; NATESAN, M.; METZGER, S.W. SHEEHAN, P.E.; COLTON, R.J. A Biosensor based on magneoto resistance technology, *Biosens. Bioelectron.*, v. 13, p. 731-739, 1998.

BATZIAS, F.; SIONTOROU, C.G. A novel system for environmental monitoring through a cooperative/synergistic scheme between bioindicators and biosensors. *J. Environm. Manag.*, v. 82, p. 221-239, 2007.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; DEBICKA, M.; VOELKEL, A. Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1052, p. 233-236, 2004.

CLARK JR, L. C.; LYONS, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Acad. Sei*, New York, 1962.

D'AGUILA, P.S.; ROQUE, O.C.C; MIRANDA, C.A.S.; FERREIRA, A.P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Caderno de Saúde Pública (online)*, v.16, n.3, p. 791-798, 2000.

DENNISON, M.J.; TURNER, A.P.F. Biosensors for environmental monitoring, *Biotech. Adv.*, v. 13, p. 1-12, 1995.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas autoorganizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

GARCIA, L.F. *Remoção de Hormônios dexuais sintéticos pelo fungo Pycnoporussanguineus e avaliação da toxicidade dos metabolitos gerados.* (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal de Goiás, 2013.

GARCIA, T.A., SANTIAGO, M.F. e ULHOA, C. Properties of laccases produced by *Pycnoporussanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnology Letters*, 28: 633-636, 2006.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. *Application of conducting polymers to biosensors. Biosens. Bioelectron.*, v. 17, p.345-359, 2002.

GIL, E.S.; REZENDE1, S.G.; RIBEIRO JÚNIOR, E.J.M.; HERNANE TOLEDO BARCELOS, H.T.; SCALIZE, P.S.; SANTIAGO, M.F.; QUINTINO, M.P.; SOMERSET, V.S. Development of a Laccase Biosensor for Determination of Phenolic Micropollutants in Surface Waters. Vol. 8 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás; Eds.), pp. 227–240. 2014 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-782-7 (print); ISBN 978-80-7395-783-4 (pdf)

GIL, E.S.; ANDRADE, C.H.; BARBOSA, N.L. BRAGA, R.C.; SERRANO, S.H.P. Cyclic voltammetry and computational chemistry studies on the evaluation of the redox behavior of parabens and other analogues. *Braz. J. Chem. Soc.*, 2012.

GIL, G. C.; KIM, Y. J.; GU, M. B. Enhancement in the sensitivity of a gas biosensor by using an advanced immobilization of a recombinant bioluminescent bacterium. *Biosens. Bioelectron.*, v. 17, p. 427-432, 2002.

GLAZIER, S. A.; CAMPBELL, E.R., CAMPBELL, W.H., Construction and characterization of nitrate reductase-based amperometric electrode and nitrate assay of fertilizers and drinking water. *Anal. Chem.*, v. 70, p. 1511-1515, 1998.

GOBI, K.V.; TANAKA, H.; SHOYAMA, Y. MIURA, N. Continuous flowimmunosensor for highly selective and real-time detection of sub-ppb levels of 2-hydroxybiphenyl by using surface plasmon resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.*, v. 20, p. 350-357, 2004.

GRAHAM, A; MOO-YOUNG, M. Biosensors: recent trends. *Biotech. Adv.*, v. 3, p. 209-218, 1985.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; JANOS VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensor – sensor principles and architectures. *Sensors*, v.8, n. 3. P. 1458, 2008

GUILBAULT, G.G. *Handbook of enzymatic methods of analysis. Marcel Dekker, New York, 4ª edição, 1976.*

GUILBAULT, G.G.; LUBRANO, G.J. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, v. 64, n. 3, p. 439-455, 1973.

HANSEN, K.M.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors, *Methods*, v. 37, p. 57-64, 2005.

IVASK, A.; VIRTÁ, M.; KAHRU, A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. *Soil Biol. Biochem.*, v. 34, p. 1439-1447, 2002.

LOWE, C. R. et al. Review: Biosensors. *Journal of Chromatography*, v. 510, p.341-354, 1990.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. *Biosensor technology: technology push versus market pull*. *Biotechnology Advances*, v. 26, 2008.

MACCRAITH, B.D.; MCDONAGH, C.M.; O'KEEFFE, G.; MCEVOY, A.K.; BUTLER, T. SHRIDAN, F.R. Sol-gel coatings for optical chemical sensors and biosensors, *Sens. Act.B*, v. 29, p. 51-57, 1995.

MIERZWA, J. C. SILVA, M.C.C.; RODRIGUES, L.B.; HESPANHOL, I. *Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado*. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 13, n. 1, 2008.

MOSBACH, K. Thermal biosensor. *Biosens Bioelectr.*, v. 6, p. 179-182.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Básica para o Laboratório. Princípios e Interpretações*. 5ª edição, Laboratório Autolab LTDA, 2009.

NOMURA, Y. IKEBUKURO, K.; YOKOYAMA, K.; TAKEUCHI, T. ARIKAWA, Y. OHNO, S.; KARUBE, I. Application of a linear alkylbenzenesulfonate biosensor to river water monitoring. *Biosens. Bioelectron.*, v. 13, p. 1047-1053, 1998.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; BARROSO, M.F.; MORAIS, S.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A.N. OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. *Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification*, *Talanta*, v. 106, p. 137-143, 2013.

ORTEGA, F.; DOMINGUÉZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTONS, L.; MARKO-VARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 675, p. 65, 1994.

PADDLE, B. M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosens. Bioelectron.*, v. 11, n. 11, p. 1079-1113, 1996.

PAITAN, Y. On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, p. 27-33, 2003.

PAITAN, Y. Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors *Anal. Biochem.*, v. 335, p. 175-183, 2004.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends Anal. Chem.*, v. 21, p. 96-115, 2002.

PEDANO, M.L.; RIVAS, G. A.Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors.*Biosens. Bioelectron.*,v. 18, n. 2-3, p. 269-277, 2003.

PINTO,P.A.C.S. B.*Deslenhificação de palha de trigo por fungos da podridão branca Inibição da lacase de Fomes fomentarius pelo ião Cl<sup>-</sup>. Vila Real. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias: produção animal) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2010.*

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromechanics senses biomolecules.*Mat. Today*, v. 5, n. 1, p. 22-29, 2002.

ROBERTS, G.C. K. Encyclopedia of Biophysics, *Springer*, 2012.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. ALDA, M.J.L.; MARCO, M.P.; BARCELO, D. Biosensors for environmental monitoring.*A global perspective*, Talanta, v. 65,p. 291-297, 2005.

ROGERS, K.R. Biosensors for environmental applications, *Biosens. Bioelectron.*,v. 10,p. 533-541, 1995a.

ROGERS, K. R.; WILLIAMS, L.R. Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective.*Trends Anal. Chem.*, v. 14, n. 7, p. 289-294, 1995b.

RUMAYOR, V.G. et al. *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*.Madri: ElecéIndustriaGráfica, 113p, 2005.

RUSSELL,I.M.;BURTON,S.G.Developmentanddemonstrationofanimmobilizedp-olyfenoloxidasebioprobe for the detection of phenolic pollutants in water.*Analytica Chimica Acta*,v.389,p.161,1999.

SADANA, A. Detection of Environmental Contaminants by Biosensors. *Binding and dissociation kinetics for different biosensor applications using fractals*, p. 161-197, 2006.

SANTOS, T.L.L. Construção, Caracterização e Otimização de Biossensoramperométrico baseado em eletrodos de mi-nicavidade com pasta de carbono. *Cad.Pes.*,São Luis, v. 21, n. especial, jul./2014.

SHELLER, F.W.Second generation biosensors, *Biosens.Bioelectron.*,v. 6,p. 245-253, 1991.

SERRA, B.F.; TZORIS, A.; HALL, E.A.H. Manometric transduction in enzyme biosensors, *Biosens.Bioelectron.*,v. 22, p. 1,p. 94-101, 2006.

SHANGGUAN,X.;ZHENG,J.;SHENG,Q.DirectElectronTransferofHorseradish PeroxidaseinGellanGum-HydrophiliclonicLiquidGelFilm.*Electroanalysis*,v.21,n.13,p.1469-1474,2009.

SHIMOMURA, M.; NOMURA, Y.; ZHANG, W.; SAKINO, M.; LEE, K.H.; IKEBUKURO, K.; KARUBE, I. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine. *Anal. Chim. Acta*, v. 434, p. 223-230, 2001.

SOUZA, S.F. Microbial biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, v. 16, p. 337-353, 2001.

TSCHMELAK, J.; PROLL, G.; GAUGLITZ, G. *Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: assay optimization process for estrone asexample.* *Talanta*, v. 65, p. 313-323, 2005.

VAN DER LELIE, D. et al. The use of biosensors for environmental monitoring. *Res. Microbiol.*, v. 145, n. 1, p. 67-74, jan./1994.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R.M.. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica a microbalança de cristal de quartzo. *Química nova*, 23(5)(2000).

WANG, J.; CHEN, Q. Remote electrochemical biosensor for field monitoring of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta*, v. 312, p. 39-44, 1995.

WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.19, n. 1-2, p. 47-53, 1999.

WANG, L.; MA, W.; XU, L.; CHEN, W.; ZHU, Y.; XU.; KOTOV, Y. Nanoparticle-based environmental sensors. *Mat. Sc. Engineer.*, v. 70, p.265-274, 2010.

## 8 ANEXO