

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM
LIPASES DE FUNGO ENDOFÍTICO IMOBILIZADAS EM
HIDROXINITRATO DE ZINCO LAMELAR COM NANOPARTÍCULAS
DE OURO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM”**

ADRIENE DE MOURA BARBOZA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARILZA CASTILHO TEREZO

CUIABÁ
MATO GROSSO- BRASIL
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B239d Barboza, Adriene de Moura.
DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM
LIPASES DE FUNGO ENDOFÍTICO IMOBILIZADAS EM HIDROXINITRATO
DE ZINCO LAMELAR COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA
DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM / Adriene de Moura Barboza. -- 2017
xx, 97 f. ; il. color. ; 30 cm.

Orientador: Marilza Castilho Terezo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de
Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Química, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Ceratobasidium sp. 2. biossensor. 3. hidróxido duplo lamelar. 4. pesticida. I.
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

ADRIENE DE MOURA BARBOZA

Mestrado em Química, Área de Concentração Química Analítica e Ambiental

“DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM LIPASES DE FUNGO ENDOFÍTICO IMOBILIZADAS EM HIDROXINITRATO DE ZINCO LAMELAR COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM”

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, - Área de concentração: Química Analítica e Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Castilho Terezo

CUIABÁ
MATO GROSSO – BRASIL
2017

ADRIENE DE MOURA BARBOZA

**“DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM
LIPASES DE FUNGO ENDOFÍTICO IMOBILIZADAS EM
HIDROXINITRATO DE ZINCO LAMELAR COM NANOPARTÍCULAS
DE GURO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM”**

Dissertação de mestrado apresentada a
Universidade Federal de Mato Grosso, como parte
das exigências do programa de Pós-Graduação em
Química, para obtenção de título de Mestre em
Química, - Área de concentração: Química
Analítica e Ambiental.

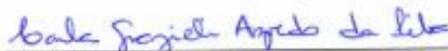
APROVADA: 22 de Junho de 2017



Profª. Dra. Marilza Castilho Terezo
(Departamento de Química – UFMT)



Profª. Dra. Cristiane Luisa Jost
(Departamento de Química – UFSC)



Profª. Dra. Carla Grazieli Azevedo
(Departamento de Química – UFMT)

*'' Senhor te encontrei, como te deixarei? selaste minh'alma,
tocas-te com tua paz meu coração. ''*

Missionário Shalom

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus criador de todas as coisas, pelo dom da vida, por ter guiado meus passos e ter me sustentado até aqui. Pela sua infinita misericórdia, seu amor incondicional e imensurável, pelos caminhos que percorri até chegar aqui, não tenho palavras para descrever o quanto sou grata a ti.

Ao meu esposo, melhor amigo e companheiro, por estar sempre do meu lado disposto a ajudar, a acreditar que vai dar certo. Por não se importar em ficar horas me esperando terminar os trabalhos no laboratório (até mesmo nos finais de semana) por simplesmente ser essa pessoa maravilhosa que você é, te amo.

A professora Dra. Marilza Castilho minha orientadora, por aceitar me orientar, lá quando ainda era uma IC. Por todos os ensinamentos, chamadas de atenção, por sempre estar aberta a escutar, aconselhar, incentivar, contribuir de forma fundamental para minha formação profissional. Ao prof. Dr. Ailton pela disposição e contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Hélio e Neuza, por fazer de mim a pessoa que sou hoje, tenho muito orgulho de ser filha de vocês dois, mesmo não fazendo ideia do que eu faço, vocês sempre me apoiaram e me incentivaram, amo muito vocês dois. A minha avó Sebastiana, sempre tão querida e preocupada comigo, obrigado vizinha linda. As meus irmãos, Rodrigo, Adriele e Evelin, aos meus amores e razão da minha vida Emanuelle, Maysa, Isabella e Marcinha.

As minhas amigas Márcia e Ana Carina, simplesmente nem sei dizer o que vocês duas representam pra mim. Vocês sempre serão a melhor parte disso tudo, prova do amor de Deus na minha vida, não sei como vai ser daqui pra frente. Queria voltar no tempo onde éramos três deitadas no corredor da Química, discutindo qual matéria iria nos matar primeiro. Pra sempre vocês estarão no meu coração.

Quero agradecer também ao Douglas Skoog, que com essa alma de professor sempre disposto a ajudar, ensinar, sanar as dúvidas, sempre com uma paciência de Jó, um verdadeiro amigo.

Anelisse, minha IC mais que maravilhosa, amiga e companheira, sempre tentando me conquistar (com os dotes culinários), por toda dedicação, esforço, sempre disposta a

ajudar em tudo, sei que você adora meu gosto musical. Muito obrigada por ser esse poço de meiguice, misturado com tênis prateado e alma de Beyonce que cativa a todos, esse trabalho é seu. E ao Eduardo pela ajuda de traduções entre outros (principalmente por enxugar as lágrimas da Ane).

Aos amigos que conheci Ariadne, Clarice, Paula, Wallas, Gustavo, Rodrigo, Ana Carolina, Adriana e Angélica, todos os pertencentes ao grupo GENMAT, pelos momentos de confraternização, risadas e por tornarem os dias mais leves e alegres.

Pela contribuição do Prof. Dr. Marcos Soares e do doutorando William Pietro, que disponibilizaram o espaço do LABEM e os fungos para ensaios enzimáticos, e sempre estarem dispostos a ajudar e contribuir com o desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fernando Quites por fornecerem os suportes utilizados neste trabalho. Em especial a aluna Maria Carolina me salvando fazendo as sínteses, sempre que necessário.

Ao grupo de pesquisa da Prof. Dra. Eliana Freire (LARB), pelo fornecimento das amostras de água, em especial a aluna Danielle Cordeiro que está sempre disposta a ajudar.

A grupo de pesquisa do Prof Dr. Evandro Dall'Oglio, principalmente ao professor Ms. Leonardo Vasconcelos, pelo auxílio nas análises cromatográficas – CLAE-EM.

A Profa. Dra Michelle Brugnera e ao aluno Filipe pela disposição em ajudar com as análises cromatográficas CLAE-DAD, muito obrigada mesmo.

Enfim a todos que indiretamente ou diretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Aos professores que durante toda minha vida acadêmica contribuíram para minha formação, aos amigos que fiz de outros laboratórios, não vou citar, pois são muitos e posso esquecer de alguém, obrigada a todos.

RESUMO

BARBOZA, Adriene de Moura, Universidade Federal de Mato Grosso, junho de 2017. **“Desenvolvimento de biossensor enzimático baseado em lipases de fungo endofítico imobilizadas em hidroxinitrato de zinco lamelar com nanopartículas de ouro para determinação de carbendazim”**. Orientadora: Marilza Castilho.

Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor enzimático baseado em lipases de fungo endofítico imobilizadas em hidroxinitrato de zinco lamelar contendo nanopartículas de ouro (HZnL/Au-NPs). Inicialmente, noventa fungos foram pré-avaliados quanto ao potencial de produção de lipase, por meio de ensaios de inoculação dos fungos em meio contendo corante rodamina-B e azeite de oliva. Após, foram selecionados sete fungos para a determinação da atividade enzimática, durante oito dias, utilizando *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) como substrato. A atividade hidrolítica das lipases foi determinada por espectrofotometria na região do visível ($\lambda = 400$ nm) monitorando-se o surgimento do *p*-nitrofenol (*p*-NP), produto da reação de hidrólise do *p*-NPP catalisada pela enzima. A maior atividade catalítica foi obtida com fungo *Ceratobasidium* sp.2 A1, resultando 30,88 U (1,0 nmol de *p*-NP $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), no oitavo dia de cultivo em meio líquido contendo azeite de oliva. O biossensor proposto foi construído com 0,5 U de lipase adsorvida em HZnL/AuNPs, pó de grafite, nanotubos de carbono de múltiplas paredes e óleo mineral nas quantidades de 20/90/10/50 mg, respectivamente. A voltametria de onda quadrada (VOQ) foi utilizada para a otimização e aplicação do biossensor para o substrato *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), verificando melhor resposta eletroquímica com 80 Hz de frequência, 2,0 mV de incremento de varredura e 120 mV de amplitude de pulso, em solução 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato salino (PBS) a 0,1 mol L^{-1} de NaCl, pH 7,0 e 50,0 mmol L^{-1} do substrato. Na superfície do biossensor, a enzima lipase hidrolisa o substrato *p*-NPA formando *p*-NP, e este é reduzido eletroquimicamente em -0,9 V vs Ag/AgCl, gerando um pico proporcional a concentração de *p*-NPA. O biossensor foi aplicado na determinação do pesticida carbendazim em amostra de água pelo método de inibição da lipase. A resposta do biossensor foi linear na faixa de concentração de carbendazim de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,9981$) com limites de detecção e quantificação de 3,13 e 9,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. O estudo de recuperação para o carbendazim em amostras de água fortificadas ficou na faixa

de 98,5 a 105,4%. O biossensor apresentou uma boa repetibilidade (N= 15) e reprodutibilidade (N= 5) com DPR de 4,4 e 3,6 % respectivamente, permanecendo estável durante 20 semanas. Os resultados obtidos aplicando o biossensor não apresentaram diferenças significativas quando comparados àqueles obtidos com método cromatográfico de referência, em um nível de confiança de 99%, demonstrando a aplicabilidade do biossensor para a determinação do pesticida carbendazim.

Palavras Chaves: *Ceratobasidium* sp.2, biossensor, hidróxido duplo lamelar, pesticida

ABSTRACT

BARBOZA, Adriene de Moura, Universidade Federal de Mato Grosso, June 2017.
“Development of enzymatic biosensor based on endophytic fungus lipases immobilized on lamellar zinc hydroxynitrate with gold nanoparticles to determine carbendazim”.
Advisor: Marilza Castilho

In this work, was developed an enzymatic biosensor based on endophytic fungi lipases immobilized on lamellar zinc hydroxynitrate containing gold nanoparticles (HZnL/AuNPs). Initially, ninety fungi were pre-evaluated in terms of lipase production potential by fungal inoculation tests in a medium containing rhodamine-B dye and olive oil. After that, seven fungi were selected for the enzymatic activity determination, during eight days, using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as substrate. Lipases hydrolytic activity was determined by spectrophotometry in the visible region ($\lambda = 410$ nm) monitoring the *p*-nitrophenol (*p*-NP) appearance as product of *p*-NPP hydrolysis catalyzed by lipase enzyme. The highest catalytic activity was obtained with *Ceratobasidium* sp.2 A1 fungus, resulting in 30.88 U (1.0 nmol of *p*-NP $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ protein), on the eighth day of culture in liquid medium containing olive oil. The proposed biosensor was constructed with 0.5 U of lipase adsorbed in HZnL / AuNPs, graphite powder, multi-walled carbon nanotubes and mineral oil in the amounts of 20/90/10/50 mg, respectively. Square-wave voltammetry (SWV) was used for the biosensor optimization and application to the substrate *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA), obtaining best electrochemical response with 80 Hz frequency, 2.0 mV scanning increment and 120 mV of pulse amplitude in 0.1 mol L^{-1} phosphate saline buffer solution (PBS) with 0.1 mol L^{-1} of NaCl, pH 7.0 and 50.0 mmol L^{-1} of the substrate. The lipase enzyme hydrolyzes the *p*-NPA substrate to *p*-NP, which is reduced electrochemically on the biosensor surface at -0.9 V vs Ag / AgCl, generating a peak proportional to the concentration of *p*-NPA. The biosensor was applied for pesticide carbendazim determination in water samples by the lipase inhibition method. The biosensor response for the carbendazim pesticide was linear in the range of 10 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0.9981$) with detection and quantification limits 3.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 9.50 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively. The recovery study for carbendazim in fortified water samples ranged from 98.5 to 105.4%. The biosensor showed

good repeatability (N = 15) and reproducibility (N = 5) with DPR of 4.4 and 3.6% respectively, remaining stable for 20 weeks. The results obtained by the biosensor application showed no significant differences when compared to the chromatographic reference method, with a confidence level of 99%, demonstrating the applicability of the biosensor for carbendazim pesticide determination.

Keywords: *Ceratobasidium* sp.2, biosensor, double lamellar hydroxide, pesticide,

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Esquema dos componentes de um biossensor. (Fonte adaptado ARYA et al., 2012).....	25
Figura 2. Diferentes componentes biológicos que podem ser empregados na construção de biossensores.....	26
Figura 3. Representação dos NTCs. Nanotubos de parede simples à esquerda, nanotubos de paredes múltiplas à direita. (Fonte: FERNANDES, 2008).	30
Figura 4. Técnicas de imobilização enzimática: (a) adsorção física; (b) encapsulação; (c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada. (Fonte: Adaptado de MARTINS, 2006).	32
Figura 5. Mecanismo da reação de hidrólise de um triglicerídeo catalisado por lipase em meio aquoso.....	38
Figura 6. Estrutura tridimensional da lipase e os resíduos dos aminoácidos que compõem a tríade catalítica: serina, histidina e aspartato, extraídas do Pseudomona cepacia. (Fonte: Adaptado BISATTO, 2012).....	38
Figura 7. Mecanismo de reação de hidrólise de ligação ésteres catalisadas por lipases. Adaptado de CIGLER et al.,1994.	39
Figura 8. Relatório de Estatística da Produção agrícola de Janeiro de 2017, para safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas. Fonte: IBGE, 2017.....	45
Figura 9. Fórmula estrutural do carbendazim.	46
Figura 10. Sinal de excitação produzido em voltametria de onda quadrada. O sinal na forma de escada em (a) é adicionado a uma sequência de pulsos em (b) que dá o sinal de excitação de onda quadrada mostrado em (c). Onde ΔE_s é variação do potencial de escada, E_{ESW} é a magnitude do pulso e τ é o período do pulso. Fonte: Skoog et al., 2009).....	52
Figura 11. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde A) representa um processo redox de um sistema reversível e B) de um sistema irreversível. (Souza, Machado e Avaca, 2002).....	53
Figura 12. Fungo endofítico <i>Trichoderma harzianum</i> P39. (Esquerda) inoculado em meio Sabouraud no terceiro dia e (direita) extrato do endofítico em meio azeite de oliva no sexto dia de crescimento.	59

Figura 13. Esquema básico da construção de um biossensor.....	61
Figura 14. (A) Espectros de absorção na faixa de 200 a 800 nm para as diferentes concentrações de p-NP em solução tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ (pH 7,0). (B) Curva analítica da concentração de p-NP vs Absorbância, λ _{max} =400 nm, (5 a 50 μmol L ⁻¹).66	66
Figura 15. Fungo <i>Ceratobasidium sp1</i> , em meio Rodamina B (a) no visível (b) Sobre luz UV em 350 nm.	67
Figura 16. Reação de hidrólise do p-NPP catalisada pela enzima lipase.	68
Figura 17. Curva analítica da Absorbância vs [ASB] (λ=600nm), das soluções de reagente de Bradford com albumina nas concentrações de 5, 15, 25, 50, 75 e 100 μg L ⁻¹	70
Figura 18. Gráfico de barras da atividade específica de lipase pelo tempo de cultivo em meio azeite de oliva, para os sete fungos estudados.....	72
Figura 19. Voltamograma cíclico utilizando o biossensor proposto em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ (0,1 mol L ⁻¹ NaCl pH 7,0) contendo 50 mmol L ⁻¹ de p-NPA, v = 50 mV s ⁻¹	74
Figura 20. Representação esquemática do biossensor proposto e possível mecanismo para a determinação eletroquímica do p-NP, produto da quebra do substrato p-NPA catalisado pela lipase.....	75
Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada usando o biossensor como eletrodo de trabalho em (a) solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ e (b) solução de p-NPA 50 mmol L ⁻¹ em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (0,1 mol L ⁻¹ NaCl, pH 7,0) Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔE _p = 120mV ΔE _s = 2mV. Temperatura ambiente. Insert: Mecanismo de reação proposto da redução de p-NP para p-AP em 0,9 V vs E _{Ag/AgCl} (KCl 3,0 mol L ⁻¹),.....	75
Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada para solução 50 mmol L ⁻¹ p-NPA em tampão PBS 0,1 mol ⁻¹ (0,1 mol L ⁻¹ NaCl, pH 7,0), para biossensor construído com enzima livre e enzima imobilizada. Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔE _p = 120mV ΔE _s = 2mV. T ambiente 25 °C (±1)......	77
Figura 23. (A) Voltamogramas de onda quadrada para 50 mmol L ⁻¹ de p-NPA em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (a) EPC, (b) EPC-NTC, (c) EPC-NTC-HZnL/AuNPs (d) biossensor. Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔE _p = 120mV ΔE _s = 2mV. (B) Gráfico das correntes resultando para p-NPA usando diferentes sensores. Frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV, incremento de potencial de 5 mV. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).....	78

Figura 24. Imagens de MEV (A) HZnL/AuNPs sem enzima imobilizada (B) HZnL/AuNPs com 0,5 U de enzimas lipases imobilizada (aumento x4000). (C) da pasta do biossensor (aumento x1000).....79

Figura 25. Espectros de IV médio do (a) HZnL/AuNPs e (b) HZnL/AuNPs com enzima imobilizada.80

Figura 26. Estrutura cristalina dos HZnL (a) vista lateral (b) vista do topo da lamela. (Fonte: ARIZAGA et al., 2007).81

Figura 27. (A) Voltamogramas de onda quadrada para p-NPA 50mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função da variação de f (10 a 100 Hz). Parâmetros da VOQ: $\Delta E_p = 120$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para o p-NPA em função da variação da frequência. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).82

Figura 28. (A) Voltamogramas de onda quadrada pra p-NPA 50 mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função da amplitude de pulso ΔE_p (10 a 120 mV). Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico das corrente resultantes para o p-NP em função da variação da ΔE_p . Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).83

Figura 29. (A) Voltamogramas de onda quadrada pra p-NPA 50mmolL⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função do incremento de potencial ΔE_s (1 a 5 mV). Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV e $\Delta E_p = 120$ mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para o p-NP em função da variação da ΔE_s . Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).84

Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução de p-NPA 50 mmol L⁻¹ em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) utilizando biossensores contendo (a) 0,3; (b) 0,5; (c) 0,75 e (d) 1,0 U de lipases imobilizadas. Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico de barras da das correntes resultantes para p-NP utilizando biossensores com diferentes concentrações de enzimas. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).86

Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) com diferentes concentrações de p-NPA: 25,0; 50,0; 75,0; 100 mmol L⁻¹. Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s =$

2mV. (B) Gráfico de barras da das correntes resultantes para p-NP utilizando o biossensor em diferentes concentrações de substrato. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).....87

Figura 32. (A) Voltamogramas de onda quadrada para 50 mmolL⁻¹ de p-NPA em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol. L⁻¹ NaCl) nos pHs 6,0 ; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 . Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔEp = 120 mV ΔEs = 2 mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para p-NPA em diferentes pHs. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).88

Figura 33. Gráfico de controle da resposta do biossensor para uma solução de p-NPA 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol.L⁻¹ NaCl, pH 7,0) durante um período de 20 semanas.....91

Figura 34. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a) eletrólito de suporte, (b) solução p-NPA 50mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) (sinal base), (c) solução p-NPA (A) 1 minuto de incubação, (B) 2 minutos de incubação (C) 3 minutos de incubação. Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔEp= 120mV ΔEs= 2mV. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).93

Figura 35. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) 50 mmol L⁻¹ de p-NPA em PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0), e quando incubados por 3 minutos na solução de carbendazim na concentração de (b) 10 µg L⁻¹, (c) 15 µg L⁻¹, (d) 25 µg L⁻¹ (e) 50 µg L⁻¹, (f) 75 µg L⁻¹ e 100 µg L⁻¹, com frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV, incremento de potencial de 2 mV e um potencial de acumulo de -0,4 V durante 15 segundos. (B) Curva analítica para o carbendazim na faixa 10,0 a 100,0 µg L⁻¹. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).94

Figura 36. (A) Perfil do cromatograma para Carbendazim em 100 µg L⁻¹ fase móvel H₂O (0,1% ácido fórmico) : MeOH. (70% a 95 % v/v) com tR de 5,34 min. e (B) curva para o carbendazim na faixa de concentração de 10 a 100 µg L⁻¹96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de transdução usados em biossensores eletroquímicos. (Melo, 2008)	27
Tabela 2. Classificação das enzimas de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Fonte: (NELSON e COX, 2002).....	36
Tabela 3. Aplicações industriais de lipases de acordo com o tipo de reação de catálise enzimática. (Durlí, 2007).....	40
Tabela 4. Propriedades físico-químicas do Carbendazim.	47
Tabela 5. Procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados no trabalho.....	55
Tabela 6. Fungos selecionados para estudo de produção de lipase e a espécie do vegetal de origem.....	68
Tabela 7. Valores de concentração total de lipase U/mL, considerando o dia de maior produção de enzimas.....	69
Tabela 8. Concentração de proteínas totais dos sete fungos estudados no seu respectivo dia de maior atividade total.	70
Tabela 9. Valores máximos de atividade total de lipase, concentração total de proteínas e atividade específica para os extratos endofíticos avaliados num período de um a oito dias de produção.	73
Tabela 10. Correntes resultantes para a resposta do biossensor submetido a diferentes potenciais de acúmulo durante 15 segundos.	85
Tabela 11. Parâmetros estudados para a construção do biossensor e para técnica de VOQ utilizando o substrato p-NPA, e os valores selecionados.....	89
Tabela 12. Repetibilidade e reprodutibilidade da resposta do biossensor.	90
Tabela 13. Resultados dos ensaios de recuperação e quantificação de Carbendazim em amostras de água usando o biossensor proposto e o método cromatográfico comparativo.	97
Tabela 14. Teste-t para comparar a resposta do biossensor com o método cromatográfico (N=3).	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AMPA – Associação Matogrossense dos Produtores de Algodão
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASB – Albumina de Soro Bovino
- AChE – Acetilcolinaesterase
- Asp – Ácido aspártico
- BD – Meio batata-dextrose
- BDA – Meio batata-dextrose-ágar
- CBZ - Carbendazim
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodo
- CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Massas
- CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
- EPC – Eletrodo de pasta de carbono
- EPC-NTC – Eletrodo de pasta de carbono com nanotubos de carbono
- EPC-NTC-HZnL/AuNPs – Eletrodo de pasta de carbono, nanotubo de carbono e hidróxido nítrico lamelar com nanopartículas de ouro
- EQM – Eletrodo quimicamente modificado
- FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- Glu – Glutamato
- His - Histidina
- HZnL/AuNPs – Hidroxinitrato de zinco lamelar com nanopartículas de ouro
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- IUBMB – Union of Biochemistry and Molecular Biology
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
- IV - Infravermelho
- LABEM – Laboratório de biotecnologia e Ecologia Microbiana
- LARB – Laboratório de Análise de Resíduos de biocidas

LD – Limite de detecção
LIC – Limite inferior de controle
LQ – Limite de quantificação
LSC – Limite superior de controle
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
NTC – Nano Tubos de Carbono
NPsM – Nano partículas metálicas
NTCPS – Nano Tubos de Carbono de Parede Simples
NTCPMs – Nano Tubo de Carbono de Parede Múltiplas
p-AP- *p*-aminofenol
p-NPA – *p*-nitrofenil acetato
p-NP – *p*-nitrofenol
p-NPP – *p*-nitrofenil palmitato
Ser – Serina
UV – Ultravioleta
VPD – Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Biossensores	23
2.2 Componentes e funcionamento de um biossensor	24
2.2.1 <i>Material biológico.....</i>	25
2.2.2 <i>Métodos de transdução.....</i>	26
2.3 Materiais utilizados na construção de biossensores	28
2.3.1 <i>Eletrodos de pasta de carbono.....</i>	28
2.3.2 <i>Nanotubos de carbono.....</i>	29
2.4 Biossensores enzimáticos.....	31
2.4.1 <i>Imobilização enzimática.....</i>	31
2.5 Enzimas	34
2.5.1 <i>Lipases.....</i>	37
2.6 Fungos na produção de enzimas lipases	41
2.6.1 <i>Fungos Endofíticos.....</i>	42
2.7 Biossensores baseados no processo de inibição enzimática	43
2.8 Benzimidazois	44
2.8.1 <i>Carbendazim.....</i>	46
2.9 Métodos eletroanalíticos	50
2.9.1 <i>Voltametria de Onda Quadrada.....</i>	51
3. OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos.....	54
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	55
4.1 Reagentes e soluções	55
4.2 Instrumentação.....	57
4.3 Preparação dos extratos enzimáticos	58
4.4 Determinação da atividade da lipase	60
4.6 Determinação de coeficiente de absorção molar do <i>p</i>-nitrofenol	61

4.7	Imobilização enzimática e construção dos sensores	61
4.8	Caracterização da pasta do biossensor e suporte lamelar	62
4.8.1	<i>Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura –MEV</i>	62
4.8.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	62
4.9	Otimização dos parâmetros da construção e da resposta do biossensor	62
4.10	Repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade da resposta do biossensor	63
4.11	Curva analítica para Carbendazim	64
4.12	Coleta, preparo e análises das amostras	64
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	Coefficiente de absorção molar do <i>p</i>-nitrofenol	66
5.2	Determinação da atividade total e específica de lipases no extrato endofítico	67
5.3	Comportamento eletroquímico do substrato <i>p</i>-NPA na superfície do biossensor	73
5.4	Mecanismo da resposta eletroquímica do biossensor	74
5.5	Avaliação do efeito da imobilização da enzima	76
5.6	Influência dos componentes da pasta na resposta do biossensor	77
5.7	Caracterização do suporte lamelar e da pasta do biossensor	79
5.8	Parâmetros de otimização da construção e resposta do biossensor ...81	
5.8.1	<i>Otimização dos parâmetros da técnica de VOQ para resposta do biossensor utilizando como substrato <i>p</i>-NPA</i>	82
5.8.2	<i>Efeito da atividade específica de lipase imobilizada no biossensor</i>	85
5.8.3	<i>Efeito do pH do eletrólito de suporte</i>	88
5.9	Repetibilidade e reprodutibilidade da resposta do biossensor	89
5.10	Estabilidade do biossensor	90
5.11	Aplicação do biossensor para a determinação do pesticida carbendazim	91
5.11.1	<i>Curva analítica para o carbendazim aplicando o biossensor</i>	92
5.11.2	<i>Método comparativo de Cromatografia Líquida de alta eficiência</i>	95
5.12	Estudo de adição e recuperação e determinação do carbendazim	96

6. CONCLUSÕES.....	99
7. PUBLICAÇÕES.....	101
7.1 Eventos	101
7.2 Premiações	101
8. REFERÊNCIAS.....	102

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento de pesticidas em diferentes matrizes tem impulsionado a pesquisa de uma diversidade de métodos analíticos. Os biossensores enzimáticos revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento destes poluentes, pois combina a especificidade das enzimas para um analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional a concentração do analito. Merecem destaque aqueles em que o monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima, na qual a atividade da enzima é medida antes e após a inibição (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

Dentre os biossensores a base de inibição os mais descritos na literatura são baseados na inibição de enzimas colinesterases da classe das hidrolases. Enzimas da classe das hidrolases como esterases e lipases, podem ser inibidas por uma gama de compostos tóxicos como pesticidas organofosforados, carbamatos e benzimidazóis.

Enzimas lipases podem ser encontradas naturalmente em células de tecidos animais e vegetais, podendo também ser produzidas de forma extracelular por microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras (CASTRO et al., 2004). Um modo de se obter lipases extracelulares envolve a cultura de fungos endofíticos de diferentes partes de plantas. As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas com as lipases extraídas de fontes animais e vegetais. Estas vantagens estão relacionadas a algumas características dessas enzimas como estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH (TREICHEL et al., 2010).

Para minimizar ou até mesmo eliminar alguns fatores que limitam o uso de enzimas livres, o processo de imobilização do componente biológico torna-se uma etapa fundamental na construção de um biossensor, pois tanto a escolha do método, quanto do suporte a ser empregado é de especial importância para o bom desempenho do dispositivo.

Os suportes inorgânicos baseados em materiais lamelares de hidróxidos de metais de transição têm-se apresentado como materiais promissores quando empregados como suportes, pois possuem a característica de expandir seu espaço interlamelar com a

imobilização das enzimas melhorando suas propriedades, como solubilidade em água, baixa resistência a temperaturas elevadas e mudanças de pH do meio (BORDONAL, 2016). A incorporação de nanopartículas metálicas aos hidróxidos lamelares pode aumentar a atividade catalítica destes materiais, melhorando a detecção do analito, quando baseados em transdutores eletroquímicos.

O Carbendazim é um fungicida da classe dos benzimidazois e constitui o ingrediente ativo mais utilizado dessa classe (ONISHI apud BOUDINA, 2013) nas culturas do algodão, citros, feijão, soja, trigo, e também no tratamento de sementes de algodão, feijão e soja. É classificado como pesticida de alta toxicidade, e é degradado lentamente na natureza. Isso faz desse pesticida um problema sério para a saúde dos seres vivos de sistemas aquáticos, solo e para o homem (KHAMMAS e AHMAD, 2016), portanto se justifica a preocupação no monitoramento deste pesticida.

A determinação do carbendazim é descrita na literatura por métodos eletroanalíticos e cromatográficos que são amplamente aplicados. Os métodos cromatográficos são extremamente importantes nas análises qualitativas e quantitativas de resíduos de pesticidas, pois oferecem alta sensibilidade, baixos limites de detecção entre outros. Porém em sua maioria necessitam de etapas de purificação e /ou extração do analito da amostra, elevando o tempo de análise e aumentando o número de etapas de bancada, além de serem métodos mais onerosos.

Neste contexto, no presente trabalho foi desenvolvido um biossensor baseado em enzimas lipases produzidas por fungos endofíticos e imobilizadas em hidroxinitrato de zinco lamelar decorado com nanopartículas de ouro (HZnL/AuNPs), com transdução eletroquímica, e aplicado na determinação do pesticida Carbendazim em amostras de água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossensores

Biossensores são sensores cuja principal característica é a utilização da especificidade de um componente biológico ativo a um analito que através de um transdutor converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional a concentração do analito (FILHO e CAPELATO, 1992; SALGADO, 2001). Formalmente a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), define um biossensor como: “Um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através de um receptor biológico que está em contato direto com um elemento de transdução” (THÉVENOT et al., 2001).

O primeiro biossensor foi construído em 1962 por Clark e Lyons para a determinação de glicose, e utilizava como material biológico a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida, que detectava o consumo de oxigênio dissolvido, sendo a variação de concentração deste proporcional a concentração da glicose (FILHO e CAPELATO, 1992; MAAREF et al., 2007). Desde então o interesse na pesquisa de biossensores só vem aumentando, e uma ampla variedade de dispositivos que exploram os mais variados componentes biológicos, como enzimas, células, anticorpos em combinação com transdutores eletroquímicos, ópticos entre outros, vem sendo desenvolvidos para as mais diversas finalidades, como análises laboratoriais, industriais, ambientais e clínicas (FILHO e CAPELATO, 1992).

Esses dispositivos podem ser confeccionados para uso contínuo, com tempo de vida útil mais longo e para um número definido de medições, ou podem ser dispositivos descartáveis e se mostram uma ferramenta promissora para complementarem técnicas já existentes, devido suas características, como seletividade, baixo custo de construção e confecção, simplicidade e portabilidade (ROSATTO, et al., 2001). Existem diversas possibilidades de materiais que podem ser utilizados, como receptores e transdutores, o que aumenta a versatilidade desses dispositivos. Os biossensores podem ser empregados em

análises qualitativas e quantitativas de diversos analitos (PARELLADA et al., 1998, ROSATTO, et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

Nos últimos anos diversos trabalhos foram publicados descrevendo a construção de biossensores como ferramentas adequadas para aplicações em diversos processos, tais como, industriais, farmacológico, medicinais entre outros. Esses dispositivos empregam diversos tipos de reconhecedores biológicos e são capazes de detectar uma grande variedade de substâncias de forma rápida e sensível.

Entretanto a viabilidade da comercialização de um biossensor depende da versatilidade e do baixo custo do sensor. Uma das principais dificuldades encontradas na comercialização dos biossensores se deve ao fato de que o dispositivo deve funcionar por longos períodos de tempo apresentando uma boa estabilidade e reprodutibilidade (GIL e MELO, 2010), porém a grande maioria dos sensores não cumpre esse requisito devido a fragilidade do componente biológico. Em contrapartida, o biossensor permite a utilização de diversos componentes biológicos que catalisam uma grande variedade de reações, que podem ser imobilizados na superfície de um eletrodo, além disso, tem a facilidade de miniaturização e automação, possibilitando seu emprego em processos reais *in situ* a um preço competitivo (LUONG et al., 2008).

2.2 Componentes e funcionamento de um biossensor

O princípio básico do funcionamento de um biossensor, o que o diferencia de outros sensores químicos, é a especificidade do componente biológico para com o analito.

Os biossensores podem ser classificados quanto ao tipo de elemento biológico, e quanto ao tipo de transdução utilizado (VO-DINH e CULLU, 2000; CHAUBEY e MALHOTRA, 2002; OLIVEIRA, et al., 2013). Na Figura 1 estão apresentados esquematicamente os principais componentes de um biossensor.

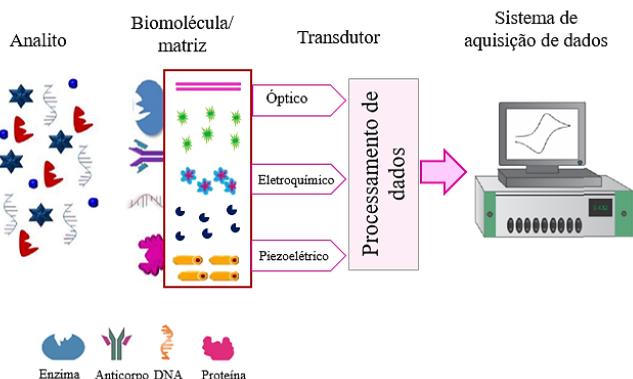


Figura 1. Esquema dos componentes de um biossensor. (Fonte adaptado ARYA et al., 2012).

O componente biológico deve ser imobilizado em um suporte adequado, e é acoplado junto à superfície do transdutor, que faz o reconhecimento do analito de interesse por meio de uma reação química. O transdutor monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação, gerando um sinal de corrente elétrica, potencial, variação de temperatura entre outros (SALGADO, 2001; SANTOS, et al., 2014) e por fim, o sinal é eletronicamente amplificado e exibido (ARYA et al., 2008).

2.2.1 *Material biológico*

A escolha do material biológico é o primeiro passo na construção de um biossensor e depende diretamente do analito de interesse. O componente biológico por meio do seu sítio ativo altamente seletivo deve ser capaz de reconhecer especificamente um analito presente em uma matriz, possuir estabilidade no meio e nas condições de medição, além disso, deve possibilitar a modificação/imobilização sobre um suporte sem afetar o seu desempenho (SALGADO, 2001; ALFAYA e KUBOTA, 2002). Existem diferentes tipos de materiais biológicos que podem ser imobilizados adequadamente juntamente com transdutores e estão apresentados na Figura 2:

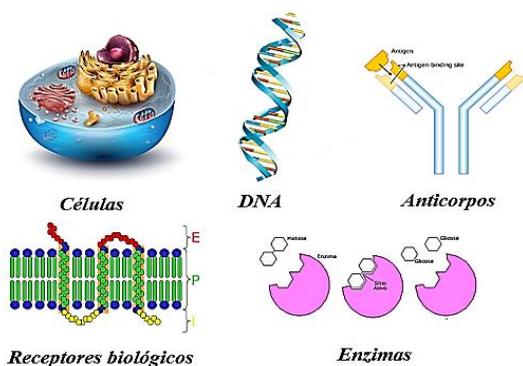


Figura 2. Diferentes componentes biológicos que podem ser empregados na construção de biossensores.

De acordo com o material biológico o biossensor pode ser classificado como: biossensores enzimáticos, microbiológicos, quimiorreceptores ou imunossensores (SILVA, 2011). Devido à alta seletividade desses materiais a um substrato, suas aplicações no desenvolvimento dos biossensores são de grande interesse. Dentre estes destacam-se as enzimas que são as mais utilizadas para esta finalidade (ALFAYA e KUBOTA, 2002), isso devido principalmente ao seu baixo custo de obtenção, disponibilidade comercial e natural e fácil manipulação (MARQUES e YAMANAKA, 2008; MEHRVAR e ABDI, 2004).

2.2.2 Métodos de transdução

Os transdutores são elementos capazes de converter as variações de propriedades físicas ou químicas oriundas de interações entre o elemento de reconhecimento e o analito em um sinal elétrico (PEREIRA et al., 2002). Nos biossensores, o transdutor pode ser eletroquímico, óptico (absorção ou emissão de radiação eletromagnética), e calorimétrico ou termométrico (mudança de temperatura) e piezoelétrico (alteração de massa e/ou microviscosidade).

Dentre estes transdutores, os mais comuns são os eletroquímicos que podem ser amperométricos ou voltamétricos (baseados na medida de corrente elétrica resultante da

oxidação ou redução de espécies eletroativas); potenciométricos (baseados na diferença de potencial entre dois eletrodos, com corrente elétrica constante); condutimétricos (medidas de condutância resultante de produtos da reação catalítica) e impedimétricos (baseados na medida da impedância) (CHAUBEY e MALHOTRA, 2001; MELO, 2008).

Na Tabela 1 encontram-se sistemas de transdução eletroquímica, seus métodos de medição e aplicações típicas (MELO, 2008).

Tabela 1. Sistemas de transdução usados em biossensores eletroquímicos. (Melo, 2008)

Sistema de Transdução	Modo de Medição	Aplicação típica
Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
Eletrodo enzimático	Amperométrico/ Voltamétrico (Corrente)	Substratos enzimáticos e anticorpos, reações catalisadas por enzimas
Transistores de efeito de campo	Potenciométrico (Voltagem)	Íons, gases, substratos enzimáticos e analito imunológicos
Eletrodo íon seletivo	Potenciométrico (Voltagem)	Eletrodo de gases, enzimas, organelas células e tecidos.
Impedimétrico	Impedância	Imunosensores enzimáticos

Os biossensores com transdução eletroquímica se caracterizam por serem simples, sensíveis, confiáveis e apresentarem um menor tempo de resposta. São utilizados em condições que muitas vezes não requer um pré-tratamento de amostra e permitem a determinação de um analito em uma ampla faixa de concentração (THÉVENOT et al., 2001).

2.3 Materiais utilizados na construção de biossensores

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido amplamente estudado, sendo, grande parte dos biossensores desenvolvidos a base de pasta de carbono (ALMEIDA e GIANNETTI, 2002), estes eletrodos possuem a vantagem de diminuir o limite de detecção do analito de interesse e aumentar a seletividade das determinações.

Os nanomateriais como, por exemplo, nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas (preparadas a partir de metais semicondutores), tem sido bastante aplicado na área de biossensores nos últimos anos. Isso devido suas propriedades como grande razão superfície-volume, alta eficiência catalítica e sua grande habilidade de adsorção (ZHAI et al.; 2010)

2.3.1 Eletrodos de pasta de carbono

A aplicação de eletrodos de pasta de carbono (EPC) em análises eletroquímicas está em crescente expansão, isso devido a algumas características desse material como: amplo intervalo de potencial; baixa corrente de fundo; baixo custo; inércia química entre outros (SANTOS et al., 2014), além disso, possui uma grande facilidade de modificação e renovação da superfície.

A pasta de carbono consiste em uma mistura composta de pó de grafite e um aglutinante que geralmente é um óleo orgânico como, por exemplo, o nujol (PEREIRA et al., 2002), quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas, eletroinativo e imiscível, que possui a finalidade de preencher os interstícios entre as partículas do pó de grafite (SANTOS et al., 2014).

O primeiro EPC foi elaborado em 1958 por Adams, com o intuito de substituir o eletrodo gotejante de mercúrio, onde poderia ser utilizado para realizar experimentos, com varreduras de potenciais em regiões de potenciais positivos, região de potencial onde o mercúrio sofre oxidação (ADAMS, 1958; OLIVEIRA e VIERIRA, 2006). Desde então diversos eletrodos baseados em pastas de carbono foram desenvolvidos para as mais variadas finalidades.

Marcolino (2007) desenvolveu eletrodos a base de carbono, para análises voltamétricas e amperométricas para determinação de espécies de interesse farmacêutico.

A popularidade desses eletrodos se deve principalmente a rapidez e simplicidade no processo de preparação da pasta, renovação da superfície a cada nova análise, e a modificação interna do material eletródico, se diferenciando dos eletrodos sólidos convencionais que só podem ser modificados na superfície (NUNES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

2.3.2 *Nanotubos de carbono*

A utilização de novos materiais para a construção de sensores eletroquímicos vem se intensificando. A descoberta dos nanotubos de carbono (NTCs) em 1991 pelo físico Sumio Iijima despertou grande interesse na comunidade acadêmica e tem sido empregado nas mais variadas aplicações devido as suas propriedades eletrônicas, resistência mecânica e suas propriedades químicas (MERKOÇI et. al., 2005). Os NTCs são compostos formados por átomos de carbono, com estrutura definida, de formas cilíndricas coaxiais constituídas por folhas de grafeno, de comprimento que varia de nanômetro a centímetros (MERKOÇI et. al., 2005 e LI e CHOU, 2006).

Existem dois tipos de NTCs, que dependem de sua forma estrutural: os nanotubos de carbono de parede simples (NTCPs) ou SWCNT da expressão em inglês (Single-Walled Carbon Nanotubes); e os nanotubos de paredes múltiplas (NTCPMs) ou MWCNT (Multi-Walled Carbon Nanotubes) como demonstrado na Figura 3. A diferença entre os dois são a quantidade de folhas de grafeno que estão enroladas sobre o mesmo eixo (AHMAD et al., 2006).

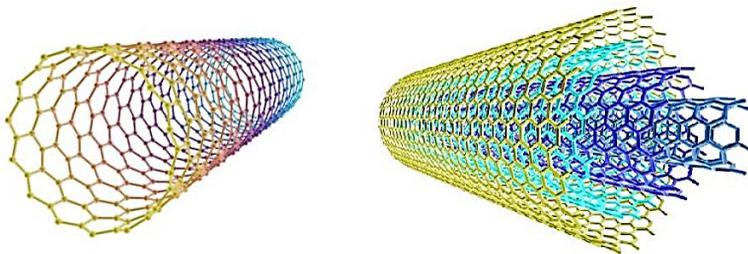


Figura 3. Representação dos NTCs. Nanotubos de parede simples à esquerda, nanotubos de paredes múltiplas à direita. (Fonte: FERNANDES, 2008).

Os NTCs possuem diversas aplicações na área tecnológica, como fontes de elétrons para displays de tela plana, estocagem de gás, suporte para catalisadores, capacitores de alta potência, sensores etc (OLIVEIRA, 2008). Os NTCs são de grande importância para ciência dos nanomateriais alavancando as pesquisas na área na nanotecnologia (HERBST et al., 2004) e também possibilitando sua aplicação em diversas áreas como na eletroquímica. Devido sua elevada área superficial e baixa resistividade são aplicados no desenvolvimento de supercondensadores, dispositivo de armazenamento de hidrogênio e células solares. Desenvolvem um papel importante na miniaturização de dispositivos eletrônicos, e podem também serem utilizados para fabricar transistores e memórias de computadores entre outras aplicações (MARTÍNEZ et al., 2013).

Na eletroquímica sua utilização vem crescendo, principalmente no desenvolvimento de sensores devido as suas propriedades, como grande área superficial que proporciona amplificação do sinal analítico e também seu elevado poder catalítico (SANTOS, 2012). Os eletrodos a base de NTCs podem ser obtidos pela mistura de NTC com óleo mineral, a elevada área superficial dos NTCs proporcionam a construção de eletrodos estáveis e robustos (MERKOÇI et al., 2005). No desenvolvimento dos biossensores também podem ser utilizados como componentes da pasta a base de grafite, melhorando a capacidade eletrocatalítica desses dispositivos.

2.4 Biossensores enzimáticos

Os biossensores cujo material biológico é uma enzima, são denominados biossensores enzimáticos. Sua principal vantagem está nas propriedades biocatalizadoras das enzimas, que são altamente específicas devido principalmente a ligação existente entre a molécula do substrato pelo sítio ativo das enzimas que envolvem fatores tais como, tamanho da molécula do substrato, grupos funcionais e polaridade.

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor na década de 60, muitos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento dos biossensores enzimáticos. Novas técnicas e materiais de imobilização, técnicas de transdução e diversos analitos podem ser detectados empregando os biossensores enzimáticos.

São encontrados na literatura diversos trabalhos, onde são utilizados uma ou mais enzimas como componente biológico para um biossensor, e geralmente elas estão imobilizadas em diferentes suportes e utilizando vários componentes ligantes (KARUBE e NOMURA, 2000; PANPAE et al., 2006; NIKOLELI et al., 2010;).

2.4.1 Imobilização enzimática

A imobilização da enzima no suporte é uma etapa crucial no desenvolvimento de biossensores, pois ela proporciona a reutilização das enzimas, aumenta a estabilidade, reduz custos e aumenta, dependendo do suporte, a atividade enzimática. A perda parcial ou total da atividade enzimática é um dos principais problemas durante o processo de imobilização da enzima. Essa perda na atividade pode depender de inúmeros fatores, dentre eles, a própria enzima, o suporte, os reagentes utilizados e as condições experimentais (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006). Os quatro tipos básicos de imobilização enzimática são ilustrados na Figura 4, que são: adsorção física, ligação covalente, encapsulamento físico e ligação covalente cruzada.

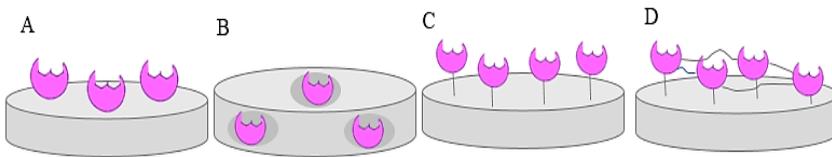


Figura 4. Técnicas de imobilização enzimática: (a) adsorção física; (b) encapsulação; (c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada. (Fonte: Adaptado de MARTINS, 2006).

Adsorção física: Este método de imobilização é mais simples, rápido e de baixo custo. Baseiam-se em interações eletrostáticas forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio, entre a enzima e a superfície do suporte (PEREIRA et al., 2002; SHARMA et al., 2003). Vários materiais podem ser utilizados como suporte, estes são escolhidos considerando sua estabilidade e capacidade de adsorção. Alguns exemplos desses suportes são o polietileno, resinas sintéticas, as nanoargilas entre outros (MENDES et al., 2011).

Encapsulação: A encapsulação envolve a retenção das enzimas dentro dos interstícios de um polímero insolúvel em água ou dentro de microcápsulas de membranas semipermeável, que permite a passagem somente dos substratos e dos produtos reacionais. As enzimas podem ser encapsuladas em poliacrilamida, agarose entre outros. As principais desvantagens desse método estão relacionadas ao tamanho dos poros que geralmente são irregulares, falta de rigidez e limitações difusionais para o substrato e produto (BOADI e NEUFELD, 2001).

Ligação covalente: Este método envolve a formação de ligações entre grupos não reativos da enzima com grupos reativos do suporte. Para escolha deste suporte, é necessário avaliar as características de solubilidade, presença de grupos funcionais, estabilidade mecânica e área superficial do suporte. Dentre os mais usados estão o vidro e cerâmica porosa, poliestireno, agarose, celulose, nylon entre outros. A grande desvantagem da técnica é a perda parcial da atividade da enzima devido às mudanças nas conformações dos sítios ativos da enzima (TWARI et al., 2009).

Ligação covalente cruzada: Este método de imobilização é baseado na formação de um reticulado das moléculas do biomaterial e/ou do suporte, por meio de ligações

covalentes, formando uma rede mais rígida e uma ligação mais estável (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Uma desvantagem do método é o aumento no tempo de resposta do biossensor, devido à formação de barreiras de difusão (NUNE et al., 2004).

O leque de materiais utilizados como suportes de imobilização enzimática no desenvolvimento de biossensores é muito diversificado.

Oliveira et al., (2012) desenvolveu um biossensor baseado em peroxidase da atemóia imobilizada em nanoargila modificada com grupos aminopropiltriétoxissilano e octadecilamina para o monitoramento do pesticida glifosato em de água.

Seleci et al., (2012) construíram um biossensor baseado na enzima glicose oxidase imobilizada no suporte montmorilonita modificada com grupos metil e dimetilamina sobre eletrodo de carbono vítreo, utilizado para determinação de glicose em amostra de vinho.

Todos os estudos demonstram a importância da imobilização, etapa crucial no desenvolvimento do biossensor. A escolha da técnica utilizada na imobilização do componente biológico no caso, as enzimas, e o contato desta com o transdutor são de grande importância, pois a longevidade e a estabilidade desses dispositivos dependem diretamente das enzimas (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006).

2.4.1.1

Materiais Lamelares como suporte

A IUPAC classifica os materiais lamelares como material cristalino onde os átomos de uma lamela estão ligados por ligações químicas, enquanto os átomos de lamelas adjacentes interagem por interações fracas, essas fracas interações consistem em interações do tipo Van der Waals (SCHOONHEYDT et al., 1999). Os exemplos mais simples desses materiais são grafite, metais alcalinos terrosos e os hidróxidos de metais de transição (ARIZAGA et al., 2007).

Outros exemplos de materiais lamelares são os silicatos lamelares, e estes podem ser usados como suportes para a imobilização de enzimas. Estes materiais são formados por lamelas inorgânicas que possuem cátions ou ânions no espaço interlamelar (entre suas lamelas) podendo sofrer reações de intercalação/troca iônica (QUITES et al., 2014). Os hidróxidos lamelares são outra classe de materiais lamelares, eles são utilizados como

matrizes inorgânicas para encapsulação de corantes aniônicos e drogas. As propriedades desses materiais dependem da composição estrutural, das camadas do hospedeiro e da composição do espaço interlamelar (DEMEL et al., 2014).

Os materiais lamelares apresentam uma classe importante, pois eles podem expandir seu espaço interlamelar com a imobilização das enzimas, melhorando suas propriedades físico-químicas e biológicas. Outra vantagem atribuída aos compostos lamelares é sua estabilidade térmica e química frente a diferentes ambientes químicos (QUITES et al., 2014).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são exemplos de materiais lamelares muito estudado atualmente, suas estruturas são fundamentadas na estrutura da brucita $Mg(OH)_2$, e podem ser representadas pela fórmula geral $M^{2+}(OH)_{2-x}(A^{n-})_{x/n}.yH_2O$. Onde M^{2+} pode ser os cátions metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} , o A^{n-} representa ânions trocáveis e n indica a quantidade de moléculas de água na região interlamelar. Quando o cátion metálico (M^{2+}) é o íon Zn^{2+} e o contra íon é o ânion nitrato (NO_3^-) o composto é chamado de hidroxinitrato de zinco lamelar (HZnL) e sua estrutura é representada pela fórmula $Zn_5(OH)_8(NO_3).2H_2O$ (ARIZAGA, 2008). Há uma diversidade de íons que podem ser substituídos por cátions M^{2+} gerando uma diversidade de compostos de composição variada de cátions e ânions intercalados (SILVA et al., 2014).

2.5 Enzimas

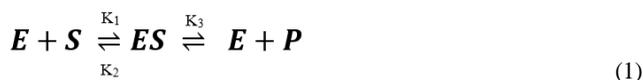
A utilização de enzimas para fins analíticos vem crescendo a cada dia no desenvolvimento de biossensores enzimáticos, pois possuem diversas vantagens como, diversidade de reações que as enzimas podem catalisar, grande variedade e podem ser obtidas a partir de fontes naturais e comerciais (NAKATANI, 1995).

As enzimas são proteínas de alta massa molecular que catalisam as reações biológicas com muita eficiência, sendo componentes fundamentais em todos os processos bioquímicos. Elas catalisam as centenas de reações envolvidas durante a degradação das moléculas de nutrientes, conservam e transformam energia, além de sintetizarem macromoléculas biológicas por meio de precursores simples (NELSON e COX, 2002).

Muitas reações requeridas para digerir alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem, em velocidades apropriadas sob condições biológicas, sem catálise. As enzimas atuam contornando esse problema oferecendo ambientes apropriados para que as reações possam ocorrer mais rapidamente (NELSON e COX, 2002).

A estrutura de uma enzima é constituída por uma parte proteica, porém a ela podem estar associadas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Algumas enzimas só apresentam atividade catalítica, com a participação de moléculas menores denominadas cofatores, que são de natureza não proteica, como íons inorgânicos (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}) ou moléculas orgânicas (NELSON e COX, 2002).

A utilização de enzimas como catalisadores em análises químicas se deve a alta sensibilidade e especificidade para um analito (FILHO e CAPELATO, 1992). Assim como outros tipos de catalisadores, as enzimas aceleram a velocidade das reações, promovendo o alcance do equilíbrio em um menor tempo e diminuindo a energia de ativação das reações sem alterá-las (MELO, 2008; NELSON e COX, 2002). O mecanismo básico de uma catálise enzimática está descrito na Equação 1:



Onde E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo intermediário enzima substrato e P o produto formado. Para uma reação enzimática envolvendo uma concentração conhecida de enzimas, a velocidade da reação é dada pela equação de Michaelis-Menten Equação 2:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Onde V_0 representa a velocidade da reação, V_m a velocidade máxima, que é igual a $K_3[E]$, $[S]$ a concentração inicial do substrato e, $K_m = (K_2 + K_3 / K_1)$ a constante de Michaelis-Menten oriunda das constantes de velocidades apresentadas na Eq. 2 (FILHO e

CAPELATO, 1992, NELSON e COX, 2002). Alguns fatores influenciam no alto poder catalítico das enzimas, com integridade das suas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, força iônica do meio, a temperatura e pH do meio em alguns casos necessidade da presença de um cofator (MARZZOCO e TORRES 1999; NELSON e COX, 2002).

Em métodos analíticos geralmente a enzima é utilizada para converter um substrato em um produto que possa ser detectado, ou também catalisar uma reação na presença de um reagente, neste caso monitora-se a diminuição da concentração deste reagente, em ambos os casos é utilizado uma técnica analítica como a espectrofotometria, a eletroquímica entre outras (FILHO e CAPELATO, 1991).

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reações que elas catalisam (NELSON e COX, 2002). Na Tabela 2, está apresentada a classificação das enzimas de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

Tabela 2. Classificação das enzimas de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Fonte: (NELSON e COX, 2002).

Primeiro N° EC*	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais da água).
4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O, e C-N.

*EC – Enzyme Class (classe de enzimas)

A nomenclatura das enzimas se dá de acordo com a IUBMB, como exemplo podemos citar as lipases EC 3.1.1.3, onde o primeiro número refere-se a qual dentre as seis

grandes classes a enzima pertence, no caso (EC 3) se refere as hidrolases, o segundo número é referente ao tipo de ligação no qual a enzima atua, ligações ésteres para no caso da lipase (EC 3.1), o terceiro número é uma subclassificação do tipo de ligação, no caso ácidos carboxílicos (EC 3.1.1) e o quarto número indica a série da enzima, lipases hidrolisam triglicérides (EC 3.1.13). (MARZZOCO e TORRES 1999; NELSON e COX, 2002).

As hidrolases são enzimas que catalisam reações de hidrólises, no total são 12 subgrupos de enzimas hidrolases. Essa classe de enzimas é muito importante para o catabolismo celular, muitas delas não necessitam de coenzimas e algumas podem atuar no meio extracelular como por exemplo as lipases (BISATTO, 2012).

2.5.1 *Lipases*

As lipases se destacam dentre outras enzimas devido as suas múltiplas aplicações, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, cosméticos, biodiesel, no tratamento de efluentes e no desenvolvimento de biossensores (MESSIAS et al., 2011). Além das reações de hidrólise as lipases catalisam reações de esterificação e transesterificação, podendo atuar na interface aquoso-não aquoso.

As enzimas lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3), atuam na interfase orgânico-aquosa, catalisando a reação de hidrólise de substratos insolúveis em água: óleos e gorduras com a liberação de ácidos graxos, mono ou diacilgliceróis e glicerol. As reações de hidrólise catalisadas pelas lipases envolvem ataque na ligação éster do triglicéride na presença de moléculas de água produzindo glicerol e ácidos graxos (Figura 5). Uma característica muito importante dessas enzimas é a habilidade das lipases de não apenas hidrolisar ligações éster, mas também de sintetizar ligações éster em meio não aquoso (MACRAE e HAMMOND, 1985). Elas também catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (MENDES et al., 2012).

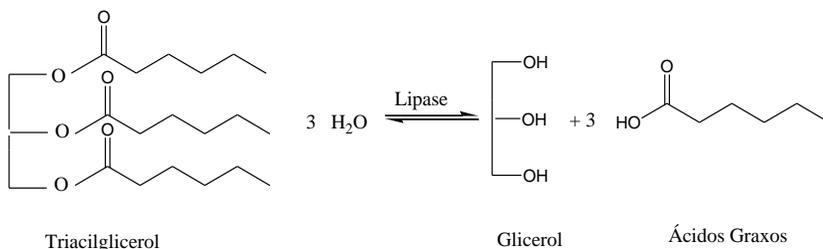


Figura 5. Mecanismo da reação de hidrólise de um triglicerídeo catalisado por lipase em meio aquoso.

A tríade catalítica das lipases (Figura 6) é formada por três resíduos de aminoácidos: um resíduo de serina, que é responsável pela catálise, unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina e um resíduo de ácido glutâmico ou aspártico (EGLOFF et al., 1995; JAEGER et al., 1999; OLLIS et al., 1992).

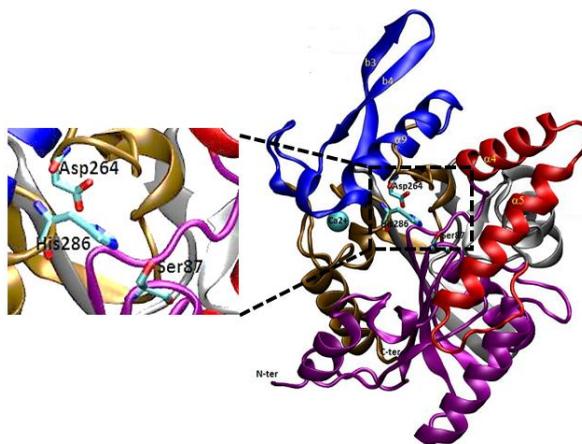


Figura 6. Estrutura tridimensional da lipase e os resíduos dos aminoácidos que compõem a tríade catalítica: serina, histidina e aspartato, extraídas do *Pseudomonas cepacia*. (Fonte: Adaptado BISATTO, 2012).

A tríade que compõem o sítio ativo das enzimas lipases é o responsável pela sua ação catalítica, contém os aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) ou ácido glutâmico (Glu). Durante uma catálise enzimática o sítio ativo da enzima liga-se ao substrato, alterando e favorecendo energeticamente a reação (CHAMPE e HARVEY, 1996).

O mecanismo para hidrólise de ésteres pela ação catalítica das lipases é composto por cinco etapas mostradas na Figura 7.

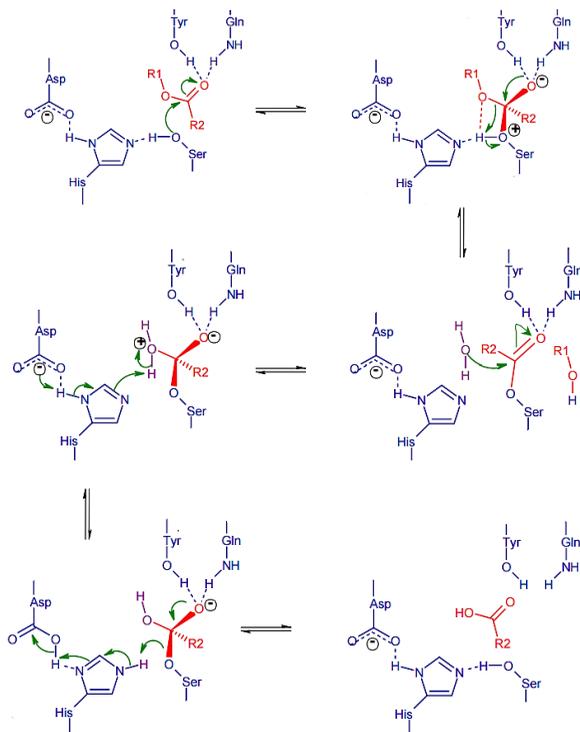


Figura 7. Mecanismo de reação de hidrólise de ligação ésteres catalisadas por lipases. Adaptado de CIGLER et al.,1994.

Inicialmente a histidina por meio de uma ligação de hidrogênio aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico; posteriormente o grupo hidroxila da serina atua como uma base atacando o carbono suscetível da ligação éster, abrindo a ligação C=O, dando origem ao intermediário tetraédrico, que por sua vez é estabilizado por ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida. Nesta fase a histidina atrai o hidrogênio liberado pela serina e o aspartato ou glutamato estabilizam a carga positiva que se forma na histidina (JAEGER et al., 1999).

O pH ótimo da atividade e estabilidade dessas enzimas está na faixa de 6,0 a 8,0 e uma temperatura ótima para atividade máxima entre 30°C a 40°C. Possuem massas moleculares entre 20 a 60 kDa, e seu ponto isoelétrico pode variar entre 4 e 5 (FERRER et al., 2000, HIOL et al., 1999).

As lipases são muitas vezes confundidas com esterases, que catalisam a hidrólise de substratos hidrossolúveis de cadeia carbônica curta, diferentemente das lipases que catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa hidrofóbicos (< 10 carbonos) (FORJAN et al., 2000).

As lipases são largamente aplicadas na indústria em processos de processamento de alimentos, detergentes e síntese de produtos utilizados na química e fármacos, também auxiliam no processamento de óleos e gorduras, na produção de cosméticos, além de serem aplicadas em sistemas de tratamento de efluentes gordurosos (TREVISAN, 2004). Na Tabela 3, estão elencadas algumas aplicações industriais dessas enzimas conforme o tipo de reações que catalisam.

Tabela 3. Aplicações industriais de lipases de acordo com o tipo de reação de catálise enzimática. (Durlí, 2007)

Tipos de reações	Área de aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (Processamento de óleos)	Hidrólise óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes para análise de lipídeos)
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleos	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnóstico
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes

	Indústria alimentícia	Esterificação transesterificação	ou	Óleos e gorduras, flavorizantes, produção de aromatizantes
	Industria farmacêutica	Síntese intermediários medicamentos	de em	Anti-inflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen)
Transesterifi cação	Indústria Fina	Transesterificação óleos vegetais	em	Produção de biodiesel

As enzimas também são aplicadas na construção de biossensores. Mauricio et al., (2014) desenvolveram um biossensor potenciométrico para controle da qualidade de óleos de gergelim comestível, baseado em enzimas lipases comercial oriunda do *Candida rugosa* tipo VII.

Siqueira (2009) desenvolveu um biossensor eletroquímico ‘screen-printed’ para detecção de triglicérides, baseados em enzimas lipases solúveis imobilizadas por adsorção física no eletrodo de trabalho uma mistura de pasta de carbono e quitosana contida sobre fitas poliméricas.

As fontes de lipases são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser produzidas por animais, plantas e microrganismos. Nos animais as lipases atuam no metabolismo de lípídeos, como a digestão, a adsorção, a reconstituição das gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA, et al., 2001). A maioria das lipases utilizadas em indústria para fins biotecnológicos tem sido isoladas de bactérias e fungos (LIN et al., 2006).

2.6 Fungos na produção de enzimas lipases

Enzimas lipases podem ser obtidas a partir de fontes naturais, como animais, vegetais e microbiana (CASTRO et al., 2004). Sendo as lipases microbianas as preferidas para aplicação industrial (MAHADIK et al., 2002). Essas enzimas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade ao substrato e isso as torna especialmente atrativas para aplicação industrial (HASAN et al., 2006).

As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas, não necessariamente devido às suas melhores características em relação à lipases bacterianas,

mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAERGER et al., 1994). Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas (MAIA et al., 2001). Diversos gêneros de fungos filamentosos têm sido estudados como fonte de lipases, entre eles estão: *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Verticillium*, entre outros (RAPP e BACKHAUS, 1992).

Entre as enzimas fúngicas importantes para a indústria destacam-se as amiloglucosidases, produzidas por *Aspergillus* e *Rhizopus*; as α -amilases, que podem ser isoladas da linhagem *Aspergillus niger*, essas enzimas catalisam a quebra do amido em dextrinas e oligossacarídeos; e as lipases que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis em condições normais, também catalisam reações de transesterificação e síntese estereoespecífica de ésteres em uma diversidade de substratos (PASTORE e MACEDO, 2004).

2.6.1 Fungos Endofíticos

Endofíticos são definidos como: “todo microrganismo cultivável ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar nenhum dano ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas, com exceção de bactérias *ondulantes* e fungos *micorrízicos*” (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006). De Bary (1866) descreveu o termo endofítico pela primeira vez, como microrganismo que vive nos tecidos de plantas, e epifíticos que vivem na superfície (CHAPLA et al., 2013).

Os endofíticos estabelecem relações simbióticas com a planta e seu hospedeiro, que lhes fornecem nutrientes e compostos necessários para término do seu ciclo de vida. Para a planta essa associação com o fungo, proporciona resistência a patógenos e a outros estresses abióticos, melhorando sua capacidade competitiva pela produção de metabólitos e hormônios de crescimento (KAUL et al., 2012; STROBEL, 2003). Eles podem hospedar plantas que crescem em diferentes regiões e condições ambientais diferentes, como por exemplo, as plantas que crescem no Ártico e na Antártida, no deserto, solos geotérmicos entre outros (KHARWAR et al., 2011).

Os estudos sobre fungos endofíticos vêm ganhando uma grande importância nos últimos anos, especialmente a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico, além de apresentarem um potencial relevante no controle de pragas (HAWKSWORTH, 1991; AZEVEDO, 1998). O taxol que vem sendo utilizado no tratamento de câncer de mama e de útero é o principal exemplo de metabólito secundário produzido por fungos endofíticos (AZEVEDO et al., 2002).

Um exemplo de aplicação de enzimas produzidas por fungos endofíticos na construção de biossensores, foi descrita por Grawe et al., 2015, onde enzimas esterases produzidas pelo fungo endofítico *Eupenicillium shearii* FREI-39, foram empregadas no desenvolvimento de um biossensor para determinação do pesticida carbofuram em água.

2.7 Biossensores baseados no processo de inibição enzimática

Os biossensores enzimáticos podem fazer uso da atividade enzimática como sinal analítico a ser monitorado. Dentre os vários tipos, merecem destaque aqueles em que o monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima, na qual a atividade é medida antes e após a inibição. Este processo é efetuado pela exposição da enzima a um inibidor específico, por um determinado tempo, sendo que a percentagem de inibição sofrida pela enzima está quantitativamente relacionada com a concentração do agente inibidor (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

Dentre os biossensores a base de inibição os mais descritos na literatura são baseados na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), fosfatases, tirosinases e peroxidases como uma técnica de monitoramento com diversas aplicações ambientais, agrícolas, clínicas e alimentares (MARTINEZ, 2011). As enzimas AChE são hidrolases e catalisam a quebra do neurotransmissor Acetilcolina produzindo a colina e ácido acético. Essas enzimas podem ser inibidas por uma gama de compostos tóxicos como pesticidas organofosforados e carbamatos, nicotina e metais pesados. Para a inibição com pesticidas organofosforados, a enzima AChE fosforilada é estável, o que resulta em um processo de inibição irreversível. Para os Carbamatos o complexo formado enzima e inibidor é facilmente desfeito, sob condições específicas, o que faz deste processo de inibição ser

considerado reversível (ZHANG et al., 2010; MARQUES e YAMANAKA, 2008; GRAWE et al., 2014).

SHAMAGSUMOVA et al., (2015) desenvolveu um biossensor baseado em AChE imobilizada em negro de fumo sobre a superfície do carbono vítreo para determinação de pesticidas com transdução amperométrica. Os limites de detecção obtidos pelo biossensor foram de 4×10^{-12} , 5×10^{-9} , 2×10^{-11} e 6×10^{-10} mol L⁻¹ para os pesticidas malaoxon, metil-paraoxon, carbofuram e aldicarb respectivamente.

Os processos de inibição reversíveis são mais interessantes para a aplicação dos biossensores, do ponto de vista prático, pois desta forma a enzima pode participar de mais de um ciclo catalítico aumentando assim o tempo de vida útil do biossensor.

2.8 Benzimidazois

A utilização de pesticidas (herbicidas, acaricidas, fungicidas e inseticidas), tem se intensificado nos últimos anos, isso porque essas substâncias são muito úteis e importantes para tratar de uma vasta gama de doenças causadas por vários insetos, fungos e outras pragas para se atingir altos índices de produção de alimentos.

O Estado de Mato Grosso desempenha um papel fundamental no agronegócio do país. Na escala nacional de produção de cereais, leguminosas e oleaginosas o relatório de Estatística da Produção agrícola de Janeiro de 2017, relata que a safra nacional totalizou em 221,4 milhões de toneladas, 20,3% superior da obtida no mesmo período no ano passado. Entre estes a Região Centro-Oeste representa 94,0 milhões de toneladas o que representa 42,5 % da produção total, sendo o Estado de Mato Grosso responsável por 24,6 % da participação, como apresentado na Figura 8 (IBGE, 2017).

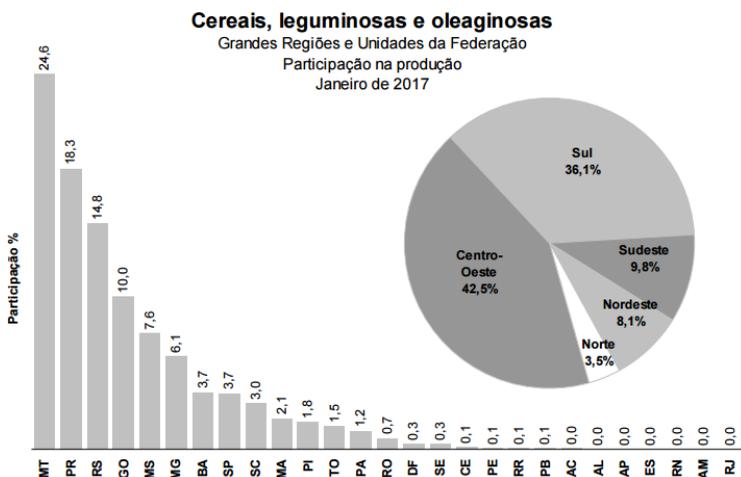


Figura 8. Relatório de Estatística da Produção agrícola de Janeiro de 2017, para safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas. Fonte: IBGE, 2017.

Toda essa grande produção se deve a utilização de técnicas de plantio e maquinários mais sofisticados, como também a utilização de pesticidas que aumentam a produção e reduzem as populações de pragas e doenças. Entretanto, essas substâncias são responsáveis pela poluição de vários componentes ambientais, apresentando um risco para a saúde humana e ambiental. A utilização inadequada destes produtos químicos pode levar à intoxicação do homem e outros organismos.

Devido às suas propriedades e eficácia, os fungicidas orgânicos da classe dos benzimidazóis são muito utilizados na agricultura. Esses pesticidas são aplicados no tratamento de sementes e do solo e em aplicações de foliares em culturas de algodão (sementes), citros (folhas), soja (sementes e folhas) (COUTINHO et al., 2006).

Os pesticidas desta classe atuam nos fungos por meio da inibição de proteínas específicas, chamadas de alfa e beta tubulina. Quando essas proteínas entram em contato com tais fungicidas, a formação dos microtúbulos por meio da polimerização é inibida, resultado disso é que as células não se dividem e passam a ser multinucleadas, levando o

fungo à morte (BASF, 2006). Essa propriedade dos benzimidazóis faz com que esse fungicida apresente alto risco de resistência adquirida pelo patógeno (RODRIGUES et al., 2007).

Dentre os principais compostos do grupo dos benzimidazóis, podemos citar o benomil, tiabendazol, tiofanato metílico e o carbendazim (CBZ) (KUSSUMI, 2007), sendo o carbendazim o ingrediente ativo mais utilizado.

2.8.1 Carbendazim

O Carbendazim (CBZ) é um dos ingredientes ativos mais utilizados dos fungicidas sistêmicos do grupo benzimidazóis utilizado no controle de uma grande variedade de doenças em plantações de frutas, vegetais, algodão, cereais entre outros, pois também atua na proteção de culturas contra doenças fúngicas pós-colheita (KHAMMAS, 2016). Este pesticida pode ser encontrado comercialmente como Bendazol[®] e Derosal 500 SC[®].

2.8.1.1 Propriedades Físico-químicas

O Carbendazim é um fungicida sistêmico de amplo espectro, com ação protetora e curativa, do grupo químico dos benzimidazóis, quimicamente conhecido como metil benzimidazol-2-il carbamatos (KHAMMAS, 2016). Seu registro no CAS (American Chemical Society) é 10605-21-7 (ANVISA, 2007), e sua estrutura química está apresentada na Figura 9.

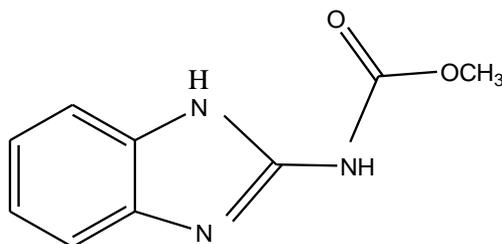


Figura 9. Fórmula estrutural do carbendazim.

O Carbendazim $C_9H_9N_3O_2$ se apresenta como um sólido cristalino branco de odor característico, de classificação toxicológica III (ANVISA, 2007), é estável em condições normais de armazenamento (COUTINHO, 2006). Algumas propriedades do carbendazim são listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do Carbendazim.

Propriedades Físico-Químicas do Carbendazim	
Massa molecular	191,187
Densidade	0,27 g/mL
Ponto de Fusão	250 °C
Coefficiente de partição (K_{ow})	1,49 octano-água
pKa	4,2
Solubilidade em água	28,0 mg L ⁻¹ (pH 4,0)
	8,0 mg L ⁻¹ (pH 7,0)
	7,0 mg L ⁻¹ (pH 8,0)
Solubilidade em solventes orgânicos	300 mg L ⁻¹ (etanol e acetona)
	100 mg L ⁻¹ (clorofórmio)
	36 mg L ⁻¹ (benzeno)
	0,5 mg L ⁻¹ (hexano)

2.8.1.2 Carbendazim no meio ambiente sua ecotoxicidade e toxicidade.

A degradação do carbendazim é lenta no meio ambiente isso devido à natureza benzimidazólico do anel em sua estrutura que é difícil de quebrar, assim ele persiste por um longo tempo no meio ambiente. Resíduos de carbendazim e seus metabólicos são fortemente encontrados ligados ou incorporados a matéria orgânica do solo pelo anel imidazol da molécula do fungicida, o que faz com que estes persistam por mais de 3 anos (FERNANDEZ et al., 2001).

Este fungicida apresenta baixo efeito sobre a comunidade microbiana do solo, entretanto é letal para minhocas. É altamente tóxico para comunidade aquática: peixes (bioacumulação e mortalidade), plantas aquáticas (reprodução) e crustáceos (mortalidade). É pouco tóxico para pássaros e atóxico para abelhas (COUTINHO, 2006).

Em humanos as principais vias de exposição envolvem a dieta e os processos de fabricação e manuseio do produto podendo causar irritações na pele. Apresenta uma baixa toxicidade aguda e absorção dérmica para mamíferos, isso faz com que a intoxicação por essas vias seja pouco provável nas condições normais de uso. Em animais ele é metabolizado em 5-hidroxi-1H-benzimidazol-2-il carbamatos e outros produtos polares que rapidamente são excretados pelas fezes e urina (COUTINHO, 2006).

Disfunções do sistema nervoso central, hepáticas, renais, estomacais, dano ocular e dermatite, anemias e outras disfunções sanguíneas podem ser ocasionadas por meio da exposição crônica às formulações de carbendazim. Estudos mutagênicos e carcinogênicos não foram observados em seres humanos e nem em estudos com ratos (BASF, 2006).

2.8.1.3 Legislação

No Brasil o Ministério da Saúde de acordo com a portaria N° 2914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabeleceu um limite de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para carbendazim e benomil.

A Agência de Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio do regulamento técnico de 19 de dezembro de 2007 estabeleceu a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de carbendazim de 0,02 mg/ kg.

2.8.1.4 Métodos para a determinação do Carbendazim

Várias técnicas analíticas já foram descritas na literatura para determinação do CBZ, dentre as mais comuns estão as técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV (MELO et al., 2005), detector de massas (CLAE-EM), cromatografia iônica com detector de fluorescência (CABALLO-LÓPEZ e CASTRO, 2003)

No trabalho de Moura (2013), foi estudado e avaliado amostras de água e sedimento do Rio Piquiri, localizado no Estado do Paraná próximo a uma região de alta

produção de trigo, soja e milho. Para as extrações em amostras de água, foi utilizado uma mistura de diclorometano:hexano, concentradas 500 vezes, e para as amostras de sedimentos um mistura de acetona:hexano, concentradas 25 vezes. Essas amostras foram analisadas em CL/EM/EMS onde foram confirmadas a presença dos herbicidas e fungicidas mais utilizados na região, como Carbendazim, Atrazina e Azoxistrobina. Para as amostras de água o valor encontrado para Carbendazim foi de $0,178 \mu\text{g L}^{-1}$ e para as amostras de sedimentos

$26,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ribeiro et al., (2013), analisaram a presença de 16 pesticidas em matrizes de águas superficiais na região das nascentes do Rio São Lourenço, no Mato Grosso, no período entre agosto de 2010 e junho de 2011. As análises foram feitas por CLAE com arranjo de diodos como detector (CLAE-DAD), empregando uma pré-concentração por extração em fase sólida (SPE), com cartuchos de SDVB (copolímero estireno/divinilbenzeno). A quantificação foi realizada empregando terbutilazina como padrão interno, apresentando um LD para o carbendazim de $12 \mu\text{g L}^{-1}$.

As técnicas cromatográficas apresentam boa sensibilidade, confiabilidade e precisão além de possibilitar detecção de multirresíduos. No entanto, elas são complexas, necessitam de um tempo relativamente maior e além do alto custo. Alternativamente os métodos eletroanalíticos, apresentam diversas vantagens, como baixos limites de detecção, rapidez na execução da análise, capacidade de miniaturização e detecção *in situ* além dos preços relativamente mais baixos.

Métodos eletroanalíticos também tem sido descritos na literatura para a determinação de carbendazim. Katoaka (2015) modificou um eletrodo de carbono vítreo pela deposição de um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizadas e decoradas com nanopartículas de ouro. O desempenho do sensor foi avaliado para determinação do pesticida carbendazim por voltametria de onda quadrada (VOQ) em tampão fosfato pH 7,0. A metodologia desenvolvida apresentou um limite de detecção de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $5,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Hernandez et al., (1996), utilizou eletrodo de grafite modificado com silicone OV-17 (fenil-metilsilicona, 50% dos grupos metílico e 50% dos grupos fenóis.) para

determinação do Carbendazim por voltametria de pulso diferencial. A caracterização do eletrodo foi realizada por voltametria cíclica em meio ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,1 \text{ mmol}$ de ferroína. O método proposto apresentou um erro relativo de $3,7\%$ e um limite de determinação de $9,1 \text{ ng. mL}^{-1}$, e foi aplicado para amostras de vinho, maçã e solo cultivado previamente tratado com benomil, cujo a degradação origina o Carbendazim.

Razzino e colaboradores (2015) descreveram a aplicação de um sensor de carbono vítreo modificado com uma fina película de material híbrido de sílica mesoporosa/nanotubos de carbono de paredes múltiplas ($\text{SiO}_2/\text{NTCPMs}$), para determinação de carbendazim por VOQ. Foi observado um pico de oxidação para o carbendazim em $0,73 \text{ V (Ag/AgCl)}$ em solução tampão pH 7,0. Obtendo uma boa linearidade na faixa de concentração de $0,2$ a $4,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, e um LD de $0,056 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Maximiano et.al., (2016) desenvolveram um método eletroquímico simples utilizando eletrodo de pasta de carbono (grafite + nujol) para determinação de carbendazim em amostras de suco de frutas cítricas: tangerina, limão e laranja. Para otimização eletroquímica foi empregada a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada. As melhores condições de trabalho foi utilizando tampão Britton-Robinson $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de pulso de 125 mV , incremento de potencial de 8 mV e frequência de 60 Hz . Um curva de calibração foi obtida em uma faixa linear de $2,75$ a $87,30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ com um limite de detecção de $1,95 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, o método proposto foi aplicado em amostras de frutas obtendo recuperações entre $93,3 \%$ a $99,1 \%$.

Os biossensores tem se destacado também na determinação de pesticidas, dentre os mais descritos na literatura estão os baseados na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Onde o processo de detecção do pesticida se baseia na diminuição do sinal base do substrato da enzima na presença de pesticida, e esta diminuição do sinal é proporcional a sua concentração na amostra (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

2.9 Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos são um conjunto de técnicas qualitativas e quantitativas que se baseiam nas propriedades elétricas da espécie de interesse. Em solução

a transferência de elétrons acontece na superfície do eletrodo, sendo dependente do material do eletrodo e da solução eletrolítica. Essas técnicas têm se destacado nos últimos anos, devido à possibilidade de análises com alto grau de seletividade por meio da utilização de eletrodos modificados (GONÇALVES et al., 2011). Dentro os métodos eletroanalíticos se destacam as técnicas voltamétricas.

As técnicas voltamétricas se baseiam nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução. As informações sobre os analitos são obtidas por meio de medida de corrente em função de um potencial aplicado e em condições que favorecem a polarização do eletrodo de trabalho (SKOOG, et al., 2009; PACHECO, et al.; 2013).

Para fins analíticos, várias formas de voltametria encontram-se em uso, como as voltametrias de pulso.

As voltametrias pulsadas tem como base a medição da corrente em função do tempo após a aplicação de um pulso de potencial conhecido. A diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que define as características básicas de cada uma das técnicas pulsadas (SOUZA et al., 2003). As técnicas voltamétricas pulsadas tem superado quase completamente o método clássico em razão de sua maior sensibilidade e limites de detecção significativamente menores, pois nestas técnicas a contribuição da corrente capacitiva nos valores das correntes é mínimo (ESTEBAN et al., 2006)

2.9.1 *Voltametria de Onda Quadrada*

A voltametria de onda quadrada (VOQ), do inglês Square Wave Voltammetry é uma técnica voltamétrica de pulso, e é considerada a mais rápida e em algumas aplicações de maior sensibilidade. Possui limites de detecção comparáveis as técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SKOOG et al., 2009; SOUZA et al., 2003).

Na Figura 10 está demonstrada a forma de aplicação de potencial na VOQ, que consiste na superposição de uma onda quadrada a uma função rampa escalonada em degraus de potencial (HARRIS, 2001)

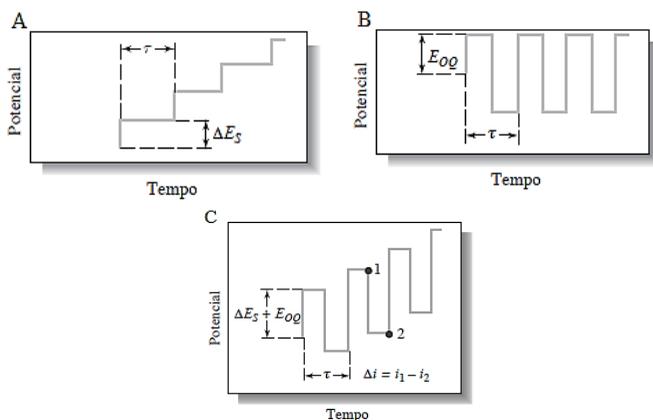


Figura 10. Sinal de excitação produzido em voltametria de onda quadrada. O sinal na forma de escada em (a) é adicionado a uma sequência de pulsos em (b) que dá o sinal de excitação de onda quadrada mostrado em (c). Onde ΔE_S é variação do potencial de escada, E_{SW} é a magnitude do pulso e τ é o período do pulso. Fonte: Skoog et al., 2009).

Em (c) representa o sinal de excitação, que é obtido pela superposição da sequência de pulsos exibida na parte (b) sobre o sinal na forma de escada exposto em (a) (SKOOG et al., 2009). A largura de cada degrau da escada e o período dos pulsos (τ) são idênticos. ΔE_S é o potencial de cada degrau da escada e o ΔE_{00} é a grandeza do pulso. A frequência de aplicação dos pulsos (f) em Hz é dada por $1/\tau$ (SKOOG et al., 2009).

Em VOQ, as correntes são medidas no final de cada pulso o que diminui a contribuição da corrente capacitiva, pois neste ponto esta se torna negligenciável. Os voltamogramas são registrados medindo as correntes dos pulsos diretos, correntes positivas (i_1), e dos pulsos inversos, correntes negativas (i_2), que resulta em um sinal de forma diferencial (Δi) em função do potencial aplicado, gerando um voltamograma com um pico na forma gaussiana como representado na Figura 11. A diferença de corrente de pico é diretamente proporcional à concentração do analito.

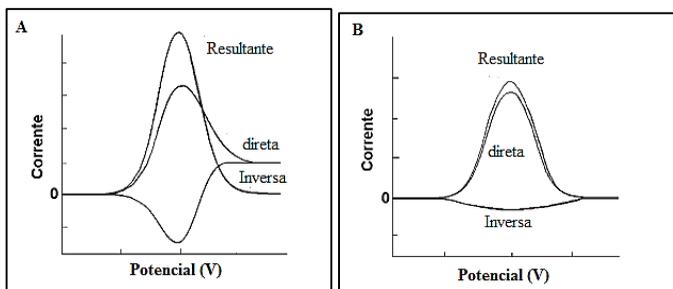


Figura 11. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde A) representa um processo redox de um sistema reversível e B) de um sistema irreversível. (Souza, Machado e Avaca ,2002).

Na Figura 11 está representado um voltamograma para um sistema redox reversível em A, e para um sistema redox irreversível em B, observa-se que para um sistema reversível observa-se um pico direto e um pico reverso e o pico resultante é de maior intensidade.

Oliveira et al. (2014) descreveram o desenvolvimento de um biossensor bi-enzimático utilizando lacase e tirosinase imobilizadas sobre uma superfície de pasta de carbono dopada com grafeno para a determinação do pesticida carbaril e outros pesticidas em limão, tangerina e laranja por VOQ. A pasta de carbono foi preparada utilizando pó de grafite, óleo mineral seguida de dopagem com grafeno, o material compósito foi preparado pela mistura de diferentes quantidades de nanopartículas de ouro, quitosana, lacase e tirosinase. Os pesticidas carbamatos foram quantificados com base nas suas capacidades de inibição da reação enzimática na presença do substrato. O método se mostrou linear na faixa de concentração estudada $9,90 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,91 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, com LD de $1,98 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o carbaril e porcentagens de recuperação entre 94,8 a 96,8%.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um biossensor enzimático baseado em extrato de enzimas lipases oriundas de fungos endofíticos, imobilizadas em um suporte lamelar contendo nanopartículas de ouro, para determinação do pesticida Carbendazim em amostras de água.

3.2 Objetivos Específicos

Selecionar um extrato de fungo endofítico que apresente uma boa atividade para enzimas lipases;

Avaliar a imobilização do extrato enzimático de lipase no suporte lamelar;

Analisar a contribuição dos componentes da pasta à base de carbono do biossensor;

Otimizar os parâmetros da técnica eletroquímica na resposta do biossensor;

Aplicar o biossensor proposto para determinação de Carbendazim em amostras de água.

Avaliar a estabilidade, repetibilidade, precisão e exatidão da resposta do biossensor.

Comparar os resultados obtidos com o método cromatográfico de referência, e especificado pela ANVISA.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados na realização dos experimentos foram de pureza analítica e empregados sem mais purificação. Na tabela 5, está apresentada a procedência e pureza dos reagentes.

Tabela 5. Procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados no trabalho.

Reagentes	Procedência	Pureza (%)
Ágar power, bacteriological	HIMEDIA	-
Albumina de soro bovino	Sigma-Aldrich	99,98
Álcool iso-propílico P.A	Cinética	99,5
Carbonato de sódio	Synth	99,5
Carbendazim	Sigma-Aldrich	97,0
Cloreto de sódio	Sigma-Aldrich	≥99,5
Extrato de levedura puríssima	Vetec	-
Fosfato de potássio dibásico anidro	Synth	98,0
Fosfato de sódio dibásico anidro	Synth	99,0
Fosfato de sódio monobásico anidro	Synth	98,0-102,0
Nanotubos de carbono multi-camadas	Sigma-Aldrich	>90,0
<i>p</i> -nitrofenil palmitato	Sigma-Aldrich	-
<i>p</i> -nitrofenil acetato	Sigma-Aldrich	-
<i>p</i> -nitrofenol	Sigma-Aldrich	Grau espectrofotométrico
Pó de grafite	Sigma-Aldrich	98,0
Reagente de Bradford	Sigma-Aldrich	-
Rodamina B P.A.	Synth	-
Sabouraud 4% glucose ágar	Fluka	-
Sulfato de Magnésio hepta hidratado	Synth	98,0 – 102,0
Triton® X-100	Sigma-Aldrich	-
Tween 20	Synth	U.S.P

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q® Gradiente' da Millipore (Bedford, MA, EUA).

Para as análises voltamétricas foram utilizadas soluções tampão fosfato salino (PBS)

$0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, pH 7,0) preparadas a partir dos sais NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , com posterior adição de NaCl e pH corrigido para 7,0 com NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas em geladeira.

A solução do substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) foi preparada utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), 200 mg de triton X-100 e 50 mg de goma arábica para cada

50 mL de tampão. Primeiramente a massa do *p*-NPP foi dissolvida em isopropanol, cerca de 5 % da solução final, em seguida esta solução foi deixada em banho ultrassônico por 5 minutos, posteriormente foi acrescentado uma quantidade apropriada da solução tampão com os surfactantes e colocado em banho ultrassônico por mais 10 minutos. A solução foi armazenada em frasco âmbar em freezer a aproximadamente $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 1^\circ\text{C}$) e utilizada no mesmo dia do preparo.

A solução de *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi preparada solubilizando o reagente em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e utilizada no mesmo dia.

A solução de albumina foi preparada a partir da diluição da solução estoque de 100 mg L^{-1} em água Milli-Q.

A solução de *p*-NPA utilizada como substrato nas análises voltamétricas, foi preparada em tampão PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0. Primeiramente o substrato foi dissolvido em metanol, cerca de 2% da solução final, em seguida, transferido vagarosamente ao tampão PBS

$0,1 \text{ mol L}^{-1}$ resfriado. A solução foi mantida sob banho de gelo, e sempre preparada no mesmo dia das análises.

A solução do pesticida carbendazim para as análises voltamétricas e cromatográficas foram feitas diluindo o sólido em 2% da solução final em metanol e avolumado com água Milli-Q.

4.2 Instrumentação

Para o preparo das soluções foram utilizadas micropipetas de volume variável (1-10 mL, 100 - 1000 μ L, 10 - 100 μ L) Eppendorf Research® com ponteiros descartáveis. As pesagens foram feitas em uma balança analítica da Shimadzu modelo AX200. No preparo das soluções foi utilizado um Banho ultrassônico modelo Ultra Cleaner 1400 da Unique. Para correções de pH utilizou-se um potenciômetro mPA210 da marca MS TECNOPON instrumentação.

Para a preparação dos extratos endofíticos, foi usada uma mesa agitadora modelo 7400 tubingens da Edmund Buhler e uma capela de fluxo laminar modelo PA 610 da Pachane. Os extratos foram armazenados em microtubos tipo Eppendorf 2,0 mL com tampa. Para a centrifugação dos extratos foi empregada uma centrífuga Hettich modelo 460 Rotanta R.

Um espectrofotômetro UV-vis Cary Varian® 50, equipado com uma lâmpada de xenônio, divisor de feixes e uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de lipase nos extratos endofíticos.

As análises voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab modelo PGSTAT302 da EcoChemie, com célula eletroquímica de vidro e um sistema de três eletrodos, onde o eletrodo de trabalho é o biossensor, Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e como contra eletrodo uma placa de platina.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um microscópio da marca Shimadzu modelo SSX-550 SuperScan, com um programa de aquisição de dados SS50. A metalização da amostra foi realizada por meio da Metalizadora de ouro ICSO da Shimadzu.

As análises de Infravermelho (IV) foram realizadas num Espectrofotômetro Shimadzu Modelo IRAffinity-1. Utilizou-se um sistema de prensa hidráulica da Shimadzu Modelo SSP-10A, para obtenção das pastilhas de KBr. Para aquisição dos espectro de IV foi usado o software IRSolution Versão 1.50, utilizando os seguintes parâmetros de aquisição: Modo de Medida (% Transmittância); Intervalo de 350 à 4700 cm⁻¹.

Os testes comparativos para a resposta do biossensor foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas (CLAE-EM).

As análises por CLAE- DAD foram realizadas em Cromatógrafo modelo Varian Pro Star 240, com injetor automático, modelo 410 autosampler, detector de absorvância UV com arranjos de diodo, modelo 330. Foi utilizada uma coluna C18 Gemini, 150 mm x 4,6 mm d.i., 5µm, e pré-coluna 20 mm x 4,6 mm d.i. da mesma fase da coluna principal, ambas da marca Phenomenex, com monitoramento em 280 nm.

As análises por CLAE_EM foram realizadas num Sistema de Cromatografia Líquida com Detecção por Espectrometria de Massas e realizadas por dois métodos: Infusão direta da amostra visando otimização dos parâmetros de detecção dos espectros padrão do carbendazim EM e EM/EM; injeção em sistema de cromatografia líquida para obtenção de cromatograma/ espectros de massas visando a quantificação do analito. Ion Trap, equipado com: Sistema de injeção automático (Modelo: Varian ProStar 410); sistema de bombas binário (Modelo: Varian ProStar 210); detector de espectrometria de massas do tipo Ion Trap (Modelo: Varian 500MS) e software de aquisição e tratamento dos dados (Varian MS Workstation – Versão 6.9.3).

Para o detector de massas o modo de aquisição dos íons foi pelo método de Infusão direta da amostra: Fluxo de Infusão:100 µL/min; Parâmetros Aquisição MS/MS Turbodds: voltagem da agulha ±5500V, voltagem do spray Shield: ±600V, Pressão de nebulização 50psi, pressão do gás de secagem: 20psi, temperatura do gás de secagem: 200 °C, voltagem do capilar: 72V, variação de massa (190-195 m/z), polaridade positiva

Utilizou-se coluna Kromasil C18, com as especificações de 100A, 5µm, 250 x 4,6mm, corrida de 10 minutos.

4.3 Preparação dos extratos enzimáticos

Os fungos endofíticos foram coletados, isolados e identificados pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), coordenado pelo Professor Dr. Marcos Antônio Soares.

Inicialmente noventa fungos foram submetidos ao teste qualitativo de produção de lipase. Esses fungos foram primeiramente inoculados em frascos de penicilina contendo meio sólido batata-ágar-dextrose (BDA). O meio BDA é composto por 200,0 g/L de batata, 20,0 g/L de dextrose e 15,0 g/L de ágar. Após três dias os fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio comercial Sabouraud, para então serem submetidos ao teste qualitativo de lipase.

O teste qualitativo consiste na inoculação dos fungos em placa de Petri contendo o meio sólido Rodamina B incubados num período de três dias. O meio Rodamina B foi preparado com 1% de óleo de oliva, 0,001 de Rodamina B (m/v), 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,4 g/L K_2HPO_4 , 2,0 g/L de extrato de levedura, 0,01% de tween 80, 14 g/L de ágar e água destilada (OLIVEIRA et al., 2013). A produção de lipase pelo fungo na placa de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV quando observados no ultravioleta a 350 nm após o tempo de incubação.

As linhagens produtoras de lipase foram submetidas ao crescimento em meio líquido, que continha os mesmos componentes do meio sólido Rodamina B, com exceção do ágar e da Rodamina B, denominado de meio azeite de oliva. Cinco fragmentos de aproximadamente $1mm^2$ foram transferidos para frascos erlernmeyer contendo 50 mL do meio líquido e mantidos sob agitação orbital a 75 rpm em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) durante um período de 8 dias (Figura 12).



Figura 12. Fungo endofítico *Trichoderma harzianum* P39. (Esquerda) inoculado em meio Sabouraud no terceiro dia e (direita) extrato do endofítico em meio azeite de oliva no sexto dia de crescimento.

Todos os materiais usados na manipulação dos fungos e de seus extratos foram previamente auto clavados e tratados em luz UV por 15 minutos para eliminar qualquer contaminação. As placas de Petri utilizadas foram esterilizadas em estufa na temperatura de 120 °C por 2 horas.

4.4 Determinação da atividade da lipase

Para a reação de determinação de atividade total de lipase foram adicionados 2400 µL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ que continha 397 µmol L⁻¹ do substrato *p*-NPP goma arábica e triton X-100 em tubo de ensaio contendo 100 µL de extrato endofítico. O tubo foi mantido em banho aquecido a 37°C durante 1 hora. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de uma solução de carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ parando a reação devido ao aumento do pH. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata. O controle do experimento foi realizado usando as mesmas condições descrições anteriormente, substituindo o extrato endofítico pela mesma quantidade do meio líquido.

4.5. Determinação da concentração de proteínas no extrato

A concentração total de proteínas foi determinada usando o método de Bradford (1976). Esse método se baseia na interação entre o corante de “Coomassie brilliant blue” (BG-250) e as macromoléculas de proteínas da amostra, resultando no deslocamento do equilíbrio químico do corante para sua forma aniônica (um cromóforo que absorve em 600 nm).

Para isso foi construída uma curva analítica usando como padrão albumina de soro bovino (ASB) nas concentrações de 5,0; 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg mL⁻¹. Posteriormente os extratos endofíticos foram analisados. Para as análises 600 µL do reagente de Bradford (BG-250) foram adicionados em 50µL dos padrões e dos extratos endofíticos. Após 5 minutos de reação, a absorbância da solução foi registrada em 600 nm. A concentração de proteínas totais foi calculada de acordo com a equação de reta obtida da curva analítica.

4.6 Determinação de coeficiente de absorção molar do *p*-nitrofenol

O coeficiente de absorção molar (ϵ) do *p*-NP foi determinado registrando espectros de absorção na faixa de 200 a 800 nm, das soluções de *p*-NP nas concentrações de 10 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a obtenção dos espectros, foi levantada uma curva do valor de absorção no comprimento de onda máximo (λ_{Max}) versus a concentração do *p*-NP, sendo o valor de ϵ igual ao coeficiente angular da regressão linear realizada na curva.

4.7 Imobilização enzimática e construção dos sensores

O processo de imobilização do extrato enzimático foi realizado adicionando-se uma alíquota do extrato enzimático contendo 0,5 U de enzimas lipases em 20,0 mg do suporte hidroxinitrato de zinco lamelar contendo nanopartículas de ouro, e deixado em repouso por cerca de 12 horas em dessecador a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$).

Os biossensores foram construídos a base de pó de grafite e nanotubos de carbono, extrato de endofítico imobilizado em um suporte e óleo mineral, seguindo o esquema proposto na Figura 13.

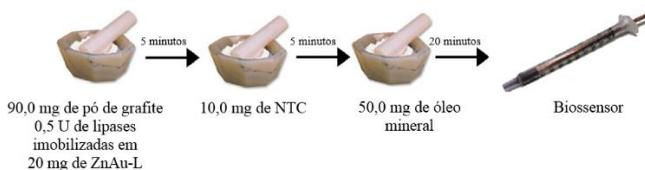


Figura 13. Esquema básico da construção de um biossensor.

Após a imobilização da enzima no suporte, a mistura foi adicionada a 90,0 mg de pó de grafite, seguido de homogeneização por 5 minutos em um almofariz de ágata. Em seguida, foram adicionados 10,0 mg de NTCs na mistura homogeneizando por mais 5 minutos. Por último cerca de 50,0 mg de óleo mineral, seguido de homogeneização por mais 20 minutos produzindo uma pasta. A pasta obtida foi então inserida numa seringa de plástico de insulina 1 mL, da marca BD Plastipak e o contato elétrico feito utilizando um fio de cobre.

Também foram construídos diferentes sensores baseados em pastas de carbono com diferentes composições: EPC (eletrodo de pasta de carbono); EPC/NTC (eletrodo de pasta de carbono + nanotubo de carbono), EPC/NTC/HZnL/AuNPs (eletrodo de pasta de carbono + nanotubo de carbono + hidroxinitrato de zinco lamelar com nanopartículas de ouro), EPC/NTC/HZnAuNPs - EL (eletrodo de pasta de carbono + nanotubo de carbono + hidroxinitrato de zinco lamelar com nanopartículas de ouro + enzima livre), para avaliação da influência de cada componente na resposta do biossensor.

4.8 Caracterização da pasta do biossensor e suporte lamelar

4.8.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura -MEV

Para a caracterização da pasta de grafite do biossensor por MEV, um biossensor foi construído como descrito na (seção 4.6), onde uma pequena amostra da pasta foi retirada da seringa e analisada. Para a análise do extrato enzimático imobilizado no suporte HZnL/AuNPs, 0,5 U de lipase foi imobilizada em 20 mg do suporte e após 12 horas de secagem em dessecador uma pequena quantidade foi submetida a análise. A amostra de HZnL/AuNPs e HZnL/AuNPs-Enzima foram colocadas em um suporte metálico (stub), onde foi fixada com fitas dupla face de carbono. Após a fixação foi utilizado uma tinta condutora de prata na amostra e no stub, afim de melhorar a condutividade.

4.8.2 Espectroscopia de Infravermelho

Inicialmente foi registrada a linha base utilizando uma pastilha de KBr com massa de 0,1 mg. Na sequência, preparou-se as pastilhas de KBr, utilizando-se uma pequena quantidade de amostra ~0,0001g do suporte HZnL/AuNPs puro e do suporte com o extrato enzimático (0,5 U de lipases) imobilizado, e registrados os espectros de infravermelho.

4.9 Otimização dos parâmetros da construção e da resposta do biossensor

Foram avaliados alguns parâmetros na reposta do biossensor, como unidade de lipases imobilizadas em HZnL/AuNPs, concentração do substrato *p*-nitrofenil acetato, pH e força iônica do eletrólito de suporte. Os parâmetros da VOQ, como frequência (Hz), amplitude de pulso (mV) incremento de varredura (mV) e potencial de acúmulo antes da análise foram otimizados a fim de se obter as melhores respostas com o biossensor proposto.

4.10 Repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade da resposta do biossensor

Para se avaliar a precisão da resposta do biossensor, foram determinadas a repetibilidade e a reprodutibilidade da resposta.

A repetibilidade foi avaliada por meio de 10 réplicas medindo-se as correntes resultantes de redução para *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0), com o mesmo biossensor nas condições otimizadas. Foram calculados a média e o desvio padrão relativo.

A reprodutibilidade foi avaliada considerando cinco biossensores preparados e utilizados independentemente sob as mesmas condições experimentais. As medidas foram realizadas em tampão PBS 0,1 mol L (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0) com 50 mmol L⁻¹ de *p*-NPA as medidas foram realizadas em triplicata. Foram calculados a média e o desvio padrão relativo.

A estabilidade do biossensor foi avaliada por meio da medição da corrente de redução do *p*-NPA, durante um período de 20 semanas. Um gráfico de controle de estabilidade foi construído para verificar a garantia e qualidade dos resultados analíticos obtidos.

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação e faixa linear de trabalho, foi construída uma curva analítica.

Para avaliar a exatidão da resposta do biossensor foram feitos testes de adição e recuperação do carbendazim em amostras de água em três níveis de concentração 10, 25 e 75 µg L⁻¹.

Para validação da resposta do biossensor foi empregado um método de referência cromatográfico.

4.11 Curva analítica para Carbendazim

A partir dos parâmetros otimizados na resposta do biossensor, uma curva de calibração externa foi construída para o carbendazim. Para tanto voltamogramas de onda quadrada foram registrados em uma faixa de potencial de -0,4 a -1,2 V, com o biossensor. Inicialmente o biossensor foi imerso na célula eletroquímica contendo solução de *p*-NPA 50 mmolL⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) e a corrente de pico foi registrado como I₀ (sinal base). Posteriormente, o biossensor foi incubado em diferentes concentrações do pesticida (10 a 100 µg L⁻¹) durante 3 minutos e em seguida transferido para célula eletroquímica contendo a solução de *p*-NPA para a obtenção do voltamograma de onda quadrada e registro da corrente de pico após a inibição.

A cada medida, o biossensor foi enxaguado com água ultrapura e reativado sob agitação com solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) durante 10 minutos.

Para o método cromatográfico comparativo, também foi construída uma curva analítica para o carbendazim, em um sistema de eluição isocrática, composto de solvente A (Solução de Ácido Fórmico 0,1% V/V) e Solvente B (Metanol HPLC/UV), na proporção de 50% de B, tempo de corrida de 10 min; fluxo de 0,6 mL/min; coluna em temperatura ambiente com um volume de injeção de 5 µL.

Parâmetros de aquisição do EM/EM: voltagem da agulha ±5500 V; voltagem do spray Shield: ±600V, pressão do gás de nebulização: 50psi, pressão do gás de secagem: 35psi, temperatura do gás de secagem: 300°C, polaridade positiva, voltagem do capilar: 72V, carregamento do RF: 68%, controle de ionização 100%, temperatura de spray Chamber: 50°C e tempo de aquisição de 10 minutos, íon precursor: 192,8 m/z, íons produto: 160,7 e 132,6 m/z.

4.12 Coleta, preparo e análises das amostras

As amostras de água foram fornecidas pelo laboratório de Análise de Resíduos e Biocidas (LARB), coordenado pelo Profa. Dra. Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dores do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso.

As amostras de água superficial foram coletadas na região que fica cerca de 7 km da sede do município de Campo Verde – MT e pertence à nascente do Rio São Lourenço. A vegetação do cerrado, que está em torno da nascente se encontra em estado de restauração. As coordenadas do local da coleta foram: 15°37'16"S e 55°10'27"O .

Também foram feitas coletas de água na saída de um açude próximo a região cujo as coordenadas são 15°62741°S e 55°17913°W. As amostras foram coletadas no final do mês de novembro de 2016 e armazenadas em frascos âmbar de 4 L sob refrigeração a aproximadamente 4 °C.

As amostras foram analisadas em triplicada pelo método proposto e pelo método cromatográfico comparativo. Para isso as amostras foram filtradas em membranas de vidro 47 mm de diâmetros e 44 µm de porosidade da marca Hexis, e para as injeções cromatográficas todas as soluções foram filtradas em seringa de vidro, num filtro PTFE 0,22 µm da marca Analítica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à determinação do coeficiente de absorção molar do *p*-NP, atividade enzimática nos extratos dos fungos endofíticos, imobilização enzimática, caracterização do suporte com o extrato imobilizado por MEV e IV, construção do biossensor, otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, resultados da validação da resposta do biossensor proposto e resultados da aplicação do biossensor para determinação de carbendazim em amostras de água.

5.1 Coeficiente de absorção molar do *p*-nitrofenol

Para determinação da atividade específica de lipase nos extratos dos fungos é necessário se conhecer o coeficiente de absorção molar (ϵ) do *p*-NP, visto que este é o produto de reação de hidrólise do substrato *p*-NPP catalisada pela lipase.

Foram registrados os espectros de absorção para o *p*-NP na faixa de 200 a 800 nm nas concentrações de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Na Figura 14A são mostrados os espectros de absorção registrados, onde em 400 nm se apresenta o comprimento de onda de absorção máximo (λ_{max}) do *p*-NP. A partir dos espectros obtidos, uma curva analítica foi construída plotando-se a Concentração de *p*-NP vs Absorbância (400 nm), e apresentada na Figura 14B.

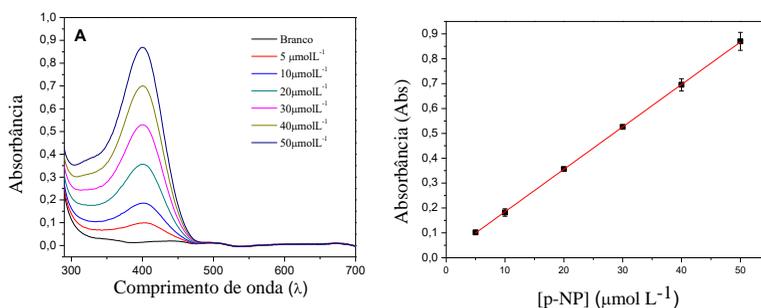


Figura 14. (A) Espectros de absorção na faixa de 200 a 800 nm para as diferentes concentrações de *p*-NP em solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 7,0). (B) Curva analítica da concentração de *p*-NP vs Absorbância, $\lambda_{\text{max}}=400$ nm, (5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Na faixa de concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a curva apresentou uma ótima linearidade com um coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9999. O coeficiente de absorção molar para o p -NP em pH 7,0 é igual ao valor de inclinação da reta (b) com o valor de 17.080 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

5.2 Determinação da atividade total e específica de lipases no extrato endofítico

Com o intuito de selecionar o fungo de maior potencial em produção de lipase, noventa fungos endofíticos foram submetidos ao teste qualitativo com Rodamina B. Os fungos endofíticos foram isolados de plantas e identificados pelo LABEM/UFMT.

A avaliação preliminar de produção de lipase pelos fungos foi realizada em meio sólido utilizando Rodamina B. O teste da Rodamina B é um método qualitativo, e detecta a presença de lipase extracelular produzida pelo microrganismo por meio da formação de halos fluorescentes sobre luz UV ao redor das colônias, que correspondem às zonas do substrato hidrolisado (BEISSON et al., 2000, JAEGER et al., 1999).

Esses halos fluorescentes são formados através da formação de um complexo dos ácidos graxos, formados por meio da hidrólise dos triglicerídeos do azeite de oliva, com a Rodamina B. (MOURA et al., 2013). A formação dos halos nos meios contendo os fungos que produziram lipases pode ser observada na Figura 15.



Figura 15. Fungo *Ceratobasidium sp1*, em meio Rodamina B (a) no visível (b) Sobre luz UV em 350 nm.

Dos noventa fungos avaliados sete foram submetidos à determinação da atividade total e específica. Na Tabela 6 estão apresentados os fungos pré-selecionados bem como o vegetal de origem.

Tabela 6. Fungos selecionados para estudo de produção de lipase e a espécie do vegetal de origem.

<i>Fungos</i>	Vegetal de Origem	
	<i>Nome científico</i>	<i>Nome usual</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Polygonum acuminatum</i>	Erva-de-bicho
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Polygonum acuminatum</i>	Erva-de-bicho
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Polygonum acuminatum</i>	Erva-de-bicho
<i>Aspergillus sp</i>	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	Cortiça
<i>Ceratobasidium sp1</i>	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	Cortiça
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	Cortiça
<i>Ceratobasidium sp2</i>	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	Cortiça

Para determinação da atividade hidrolítica da lipase foi utilizado o substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP), segundo o método descrito por Winkler e Stuckmann (1979). Esse método apresenta algumas vantagens, como um tempo de reação curto, exige pequenas quantidades de amostras, além de ser um método simples e de fácil execução (JAEGER et al., 1994; WINKLER e STUCKMAN, 1979). O método está baseado na reação apresentada na Figura 16, em que a hidrólise do *p*-NPP é catalisada pela enzima lipase, liberando *p*-nitrofenol (*p*-NP) e ácido palmítico. A atividade hidrolítica foi determinada através do monitoramento do aparecimento do *p*-NP, que forma um cromógeno amarelo, sob condições experimentais apresentando λ de absorção máxima em 400 nm.

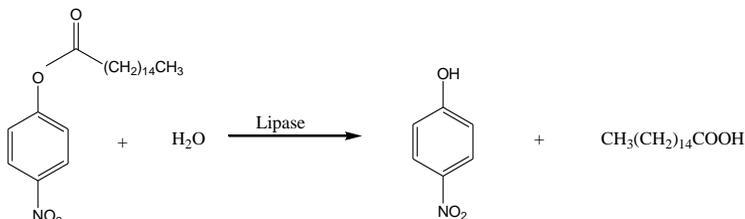


Figura 16. Reação de hidrólise do *p*-NPP catalisada pela enzima lipase.

A atividade total da lipase presente nos extratos endofíticos foi calculada usando a equação de Lambert-Beer, Equação 3.

$$A = \epsilon bC \quad (3)$$

Onde A é a absorbância da amostra, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar do p -NP ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o caminho óptico da cubeta (cm) e C é concentração do p -NP que foi formado.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de atividade total de lipase, considerando o dia de maior produção para cada fungo.

Tabela 7. Valores de concentração total de lipase U/mL, considerando o dia de maior produção de enzimas.

Fungo	Concentração total lipase U/mL	Dias de Cultivo
<i>Trichoderma harzianum</i> P39	142,00	6° dia
<i>Ceratobasidium</i> sp.2 A1	223,92	8° dia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> P28	12,59	4° dia
<i>Aspergillus</i> sp.1 A51	4,93	8° dia
<i>Penicillium janthinellum</i> A56	6,17	8° dia
<i>Ceratobasidium</i> sp.1 A50	107,88	6° dia
<i>Fusarium proliferatum</i> P63	46,76	5° dia

Para a quantificação da atividade específica de lipase, foi determinada a concentração total de proteína nos extratos endofíticos pelo método de Bradford. Para tanto uma curva analítica da concentração do padrão albumina de soro bovino [ASB] vs Absorbância (Figura 17) foi construída nas concentrações de 5,0 a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, medindo as absorbâncias em 600 nm.

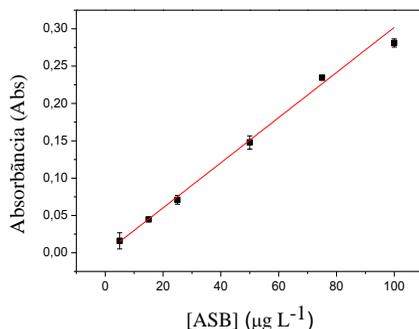


Figura 17. Curva analítica da Absorbância vs [ASB] ($\lambda=600\text{nm}$), das soluções de reagente de Bradford com albumina nas concentrações de 5, 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A curva analítica apresentada na Figura 17 foi utilizada para determinar a concentração total de proteína nos extratos endofíticos, por meio da equação de reta obtida. O coeficiente de correlação linear apresentou um valor de 0,9922, demonstrando uma boa linearidade na faixa de concentração estudada. O intercepto (a) foi de 0,0021 e inclinação (b) de 0,0029. Na Tabela 8 são apresentados os respectivos valores de proteínas totais em $\mu\text{g L}^{-1}$ para os sete fungos estudados.

Tabela 8. Concentração de proteínas totais dos sete fungos estudados no seu respectivo dia de maior atividade total.

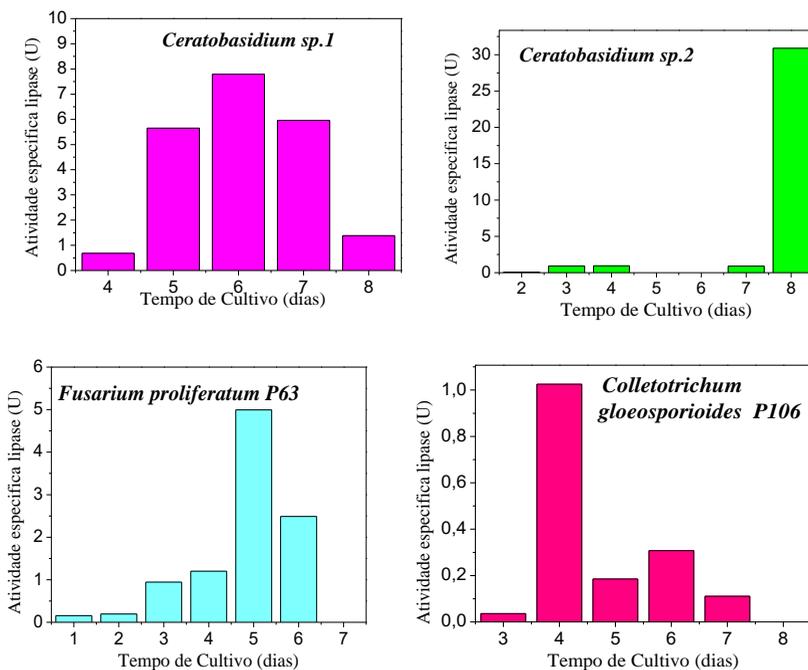
Fungo	Concentração de Proteínas totais ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Dias de Cultivo
<i>Trichoderma harzianum</i> P39	25,22	6 dia
<i>Ceratobasidium</i> sp.2 A1	7,25	8 dia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> P28	12,28	4 dia
<i>Aspergillus</i> sp.1 A51	7,25	8 dia
<i>Penicillium janthinellum</i> A56	75,10	8 dia
<i>Ceratobasidium</i> sp.1 A50	18,11	6 dia
<i>Fusarium proliferatum</i> P63	8,27	5 dia

A atividade específica de lipase foi expressa em unidades de enzima (U) determinada pela Equação 4.

$$U = \frac{A}{\varepsilon} * \frac{1}{V} * f * \frac{1}{t} * 10^6 \div \mu\text{g de proteína} \quad (4)$$

Onde uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 nmol de produto em um minuto por mL de extrato em um μg de proteína (1,0 nmol de *p*-NP $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína). A é a absorbância da amostra obtida na determinação da atividade total de lipase; ε é o coeficiente de absorção molar do *p*-NP ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); V é o volume de extrato endofítico (mL); *f* é o fator de diluição (neste trabalho foi empregado um fator de 2,6) e *t* é o tempo de reação (min) (GRAWE et al., 2015).

Na Figura 18 estão apresentados os gráficos referentes à atividade específica para cada fungo no período de oito dias.



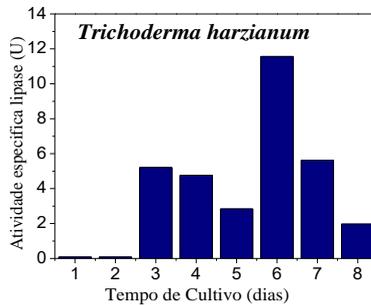


Figura 18. Gráfico de barras da atividade específica de lipase pelo tempo de cultivo em meio azeite de oliva, para os sete fungos estudados.

A atividade específica de lipase no extrato endofítico é a relação entre a atividade total (U/mL) e a quantidade de proteínas totais que o fungo produz. Os fungos *Trichoderma harzianum*, *Ceratobasidium sp1*, e *Fusarium proliferatum* apresentaram uma elevada atividade total (Vide Tabela 7). Entretanto os valores de proteínas totais determinados foram relativamente altos para esses fungos, diminuindo a sua atividade específica. Já o *Ceratobasidium sp 2* em todos os dias de cultivo apresentou uma baixa produção de proteínas totais e uma elevada atividade total, apresentando maior atividade específica entre todos os fungos estudados.

A atividade específica foi investigada até o oitavo dia de cultivo, porque os fungos cresciam muito e tomavam conta de todo o erlernmeyer, o que se tornava inviável, pois a quantidade de extrato enzimático líquido se tornava cada vez menor. Os fungos *Aspergillus sp* e *Penicillium Janthinellum* não apresentaram atividade específica significativa devido principalmente a sua elevada produção de proteínas totais.

Os valores máximos de atividade total de lipase, concentração total de proteínas e atividade específica de lipase obtidos para os sete fungos num período de oito dias estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores máximos de atividade total de lipase, concentração total de proteínas e atividade específica para os extratos endofíticos avaliados num período de um a oito dias de produção.

Fungo	Atividade total U/mL	Proteínas totais (µg. L⁻¹)	Atividade específica de lipase U^a	Dias de Cultivo
<i>Trichoderma harzianum</i> P39	142,0	25,22	5,63	6 dia
<i>Ceratobasidium sp.2</i> A1	223,92	7,25	30,88	8 dia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> P28	12,59	12,28	1,02	4 dia
<i>Aspergillus sp.1</i> A51	4,93	7,25	0,68	8 dia
<i>Penicillium janthinellum</i> A56	6,17	75,10	0,08	8 dia
<i>Ceratobasidium sp.1</i> A50	107,88	18,11	5,92	6 dia
<i>Fusarium proliferatum</i> P63	46,76	8,27	5,65	5 dia

a – 1 U = 1 nmol.mL⁻¹.cm⁻¹ em 1 µg de proteína .

Podemos observar tanto pelos gráficos da Figura 18 quanto pelos resultados da Tabela 9, que o extrato do *Ceratobasidium sp 2* apresentou a maior atividade específica de lipase entre os fungos avaliados, com um valor 30,88 U, e foi selecionado como fonte de lipase para a construção do biossensor enzimático.

5.3 Comportamento eletroquímico do substrato *p*-NPA na superfície do biossensor

Para fins exploratórios foi utilizada a voltametria cíclica para estudar o comportamento eletroquímico do substrato *p*-NPA na superfície do biossensor. Na Figura 19 é apresentado um voltamograma cíclico do *p*-NPA, registrado no intervalo de potencial de 0 a -1,2 V.

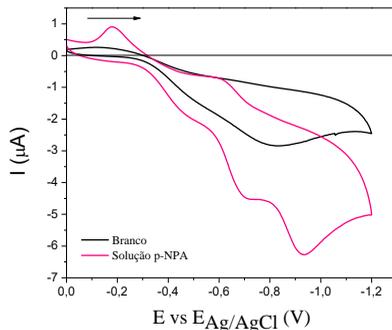


Figura 19. Voltamograma cíclico utilizando o biossensor proposto em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) contendo 50 mmol L⁻¹ de *p*-NPA, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico mostra o perfil voltamétrico do *p*-NPA com o biossensor como eletrodo de trabalho, sendo possível observar três picos de redução, um em -0,5 V, em -0,7 V e outro em -0,9V, e um pico de oxidação em -0,1V. O pico em -0,9V é o pico de interesse referente à redução do *p*-NP em *p*-AP, que aumenta sua intensidade com o aumento da concentração do substrato. O pico de oxidação em -0,1 V também é devido à oxidação do *p*-NP (REDDY et al., 2012). Até o momento não foram realizados novos estudos na tentativa de identificação dos processos redox observados no voltamograma cíclico. Baseado neste perfil voltamétrico foi definido o intervalo de potencial de -0,4 a -1,2 V para ser explorado nos ensaios quantitativos empregando a técnica de VOQ.

5.4 Mecanismo da resposta eletroquímica do biossensor

Na Figura 20 é apresentada uma representação esquemática da superfície do biossensor e proposto um possível mecanismo para a resposta ao substrato *p*-NPA.

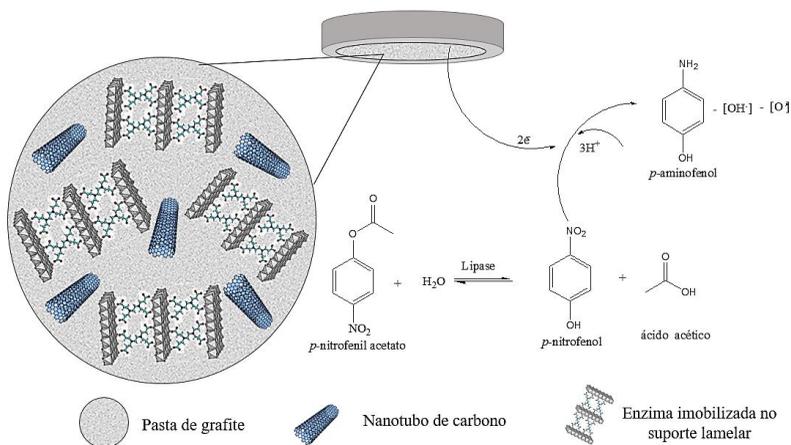


Figura 20. Representação esquemática do biossensor proposto e possível mecanismo para a determinação eletroquímica do *p*-NP, produto da quebra do substrato *p*-NPA catalisado pela lipase.

Na superfície do biossensor a enzima lipase hidrolisa a ligação éster presente no substrato *p*-NPA, gerando o *p*-NP que pode ser reduzido eletroquimicamente na superfície do biossensor. Na Figura 21 é apresentado o voltamograma de onda quadrada da resposta do biossensor para o substrato *p*-NPA.

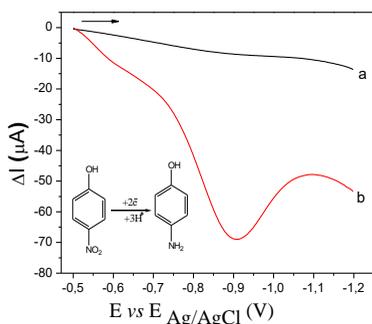


Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada usando o biossensor como eletrodo de trabalho em (a) solução PBS 0,1 mol L⁻¹ e (b) solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0) Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. Temperatura ambiente. Insert: Mecanismo de reação proposto da redução de *p*-NP para *p*-AP em 0,9 V vs E_{Ag/AgCl} (KCl 3,0 mol L⁻¹).

A hidrólise do substrato acontece no sítio catalítico da enzima lipase que é composto pelos aminoácidos histidina, serina, aspartato ou glutamato, onde é produzido o *p*-NP (ESTEVEES et al., 2009). Na superfície do biossensor o *p*-NP é eletroquimicamente reduzido, pela transferência de três prótons e dois elétrons, em $-0,9 \text{ V E vs } E_{\text{Ag/AgCl}}$, onde o composto *p*-aminofenol (*p*-AP) é gerado (LI et al., 2012). Onde a intensidade da corrente de redução resultante é quantitativamente proporcional à concentração de *p*-NP gerado na solução e proporcional a concentração do substrato.

5.5 Avaliação do efeito da imobilização da enzima

Um passo muito importante no desenvolvimento de biossensores é a imobilização enzimática, visto que o bom desempenho do biossensor depende disso. Neste trabalho o método de adsorção física foi utilizado para imobilização do extrato endofítico na superfície do suporte HZnL/AuNPs.

A eficiência da imobilização do extrato endofítico foi avaliada construindo dois biossensores, um com enzima livre e outro com o extrato imobilizado em HZnL/AuNPs. Os dois biossensores foram construídos com 0,5 U de lipase, pó de grafite, NTCs e HZnL/AuNPs. A resposta do biossensor foi avaliada pela técnica de VOQ usando como eletrólito solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, pH 7,0) contendo 50 mmol L^{-1} de *p*-NPA. A Figura 22 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para os dois biossensores construídos.

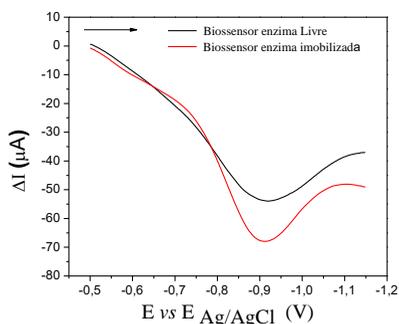


Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada para solução 50 mmol L⁻¹ *p*-NPA em tampão PBS 0,1 mol⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0), para biossensor construído com enzima livre e enzima imobilizada. Parâmetros da VOQ: $f= 80$ mV, $\Delta E_p= 120$ mV $\Delta E_s= 2$ mV. T ambiente 25 °C (± 1).

Nos voltamogramas de onda quadrada apresentados na Figura 22 pode-se observar que o biossensor com enzima imobilizada no suporte lamelar apresentou uma maior intensidade na corrente de redução do *p*-NP.

Provavelmente a imobilização do extrato no suporte inorgânico foi favorecida devido à existência de sítios iônicos trocáveis na região interlamelar, que possibilita a expansão do espaço interlamelar. As interações eletrostáticas e as fracas interações de Van der Waals também podem auxiliar no processo de incorporação da enzima no suporte (SECUNDO, 2008). Além disso, os grupos hidroxilas livres na superfície do suporte podem promover interações de hidrogênio com os grupos funcionais das cadeias de aminoácidos da enzima, o que consequentemente melhora a eficiência no processo de imobilização.

Podemos considerar que a técnica de imobilização enzimática mostrou-se eficiente, principalmente pela simplicidade e facilidade de aplicação do método.

5.6 Influência dos componentes da pasta na resposta do biossensor

Para avaliar a contribuição dos componentes empregados na obtenção da pasta do biossensor foram analisadas as respostas dos diferentes sensores: eletrodo de pasta de carbono (EPC), eletrodo de pasta de carbono e NTCs (EPC-NTC), eletrodo de pasta de

carbono, NTCs e suporte lamelar (EPC-NTC-HZnL/AuNPs) e EPC-NTC-HZnL/AuNPs-lipase (biossensor). Os voltamogramas de onda quadrada estão apresentados na figura 23A. Na figura 23B está apresentado o gráfico em barras das correntes resultantes da redução do *p*-NP.

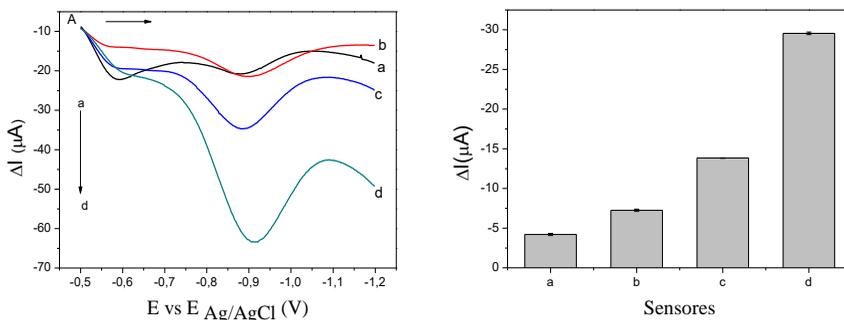


Figura 23. (A) Voltamogramas de onda quadrada para 50 mmol L⁻¹ de *p*-NPA em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (a) EPC, (b) EPC-NTC, (c) EPC-NTC-HZnL/AuNPs (d) biossensor. Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico das correntes resultando para *p*-NPA usando diferentes sensores. Frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV, incremento de potencial de 5 mV. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ$ C).

Observando as Figuras 23A e 23B, verifica-se a contribuição de cada componente da pasta na resposta do biossensor, nota-se que com a agregação dos NTCs um sutil aumento na corrente de pico. Quando se tem a agregação do suporte na pasta de carbono, nota-se um aumento mais significativo na intensidade do pico de redução. Este comportamento pode ser atribuído à presença das nanopartículas de ouro no suporte, visto que as mesmas funcionam como eletrocatalisadores, facilitando a transferência de elétrons e melhorando a resposta analítica.

Quando comparado aos sensores o biossensor apresenta um desempenho significativamente melhor, ou seja, a corrente de pico aumenta em torno de 4 a 5 vezes em relação a pasta base de carbono, isso porque a enzima na superfície do eletrodo catalisa a quebra do *p*-NPA liberando mais *p*-NP aumentando sua concentração no meio.

5.7 Caracterização do suporte lamelar e da pasta do biossensor

Para avaliar as características morfológicas da pasta do biossensor, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do suporte (Fig. 24A), suporte com 0,5 U de lipase imobilizada (Fig. 24B) e da pasta final do biossensor (Fig. 24C).

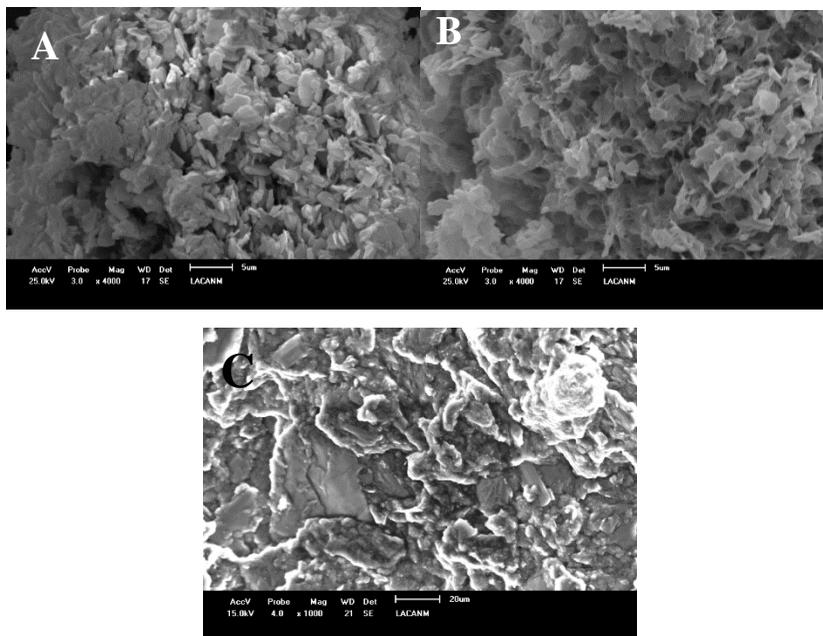


Figura 24. Imagens de MEV (A) HZnL/AuNPs sem enzima imobilizada (B) HZnL/AuNPs com 0,5 U de enzimas lipases imobilizada (aumento x4000). (C) da pasta do biossensor (aumento x1000).

Pode-se observar na imagem para o suporte HZnL/AuNPs (Fig. 24A) a estrutura das lamelas características do suporte aglomeradas, enquanto que a imagem de HZnL/AuNPs com extrato endofítico imobilizado (fig. 24B), a superfície se apresenta mais compactada com uma morfologia que sugere uma interconexão entre as lamelas, o que pode ter sido causado pela adsorção da enzima no suporte. Na figura 24C tem-se a imagem de MEV para a pasta de carbono, que se apresenta compacta e amorfa.

Espectros na região do IV foram registrados para verificar se a enzima lipase foi imobilizada no suporte lamelar e se, com a imobilização, houve alguma mudança nas bandas características na região do IV para o suporte. Os espectros de IV do suporte (a) e da enzima imobilizada neste suporte (b) são mostrados na Figura 25.

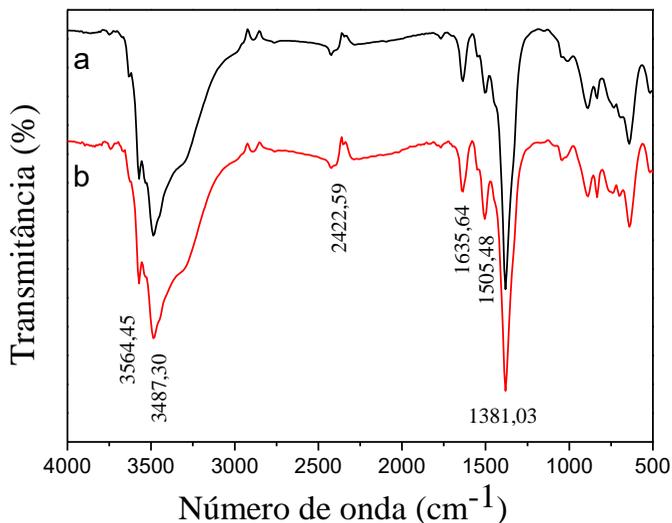


Figura 25. Espectros de IV médio do (a) HZnL/AuNPs e (b) HZnL/AuNPs com enzima imobilizada.

Nos espectros apresentados na Figura 25 são observadas bandas em 3564 a 3487 cm^{-1} que são referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos dos grupamentos hidroxilas, tanto de moléculas de água quando de hidroxilas presentes no retículo lamelar. Também na região de ~ 1630 e 1500 cm^{-1} são observadas vibrações de deformação angular das moléculas de água, que estão fisiosorvidas ou intercaladas no suporte. Em $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ são as bandas de vibrações correspondentes ao estiramento simétrico(ν_2) causado pelo NO_3^- intercalados com alta simetria (D_{3h}) como discutido por Silva et al., (2014) e Arizaga et al., (2007). Na região de impressão digital vibrações abaixo de 600 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos de M-O e as flexões dos grupos M-O-M, onde M é Zn^{2+} . (SILVA et al., 2014).

Podemos também observar nos espectros de IV médio (Figura 25) que não foram observadas alterações (desaparecimento, aparecimento, mudanças de intensidades) nas bandas características para o suporte com a imobilização de 0,5 U de enzimas lipases por adsorção. Podemos sugerir que não foram observadas alterações nas frequências de vibrações específicas do material de suporte, pois o método de adsorção de enzima se baseia em interações ou ligações mais fracas, como forças de Van der Waals, forças eletrostáticas ou interações hidrofóbicas, podendo não acarretar em alterações perceptíveis no espectro de IV (SASSOLAS, et.al., 2012).

O suporte HZnL/AuNPs empregado neste trabalho, é classificado como hidróxido duplo lamelar (HDL) e sua estrutura cristalina geral está apresentada na Figura 26.

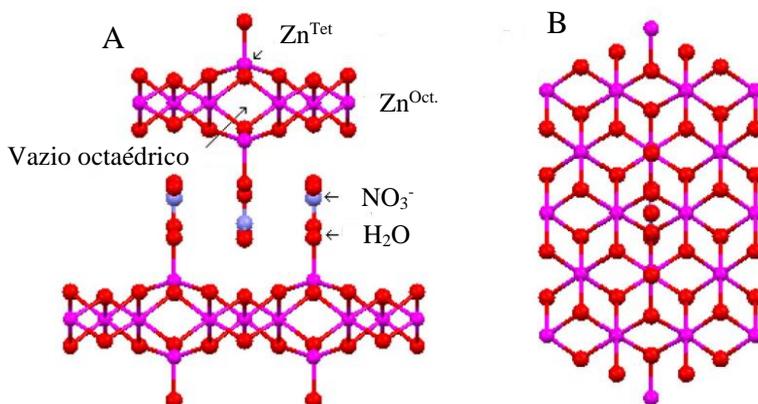


Figura 26. Estrutura cristalina dos HZnL (a) vista lateral (b) vista do topo da lamela. (Fonte: ARIZAGA et al., 2007).

5.8 *Parâmetros de otimização da construção e resposta do biossensor*

Tanto a construção quanto a resposta voltamétrica do biossensor foram otimizadas, investigando-se os efeitos da concentração da enzima imobilizada no suporte, pH do eletrólito suporte, concentração do substrato, tempo de incubação e reativação da

resposta do biossensor para os ensaios de inibição, bem como os parâmetros da técnica de VOQ (frequência, amplitude do pulso e incremento de varredura).

5.8.1 Otimização dos parâmetros da técnica de VOQ para resposta do biossensor utilizando como substrato *p*-NPA

Nos parâmetros relacionados à técnica VOQ, foi avaliado a frequência (f), a amplitude de pulso (ΔE_p), e o incremento de varredura (ΔE_s).

A frequência de aplicação de pulso de potencial é um dos mais importantes parâmetros no emprego da técnica de VOQ, pois além de melhorar a sensibilidade da técnica, também possibilita obter informações sobre o tipo de processo e número de elétrons envolvidos na reação (SOUZA et al., 2003).

O efeito da f foi estudado na faixa de 10 a 100 Hz com valores fixos de amplitude e incremento de potencial. Os voltamogramas de onda quadrada podem ser observados na Figura 27A.

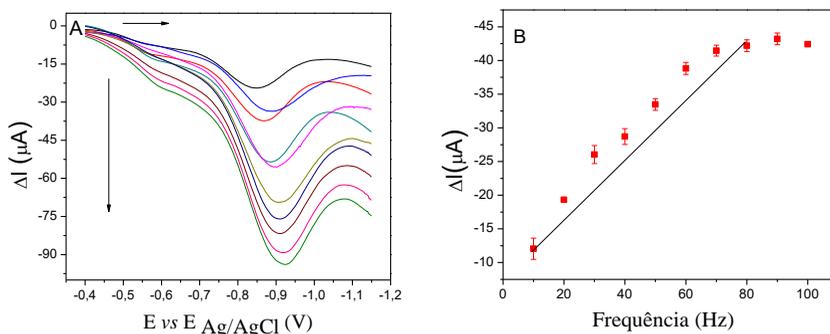


Figura 27. (A) Voltamogramas de onda quadrada para *p*-NPA 50mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função da variação de f (10 a 100 Hz). Parâmetros da VOQ: $\Delta E_p = 120$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para o *p*-NPA em função da variação da frequência. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ C$).

Observa-se nas Figuras 27A e 27B que com o aumento da frequência, a intensidade do pico de redução aumenta até a frequência de 80 Hz atingindo um patamar, para frequências mais altas. Observa-se também uma relação linear entre a corrente

resultante e a frequência de aplicação dos pulsos quadrados, o que sugere que a processo de redução do *p*-NP é um processo irreversível (CODOGNOTO et al., 2008). Segundo O’Dea et al, (1993), o deslocamento do potencial de pico de redução para potenciais mais negativos em função da frequência de aplicação dos pulsos é característico de sistemas totalmente irreversíveis com processos controlados pela adsorção das espécies.

A partir destes resultados a frequência de 80 Hz foi escolhida para os estudos posteriores.

A amplitude de pulso é outro parâmetro que pode ser otimizado para melhorar a sensibilidade analítica da VOQ. Foi investigado o intervalo de amplitude de pulso de 10 a 120 mV, com frequência fixa de 80 Hz e incremento de potencial de 5 mV. Na figura 29A e 29B estão apresentados os voltamogramas e o gráfico da corrente de redução em função da amplitude de pulso.

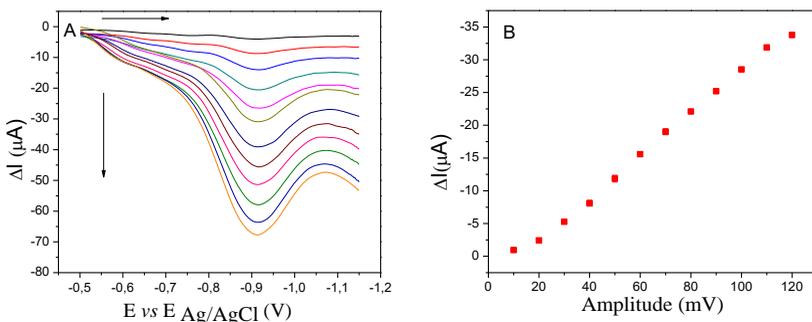


Figura 28. (A) Voltamogramas de onda quadrada para *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função da amplitude de pulso ΔE_p (10 a 120 mV). Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV e ΔE_S 2mV. (B) Gráfico das corrente resultantes para o *p*-NP em função da variação da ΔE_p . Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Observa-se na figura 29B uma dependência linear da corrente de redução com a amplitude de pulso no intervalo de 0 a 120 mV. Para valores de amplitude de pulso acima de 120 mV notou-se uma deformação do pico e muito ruído. Baseado nestes resultados optou-se por empregar uma amplitude de 120 mV para os estudos posteriores.

Para a otimização do parâmetro do incremento de varredura, foi realizado um estudo na faixa de 1 a 5 mV, fixando a frequência em 80 Hz e a amplitude de pulso em 120 mV. Os voltamogramas estão apresentados na figura 30A.

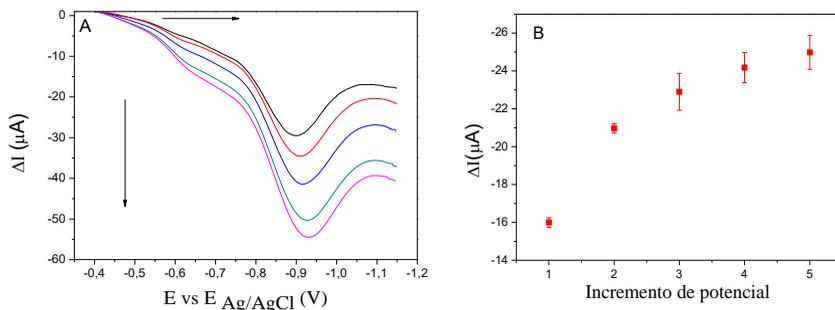


Figura 29. (A) Voltamogramas de onda quadrada pra *p*-NPA 50mmolL⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) utilizando o biossensor em função do incremento de potencial ΔE_s (1 a 5 mV). Parâmetros da VOQ: $f= 80$ mV e ΔE_p 120mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para o p-NP em função da variação da ΔE_s. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).

O estudo do incremento de varredura mostrou que a intensidade da corrente catódica aumenta em função do aumento do ΔE_s, e também pode-se observar que o pico vai se deslocando para valores mais negativos de potencial, o que pode estar relacionado com a adsorção da espécie na superfície do eletrodo. A velocidade de varredura efetiva da VOQ é resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura, onde um incremento de varredura maior pode diminuir o tempo da varredura. Entretanto com o aumento do incremento de varredura pode ocorrer um alargamento nos picos obtidos, comprometendo a resolução do voltamograma (CODOGNOTO et al., 2008). Podemos observar também que para valores de incremento de varredura maior que 2 mV, a reprodutibilidade no sinal da corrente é comprometida e portanto optou-se por utilizar o valor de 2mV para o valor de ΔE_s.

Um pré-tratamento aplicando um potencial de acúmulo foi realizado com o intuito de aumentar a sensibilidade do biossensor, aumentando a corrente de pico resultante (LI et al., 2012). O estudo de potencial de acúmulo foi investigado no faixa de -0,1V a -0,5V, com

uma duração de 15 segundos fixados para todas as análises. Na Tabela 10 apresentam-se os resultados obtidos para esse estudo.

Tabela 10. Correntes resultantes para a resposta do biossensor submetido a diferentes potenciais de acúmulo durante 15 segundos.

Potencial de acúmulo (V)	$\Delta i \pm s$ (μA)
-0,1	16,80 \pm 0,79
-0,2	20,96 \pm 0,74
-0,3	22,90 \pm 0,87
-0,4	24,93 \pm 0,23
-0,5	24,17 \pm 0,39

Média \pm s (desvio padrão) n=3

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 10, podemos verificar uma maior corrente resultante para o potencial de acúmulo de -0,4 V.

Assim as melhores respostas foram obtidas para o biossensor empregando uma frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV, incremento de varredura de 2 mV e potencial de acúmulo de -0,4 V por 15 segundos, estas condições experimentais foram aplicadas a todos experimentos subsequentes.

5.8.2 Efeito da atividade específica de lipase imobilizada no biossensor

Um estudo sobre o efeito da concentração de enzima imobilizada no biossensor foi realizado com base nos valores de atividade específica de lipases encontrada no extrato do fungo endofítico *Ceratobasidium sp1*, onde diferentes biossensores foram construídos empregando-se 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 U unidades de lipases imobilizadas no suporte lamelar. A Figura 30A mostra os voltamogramas de onda quadrada para solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ utilizando os biossensores construídos com (a) 0,3 U; (b) 0,5 U; (c) 0,75 U e (d) 1,0 U de lipases. A Figura 30B corresponde ao gráfico de barras das correntes resultantes de redução do *p*-NP (produto da hidrólise do *p*-NPA catalisada pela lipase) com diferentes unidades de enzimas.

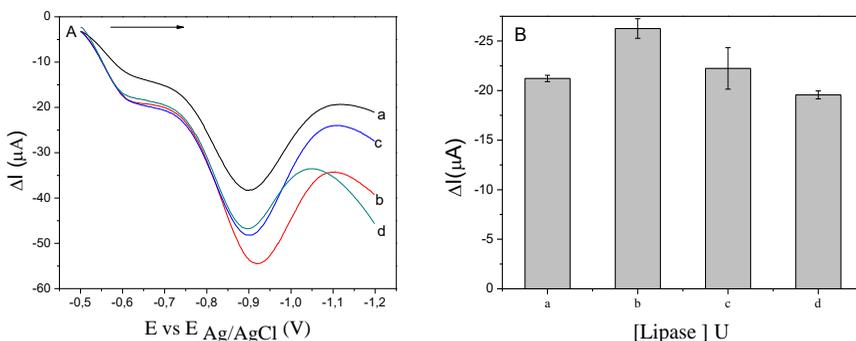


Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) utilizando biossensores contendo (a) 0,3; (b) 0,5; (c) 0,75 e (d) 1,0 U de lipases imobilizadas. Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico de barras da das correntes resultantes para *p*-NP utilizando biossensores com diferentes concentrações de enzimas. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ C$).

Os biossensores construídos com 0,3; 0,75 e 1,0 U não apresentaram diferenças significativas nos valores de correntes resultantes, como verificado no gráfico da Figura 30B. O melhor desempenho observado foi para o biossensor construído com 0,5 U de lipases imobilizadas. Com esta quantidade também foi mais fácil à etapa da imobilização, pois como a quantidade de extrato enzimático era menor a etapa da secagem ocorreu em um tempo de 12 horas.

5.8.2 Efeito da concentração do substrato

Para avaliar o efeito da concentração do substrato voltamogramas de onda quadrada foram registrados utilizando o biossensor em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol. L⁻¹ NaCl pH 7,0) com diferentes concentrações de *p*-NPA: 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 mmol.L⁻¹. Os voltamogramas e o gráfico das correntes resultantes estão apresentados na Figura 31A e 31B.

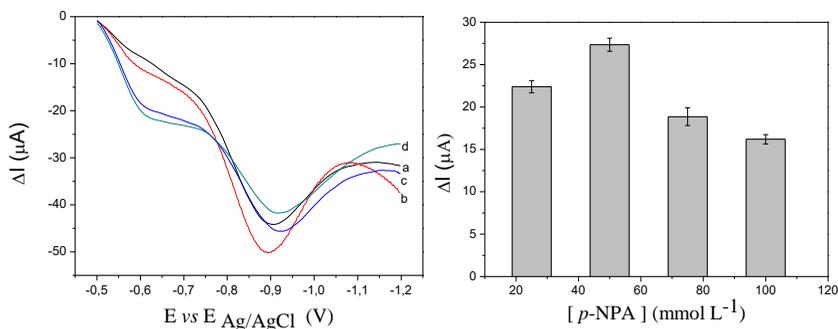


Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) com diferentes concentrações de p-NPA: 25,0; 50,0; 75,0; 100 mmol L⁻¹. Parâmetros da VOQ: $f = 80$ mV, $\Delta E_p = 120$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico de barras das das correntes resultantes para p-NP utilizando o biossensor em diferentes concentrações de substrato. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ C$).

Podemos observar nos voltamogramas da Figura 31A e no gráfico de barras 31B, um aumento na resposta de corrente quando a concentração do substrato varia de 25 mmol L⁻¹ para 50 mmol L⁻¹. Para valores de concentração acima de 50 mmol L⁻¹ de substrato observa-se uma queda gradativa nos valores de corrente.

Segundo os estudos de Michaelis-Mentem quando a concentração do substrato é baixa, a velocidade da reação catalisada pela enzima aumenta com o aumento da concentração do substrato, ou seja, a velocidade a reação é proporcional a concentração do substrato. No entanto quando a concentração do substrato é alta a velocidade da reação depende apenas da concentração de enzima (ATKINS, 2012).

Essa diminuição na resposta de corrente para concentrações acima de 50 mmol L⁻¹ de substrato pode estar relacionada com a formação de um complexo não efetivo entre duas moléculas de substrato com o sítio ativo da enzima. Em um complexo efetivo, uma molécula de substrato está combinada com todo o sítio ativo da enzima. Quando se tem uma concentração de substrato mais elevada aumenta a probabilidade de formação de complexos não efetivos, onde a molécula do substrato tende a se aglomerar sobre as enzimas (NAKATANI, 1995). Portanto, a concentração ótima de substrato é a de 50 mmol L⁻¹, obtendo-se os melhores resultados em termos de sensibilidade de sinal analítico.

5.8.3 Efeito do pH do eletrólito de suporte

Quando se trata de biossensores, o pH do eletrólito de suporte é uma variável muito importante, visto que cada enzima apresenta um valor de pH ótimo de trabalho em que sua atividade é máxima e está diretamente ligada à velocidade da reação enzimática. Embora as enzimas lipases apresentem boa estabilidade em relação às variações de pH, em sua maioria as enzimas apresentam uma atividade ótima dentro de uma estreita faixa de pH (SANTOS, 2009). Neste trabalho, a faixa de pH estudada foi de 6,0 a 8,0.

Na Figura 32A são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (NaCl 0,1 mol L⁻¹) em valores de pH de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Na Figura 32B tem-se o gráfico de barras das correntes resultantes em função do pH.

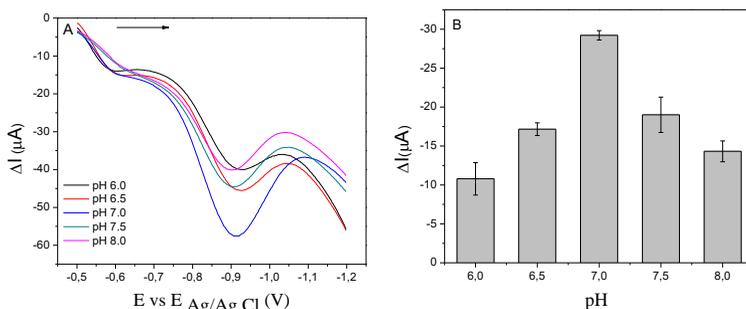


Figura 32. (A) Voltamogramas de onda quadrada para 50 mmolL⁻¹ de *p*-NPA em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol. L⁻¹ NaCl) nos pHs — 6,0 ; — 6,5; — 7,0; — 7,5 e — 8,0 . Parâmetros da VOQ: f= 80 mV, ΔE_p = 120 mV ΔE_s = 2 mV. (B) Gráfico das correntes resultantes para *p*-NPA em diferentes pHs. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).

Pode-se observar na Figura 32B, que o maior valor para a corrente resultante foi obtido para o biossensor em solução de pH 7,0. Normalmente após a imobilização de enzimas lipases o pH ótimo de sua atuação desloca-se para valores mais alcalinos, visto que o ataque nucleofílico da serina é auxiliado pelo comportamento básico da histidina (GOMES et al., 2006). Este comportamento não foi observado e neste caso pode estar relacionado aos grupos hidroxilas presentes no suporte o que proporcionou um microambiente apropriado

para a lipase mesmo em pH neutro. Em relação ao meio ácido, verificou-se que ocorre uma diminuição da corrente resultante. Isso pode ser atribuído à concentração maior dos íons H⁺ que leva a protonação dos grupos amina, dificultando a formação do complexo acil-enzima e consequentemente, diminuindo a sua atividade (KOZAN et al., 2007).

A Tabela 11 apresenta um resumo dos principais parâmetros estudados mostrando as faixas investigadas e os valores ótimos selecionados para a resposta do biossensor proposto.

Tabela 11. Parâmetros estudados para a construção do biossensor e para técnica de VOQ utilizando o substrato *p*-NPA, e os valores selecionados.

Parâmetro	Faixa investigada	Valor selecionado
Unidade de enzima (U)	0,3 – 1,0	0,5
Frequência (Hz)	10 – 100	80
Amplitude de pulso (mV)	10 – 120	120
Incremento de varredura (mV)	1 – 5	2
pH do eletrólito	6,0 – 8,0	7,0
Potencial de acúmulo (V)	-0,1 a -0,5	-0,4
Concentração de <i>p</i> -NPA (mmol L ⁻¹)	25,0 – 100,0	50,0

5.9 Repetibilidade e reprodutibilidade da resposta do biossensor

Neste trabalho, o estudo da repetibilidade e reprodutibilidade na resposta do biossensor foi avaliado a fim de validar a resposta do biossensor. A Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA RDC n° 17/2010 define validação como um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados.

A repetibilidade é a concordância entre os resultados de uma análise dentro de um curto intervalo de tempo utilizando a mesma instrumentação e operado pelo mesmo analista (ANVISA, 2003). Para esse estudo, foram registrados 15 voltamogramas de onda quadrada (N=15) para o *p*-NPA na concentração de 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS pH 7,0 empregando o mesmo biossensor. A repetibilidade foi avaliada utilizando-se como parâmetro o desvio padrão relativo (DPR%) calculado pela equação 5:

$$DRP\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (5)$$

Onde S é o desvio padrão e \bar{x} é a média aritmética das 15 réplicas.

A reprodutibilidade trata da concordância entre os resultados de uma análise obtidos sob os efeitos causados pelas variações dentro do laboratório considerando o dia, o analista e a instrumentação diferente (ANVISA, 2003). De maneira semelhante à repetibilidade, as correntes resultantes foram avaliadas e expressas por meio da estimativa do DPR% utilizando cinco diferentes biossensores preparados de forma independente e submetidos ao mesmo procedimento. Os resultados obtidos para os ensaios de reprodutibilidade e repetibilidade estão listados na Tabela 12.

Tabela 12. Repetibilidade e reprodutibilidade da resposta do biossensor.

Parâmetros	$\bar{x} \pm s$ (μA)	DPR%	N
Repetibilidade	28,3 \pm 1,25	4,40	15
Reprodutibilidade	24,6 \pm 0,97	3,67	5

De acordo com os dados apresentados na Tabela 12, os biossensores apresentaram repetibilidade e reprodutibilidade aceitáveis para medidas de precisão onde os valores de DPR% não devem ser maiores que 5 % (ANVISA).

5.10 Estabilidade do biossensor

O estudo da estabilidade do biossensor foi realizado para avaliar seu desempenho e a eficiência na imobilização do extrato endófito. O biossensor foi mantido a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e ao abrigo da luz. Para este estudo, a resposta da corrente foi registrada em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ com *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ num período de vinte semanas, conforme apresentado no gráfico de controle da Figura 33.

O gráfico de controle consiste em um gráfico sequencial de alguma característica, neste caso a estabilidade que é utilizada como critério de qualidade do biossensor. Neste

gráfico são apresentados os limites estatísticos da variação para a característica que está sendo investigada (SKOOG et al., 2009). Esses limites são denominados de limite superior de controle (LSC) e limite inferior de controle (LIC) obtidos pelas Equações 6 e 7.

$$LSC = \bar{x} + \frac{3s}{\sqrt{N}} \quad (6)$$

$$LIC = \bar{x} - \frac{3s}{\sqrt{N}} \quad (7)$$

Onde \bar{x} é a média, s é o desvio padrão da média e N é o número de réplicas que são obtidas para cada amostra.

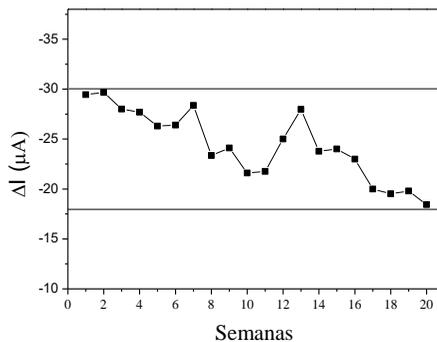


Figura 33. Gráfico de controle da resposta do biossensor para uma solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol.L⁻¹ NaCl, pH 7,0) durante um período de 20 semanas.

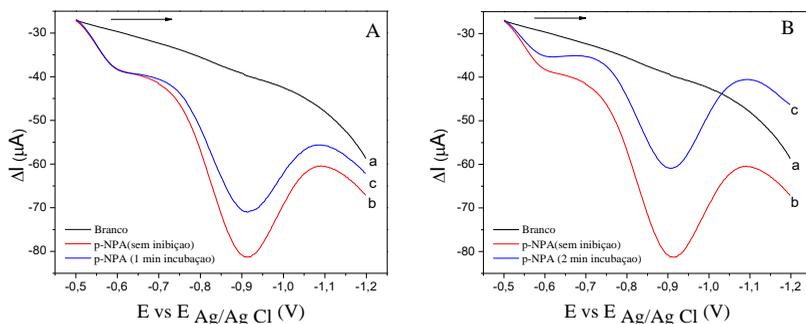
Na Figura 33 podemos observar que os valores médios das medidas de corrente para cada semana apresentaram flutuações aleatórias normais para o nível de confiança de 99%. Este resultado demonstra uma ótima estabilidade da resposta do biossensor para o substrato *p*-NPA, que pode estar relacionado à eficiência na imobilização do extrato enzimático no suporte lamelar.

5.11 Aplicação do biossensor para a determinação do pesticida carbendazim

5.11.1 Curva analítica para o carbendazim aplicando o biossensor

O princípio de detecção do pesticida carbendazim foi baseado na inibição da atividade da lipase. A diminuição da corrente de pico catódica para o *p*-NP produzida após a incubação do biossensor na solução de carbendazim é proporcional a sua concentração, e esse efeito foi utilizado para determinação do pesticida pelo biossensor proposto.

Primeiramente, foi realizado um estudo do tempo de incubação do biossensor na solução de carbendazim, onde o biossensor foi submerso em uma solução contendo $100\mu\text{g L}^{-1}$ de carbendazim durante 1, 2 e 3 minutos, usando como sinal base uma solução de 50mmol L^{-1} de *p*-NPA em PBS $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (NaCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) pela técnica de voltametria de onda quadrada. A Figura 34 mostra os voltamogramas registrados, após a inibição da lipase pelo carbendazim, tendo como pico base a solução de *p*-NPA em tampão PBS pH 7,0 em tempos diferentes de incubação.



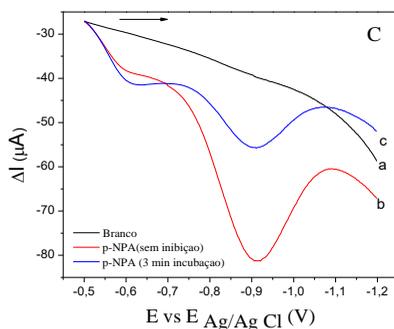


Figura 34. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a) eletrólito de suporte, (b) solução *p*-NPA 50mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl pH 7,0) (sinal base), (c) solução *p*-NPA (A) 1 minuto de incubação, (B) 2 minutos de incubação (C) 3 minutos de incubação. Parâmetros da VOQ: $f=80$ mV, $\Delta E_p=120$ mV $\Delta E_s=2$ mV. Temperatura ambiente 25°C ($\pm 1^\circ$ C).

De acordo com a Figura 34 pode-se observar que o tempo que o biossensor fica submerso na solução de carbendazim influencia significativamente na resposta da inibição da lipase. As percentagens de inibição resultantes dos voltamogramas de onda quadrada nos tempos de 1, 2 e 3 minutos foram de 24,46 %, 65,60% e 79,21% respectivamente. Diante deste resultado optou-se por trabalhar com um tempo de 3 minutos para a inibição .

A inibição da atividade enzimática foi investigada em uma faixa de concentração de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbendazim usando como sinal base uma solução de 50 mmol L⁻¹ de *p*-NPA.

A Figura 35A mostra os voltamogramas de onda quadrada registrados para diferentes concentrações de carbendazim, onde (a) é o voltamograma registrado para o substrato na ausência do inibidor (sinal base), e os demais voltamogramas de (b-g) correspondem às concentrações crescentes de carbendazim.

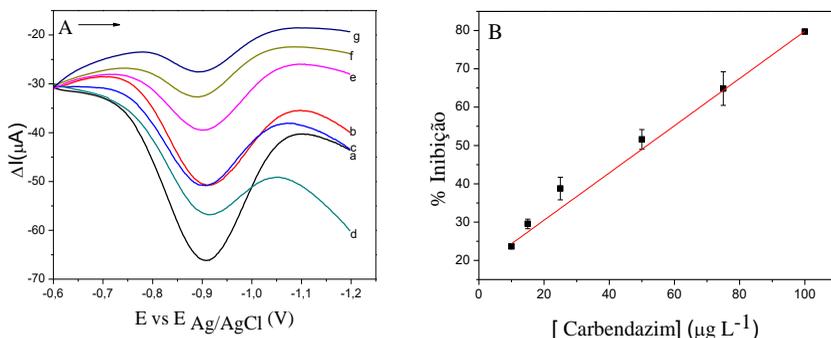


Figura 35. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) 50 mmol L⁻¹ de *p*-NPA em PBS 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,0), e quando incubados por 3 minutos na solução de carbendazim na concentração de (b) 10 μg L⁻¹, (c) 15 μg L⁻¹, (d) 25 μg L⁻¹ (e) 50 μg L⁻¹, (f) 75 μg L⁻¹ e 100 μg L⁻¹, com frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV, incremento de potencial de 2 mV e um potencial de acumulo de -0,4 V durante 15 segundos. (B) Curva analítica para o carbendazim na faixa 10,0 a 100,0 μg L⁻¹. Temperatura ambiente 25°C (± 1°C).

A curva analítica para o carbendazim apresentou uma boa linearidade na faixa de 10 a 100 μg L⁻¹ (IR% = 18,17607 (± 0,8528) + 0,616 (± 0,01191) [carbendazim]), com um coeficiente de determinação (R²) de 0,99814, sendo IR% a porcentagem relativa de inibição e [carbendazim] a concentração de carbendazim em μg L⁻¹.

Pelos resultados alcançados o carbendazim atua como um inibidor reversível da atividade da lipase, pois após o contato com o fungicida, a atividade da enzima pode ser recuperada com uma simples lavagem e um período de incubação do biossensor em solução tampão sob agitação por dez minutos.

As porcentagens de inibição demonstradas na curva analítica do Carbendazim (Figura 35B), foram derivadas dos voltamogramas de onda quadrada e calculadas segundo a Equação 8.

$$\%IR = \frac{(I_0 - I)}{I_0} \times 100 \quad (8)$$

Onde I₀ é o valor da corrente resultante da solução do substrato antes da inibição (sinal base) e I é a corrente resultante do *p*-NPA após inibição com o pesticida carbendazim.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados segundo Ribani et al. (2004), onde o LD é a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada, porém não quantificada, e LQ é a menor concentração do analito quantificada. Os cálculos foram realizados utilizando o desvio padrão do menor valor de concentração de carbendazim avaliado (s) e a inclinação da curva analítica (S), dado por: $LD = 3,3 \text{ s/S}$ e $LQ = 10 \text{ s/S}$. Os valores de LD e LQ encontrados para o pesticida empregando o biossensor foram de $3,13 \mu\text{g L}^{-1}$ e $9,50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Segundo o Ministério da Saúde portaria N° 2914 de 2011, o valor máximo de Carbendazim em água potável é de $120 \mu\text{g L}^{-1}$ e de acordo a ANVISA o limite máximo de ingestão diária é $0,02 \text{ mg/Kg}$. De acordo com esses dados a aplicação do biossensor em análises de água mostrou-se adequado, visto que a legislação é atendida.

5.11.2 Método comparativo de Cromatografia líquida de alta eficiência

A determinação do carbendazim foi também realizada por um método comparativo, usando CLAE-DAD segundo Ribeiro et al., (2013) e por CLAE-EM adaptado de Oshita e Jardim (2015), com intuito de validar a resposta do biossensor.

A determinação do Carbendazim na faixa estudada pelo biossensor não foi detectada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo segundo as condições descritas por Ribeiro et al. (2013). Em relação a essa técnica, o biossensor proposto mostrou-se mais sensível.

Para as análises por CLAE-EM empregou-se a mesma faixa de concentração aplicada para os ensaios com o biossensor. A Figura 36A apresenta um cromatograma típico para o carbendazim a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ usando fase móvel H_2O (0,1% ácido fórmico) : MeOH. (70% a 95 % v/v) com um tempo de retenção (t_R) de 5,34 minutos, e na Figura 36B a curva analítica para o carbendazim.

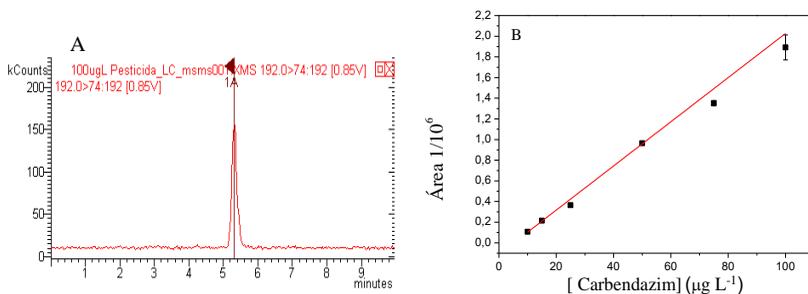


Figura 36. (A) Perfil do cromatograma para Carbendazim em 100 µg L⁻¹ fase móvel H₂O (0,1% ácido fórmico) : MeOH. (70% a 95 % v/v) com tR de 5,34 min. e (B) curva para o carbendazim na faixa de concentração de 10 a 100 µg L⁻¹

A curva analítica na Figura 36B, apresentou uma boa linearidade na faixa de concentração estudada de 10 a 100 µg L⁻¹ de Carbendazim, onde as áreas do picos aumentam linearmente com o aumento da concentração do fungicida. A curva analítica apresentou a seguinte equação de reta: $(A = -110544,78 (\pm 1,627 \times 10^4) + 21375,71 (\pm 4,71 \times 10^2) [\text{Carbendazim}], r^2 = 0,9975)$, onde A é a área do pico e [carbendazim] é a concentração do pesticida em µg L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação obtidos empregando o método cromatográfico com detector de massas foram de 0, 33 e 1,08 µg L⁻¹ respectivamente, calculados utilizando os dados da curva analítica.

5.12 Estudo de adição e recuperação e determinação do carbendazim

Para demonstrar a aplicabilidade do biossensor proposto, um estudo de adição e recuperação de carbendazim foi realizado em uma amostra de água do Rio São Lourenço (Campo Verde/MT) – localizado em uma região de nascente e menos propício a impactos ambientais – utilizando os dados da curva analítica obtida com calibração com padrão externo apresentados na seção 5.11.1. As amostras foram fortificadas em três níveis de concentração: 25,0, 50,0 e 75,0 µg L⁻¹ e deixadas em repouso por um período de 24 horas. Os resultados obtidos pelo biossensor e pelo método cromatográfico (CLAE-EM) comparativo são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados dos ensaios de recuperação e quantificação de Carbendazim em amostras de água usando o biossensor proposto e o método cromatográfico comparativo.

Fortificação	Carbendazim ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Encontrado		Recuperado	
	Biossensor ^a	CLAE ^a	Biossensor ^b	CLAE ^b
25,00	24,80 \pm 0,58	23,15 \pm 0,33	99,2 %	92,7 %
50,00	52,73 \pm 1,47	50,94 \pm 0,68	105,4 %	101,8 %
75,00	73,97 \pm 0,45	72,84 \pm 0,95	98,5 %	97,1 %

^aMédia \pm desvio padrão; n= 3. ^bRecuperação = (Valor médio encontrado/fortificação) x100%.

Como demonstrado na Tabela 13 os valores de recuperação obtidos para biossensor ficaram na faixa de 98,5% a 105,4% e de 92,7 a 101,8% usando CLAE-EM. As recuperações médias demonstram exatidão satisfatória para ambas as metodologias empregadas, uma vez que encontrou-se recuperações próximas a 100% e a ANVISA (2003) estabelece uma exatidão com valores entre 90-110%.

As amostras fortificadas foram também ensaiadas por cromatografia líquida com arranjo de diodos como detector. No entanto na faixa de concentração estudada não foi possível quantificar o carbendazim. O método CLAE-DAD poderia ser empregado se as concentrações das fortificações fossem maiores, visto que o menor nível de concentração de carbendazim detectado por esta técnica foi de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Foi aplicado o teste-*t* student (MILLER e MILLER, 2002) para comparar as médias experimentais dos dois métodos (biossensor e CLAE-EM) na determinação de carbendazim em água. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Teste-*t* para comparar a resposta do biossensor com o método cromatográfico (N=3).

Fortificação	Carbendazim ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Erro relativo %	
	Biossensor	CLAE	<i>t</i> _{cal.}			
				Biossensor	CLAE	
25,00	24,80 \pm 0,58	23,15 \pm 0,33	3,92	-0,80	-7,40	
50,00	52,73 \pm 1,47	50,94 \pm 0,68	1,91	5,46	1,88	
75,00	73,97 \pm 0,45	72,84 \pm 0,95	1,86	-1,37	-2,88	

Os resultados das médias para os dois métodos não apresentaram diferenças significativas para os três níveis de fortificação, sendo os valores de t calculado ($t_{cal.}$) menores que o t tabelado ($t_{tab.}$) que é igual a 4,60 para o nível de confiança de 99% e graus de liberdade igual a $6 - 2 = 4$.

De acordo com os resultados obtidos, o biossensor demonstrou-se adequado para determinação do carbendazim em amostras de água. Sendo assim uma amostra de água coletada na saída de um açude localizado nas proximidades do rio São Lourenço na cidade de Campo Verde – MT em uma região que sofreu impactos com a atividade agrícola e hoje está passando por uma etapa de reflorestamento, foi submetida à análise com o biossensor e pelo método cromatográfico, sem nenhuma etapa de pré-tratamento.

O pesticida carbendazim não foi detectado nesta amostra de água por nenhum dos dois métodos empregados na determinação. Esse resultado pode indicar que não havia carbendazim na amostra ensaiada, ou que o nível de concentração do pesticida estava abaixo dos limites de detecção e quantificação das duas técnicas, não apresentando, portanto sensibilidade adequada.

6. CONCLUSÕES

O fungo endofítico *Ceratobasidium sp* apresentou uma elevada atividade de lipase extracelular, e também um ótimo crescimento, demonstrando-se adequado para sua aplicação como fonte de lipases na construção do biossensor. A maior atividade de lipases do extrato foi obtida usando meio azeite de oliva durante um período de oito dias.

O hidroxinitrato de zinco lamelar com nanopartículas de ouro utilizado como suporte, melhorou a resposta do biossensor para o substrato *p*-NPA, como também proporcionou uma ótima estabilidade do extrato enzimático na pasta do biossensor, sendo que a resposta permaneceu dentro dos limites estatísticos durante vinte semanas.

A eficiência da imobilização juntamente com a contribuição de todos componentes da pasta, como a presença das nanopartículas de ouro no suporte, proporcionou ao biossensor um aumento na sensibilidade.

A melhor resposta para o biossensor foi alcançada imobilizando 0,5 U de lipases no suporte lamelar, usando uma solução de *p*-NPA 50 mmol L⁻¹ em tampão PBS salino pH 7,0 para obtenção do sinal base. Os parâmetros ótimos da VOQ foram frequência de 80 Hz, amplitude de pulso de 120 mV e incremento de varredura de 2 mV, com um potencial de acúmulo de -0,4V aplicado durante 15 segundos.

Os parâmetros de reprodutibilidade e repetibilidade apresentaram DPR% aceitáveis, indicando uma boa precisão na resposta do biossensor proposto. Quando aplicado para o carbendazim pelo método de inibição enzimática o biossensor apresentou um LD de 3,13 µg L⁻¹ estando bem abaixo dos níveis de potabilidade estabelecido pelo Ministério da Saúde e dos níveis de ingestão diária estabelecido pela ANVISA.

Em comparação aos métodos cromatográficos o biossensor se mostrou mais sensível que a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos.

Quando comparado com os resultados da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas CLAE-EM, apresentaram resultados semelhantes, não sendo observadas diferenças significativas, no entanto os limites de detecção e quantificação do método CLAE_EM estão abaixo dos alcançados com o biossensor. Os níveis de recuperação estão dentro dos níveis aceitáveis. Além disso, a instrumentação empregada para aplicação

do biossensor é bem mais simples e seu custo relativamente mais baixo e apresentando um menor tempo de análise.

Como a resposta o biossensor se baseia na inibição da atividade de enzimas lipases, outros pesticidas além do carbendazim, também podem inibir as lipases como, por exemplo, os pesticidas da classe dos carbamatos, o que faz com que o biossensor proposto não seja específico para o pesticida carbendazim, diminuindo então a aplicabilidade do biossensor. Porém os estudos apresentados neste trabalho fornece uma base promissora no desenvolvimento de biossensores usando extratos de fungos como fonte de lipases suportados em hidróxidos duplos lamelares com nanopartículas metálicas.

7. PUBLICAÇÕES

7.1 Eventos

Participação e apresentação do trabalho “Construção de um biossensor enzimático baseado em lipase de fungo endofítico imobilizada em hidroxinitrato de zinco lamelar contendo nanopartículas de ouro” na forma de pôster e apresentação oral, no **18º Encontro Nacional de Química Analítica**, de 18 a 21 de setembro de 2016, Florianópolis/ES.

Artigo em fase final de preparação: BARBOZA, A. M.; SILVA, A. B.; SOUZA, W. P.; JUNIOR, F. Q.; VASCONCELOS, L. G.; TEREZO, A. J.; SOARES, M. A.; CASTILHO, M. Enzymatic biossensor based on lipase of endofitic fungus *Ceratobasidium* sp.2 immobilized in HZnL/AuNPs for determination of carbendazim. **Revista pretendida:** *Electrochimica Acta*.

7.2 Premiações

Prêmio Severino Meireles da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMT pelo trabalho “Desenvolvimento de um biossensor enzimático baseado em lipases de fungos endofíticos imobilizadas em HZnL/AuNPs”, na área de Ciências Exatas e da Terra em setembro de 2016.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, v. 30, p. 1576-1577, 1958.

AHMAD, Kaleem. et al. Electrical conductivity and dielectric properties of multiwalled carbon nanotube and alumina composites. *Applied Physics Letters*, v.89, pp.122-123, 2006.

ALBANIS, T.A.; HELA, D.G.; SAKELLARIDES, T.M.; KONSTANTINOU I.K. Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 823, p. 59. 1998.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim. Nova*, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.

ALMEIDA, C. M. V. B.; GIANNETTI, B. F. A new and practical carbon paste electrode for insoluble and ground samples. *Electrochem. Commun.*, v. 4, p. 985-988, 2002.

AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G.; Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, p.1405-142. 2006.

ANVISA. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". 2003.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária –**Consulta Publica nº113, de 19 de dezembro de 2007**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B20903-1-0%5D.PDF>>.. Acesso 10 de Janeiro de 2017.

ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação e medicamentos. Resolução RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010.

ARIZAGA, G. G. C. **Modificação química de superfícies de hidroxinitrato de zinco e hidróxidos duplos lamelares com ácidos mono e dicarboxílicos**. Universidade Federal do Paraná –Curitiba, PR. (Tese de doutorado) 2008.

ARIZAGA, G. G. C.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F. Layered hydroxide salts: synthesis, properties and potencial applications. *Solide State Ionics*, v. 178, p. 1143-1162, 2007.

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

ARYA, S. K.; SAHA, S.; RAMIREZ-VICK, J. E.; GUPTA, S. B.; SINGH, S. P. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review. *Analytica Chimica Acta*, v. 737, p. 1-21, 2012.

ATKINS, Princípios de química [recurso eletrônico]: questionando a vida moderno e o meio ambiente/ Peter Atkins, Loretta Jones; tradução técnica: Ricardo Bicca de Alencastro. – 5. ed. – Dados eletrônicos. – Porto alegre: Bookman, 2012.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.445-461.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. Fungi: Multifacetated Microbes. New Dehli: Anamaya Publication, p.189-207,2006.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. Caxias do Sul: Educs, p.269-294, 2002.

BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An. Bras. Dermatol.* V. 86 (4), p. 732-742, 2011.

BARD, A. J. ZOSKI, C. G. Voltammetry Retrospective. *Analytical Chemistry*, v. 72, p. 346-352 A, 2000.

BARROSO, M.F.; DE-LOS-ÁVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; ORDIERES-MIRANDA, A.J.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M.B. P.P.; TUÑÓN-BLANCO; P. DNA-based biosensor for the eletrocatalytic determination of antioxidante capacity in beverages. *Biosensor and Bioelectronic*, v, 26, p. 2396-2401, 2011.

BASF. The Chemical Company. **Informativos técnicos:** modo de ação-benzimidazóis. Disponível em: < www.agro.basf.com.br/produtos/informativo/fungicidas/modo_de_acao_princ/benzimidazoles/benzimidazoles.asp?area=2 >. Acesso: 10 Janeiro. 2017.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 133-153, 2000.

BOADI, D.K.; NEUFELD, R.J.; Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28 p. 590–595; 2001.

BISATTO, R. Poliésteres via catálise enzimática heterogênea. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre –RS, 2012.

BORDONAL, A. C. **Materiais híbridos baseados em compostos lamelares e moléculas redox ativos.** Departamento de Química – Universidade Federal de São Paulo –USP. (Tese doutorado). 2016.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1997.

BRAHMAN, P. K.; DAR R. A.; PITRE, K. S. DNA-functionalized electrochemical biosensor for detection of vitamin B1 using electrochemically treated multiwalled carbon nanotube paste electrode by voltammetric methods. *Sensor and Actuators B: Chemical*; v. 177, p. 807-812, 2013.

CABALLO-LÓPEZ, A.; CASTRO, M. D. L. Continuous ultrasound-assisted extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food. *Journal of Chromatograph A*, v. 988, p. 51-50, 2003.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v.27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Bioquímica ilustrada. Ed. Artmed, 2ª ed. Porto Alegre, 1996.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos bioativos produtos naturais. Ver. Virtual Quim., v. 5 n. 3, p. 421-437, 2013.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D.; Mediated Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 17, p. 441-45. 2002.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K.; A Structural basis for the chiral preferences of lipases, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

CODOGNATO, L.; REYS, F. G.R.; WINTER, E.; RATH, S. Comportamento eletroquímico da N- nitrosotiazolidina ácido carboxílico sobre eletrodos de ouro e mercúrio. *Quim. Nova*, v. 31 n. 5, p. 1067 -1072, 2008.

COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. R. ecotoxicol. e meio ambiente. v. 16, p. 63,79, 2006.

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

DEMEL, J.; HYNEK, J.; KOVÁR,P.; TAVIOT-GUÉBO, C.; DEMEL, O.; POSPÍSIL, M.; LANG, K. Insight into the struture of layered Zinc Hydroxide salts intercalated with dodecyl sulfate anions. *J. Phys. Chem*, v. 118, p. 27131-27141. 2014.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacea* LTEB11.** Departamento de Química- Área de concentração em Química Orgânica. Universidade Federal do Pará. Dissertação (Mestrado), Curitiba, 2007.

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

EGLOFF, M. P.; COHEN, P. T. W.; REINEMER, P.; BARFORD, D. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol Biol.* n. 254, p. 942-959, 1995.

ESTEBAN, M.; ARIÑO, C.; DÍAZ-CRUZ, J. M. Chemometric for the analysis of voltammetric data. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 86-92, 2006.

FERNADES, M. F. **Síntese de nanotubos de carbono orientados e aplicação na produção de pontes de AFM**. Instituto de Física – Depto. de Física Aplicada. Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado), São Paulo, 2008.

FERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ, R.; PICO, Y.; MANES, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post harvest fungicides in citrus fruits. *J. Chromatogr. A*, v. 912, p. 301-310, 2001.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. O. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 75, p. 569-576, 2000.

FORJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T. N.; PETERSEN, S. B. What distinguishes the esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochemie*, v. 82, n. 11, p. 1033-1041, 2000.

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 46 n° 3, 2010.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GONÇALVEZ, D.; COUTO, R. O.; CONCEIÇÃO, E. C.; REIS, N. S.; GIL, E.S. Voltametria de pulso diferencial (VDP) em estado sólido de manchas de cromatografia de camada delgada (CCD): Um novo método de análise para fitoativos antioxidantes. *Quim. Nova*, v. 34, n. 2, p. 330-334, 2011.

GOPINATH, S. e SUGUNAN, S. Enzymes immobilized on montmorillonite K10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay Sci.*, v. 35, p. 67–75, 2007.

GRAWE, G. F.; OLIVEIRA, T. R.; NARCISO, E. A.; MOCCELINI, S. K.; TEREZO, A. J.; SOARES, M. A.; CASTILHO, M. Electrochemical biosensor for carbofuran pesticide based on esterases from *Eupenicillium shearii* FREI-39 endophytic fungi. *Biosensor and Bioelectronics*. v. 63, p. 407-413, 2015.

HARRIS, D. C.; Análise química quantitativa. LTC- livros técnicos e científicos Ed. S.A. 5° ed. Rio de Janeiro, 2001.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, n.2, 235-251, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and Conservation; *Mycology Resume*, v. 95, p. 641-655, 1991.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.;ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendência e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Quim. Nova*, v.27, n. 6, p. 986-992, 2004.

HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; FERNADEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M. E GUISAN, J.M. Use of aqueous two-phase systems for in situ extration of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, n 1, p. 73-79; 1998.

HERNANDEZ, P.; BALLESTEROS, Y.; GALAN, F.; HERNANDEZ, L. Determination of Carbendazim with a Graphite Eletrode Modified with Silicone OV-17. *Eletroanalysis*, v.8, n. 10, 1996.

HIOL, A; JONZO, M. D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 25, p. 80-87, 1999.

Instituto Brasileira de Geografia e Estatística – IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola. Disponível em : < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado> >. Acesso em: Mar. 2017.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. & MISSET, O. Bacterial lipases. *Rev FEMS Microbiol* , v.15, p. 29–63, 1994

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

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, n. 4, p. 487–505, 2012.

KATAOKA, E. M. Determinação de carbendazim em amostras de suco de laranja por técnicas eletroquímicas. Uma avaliação estatística de desempenho. 2015 (dissertação de mestrado). Instituto de Química – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos –SP.

KHAMMAS, Z. A. A.; AHMAD, S. S. Cloud point extraction of carbendazim pesticide in foods and environmental matrices prior to visible spectrophotometric determination. *Science Journal of Analytical Chemistry*. v. 4, n. 3, p. 30 – 41, 2016.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*, London, v. 28, n. 7, p. 1208–28, 2011.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem e sua certificação.** Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares – IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. (Mestrado), São Paulo, 2007.

LI, C.; CHOU, T. Atomistic Modeling of Carbon Nanotube-based Mechanical Sensors. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, v.17, p.1-9, 2006.

LI, J.; KUANG, D.; FENG, Y.; ZHANG, F.; XU, Z.; LIU, M. A graphene oxide-based electrochemical sensor for sensitive determination of 4-nitrophenol. *J. Hazard. Mater.*, v. 201-202, p. 250-9, 2012.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 39, p. 98-102, 2006.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 492-500, 2008.

MA R., LICHTENSTEIGER W., SCHLUMPF M. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences*, v. 74, p. 43-50, 2003.

MAAREF, A.; BARHOUMI, H.; RAMMAH, M.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MOUSTY, C.; COSNIER, S. Comparative study between organic and inorganic entrapment matrices for uréase biosensor development. *Sensors and Actuators B Chemical*, p. 671-679, 2007.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future application of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, Newcastle Upon Tyne, v. 3, p. 193-217, 1985.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.38, n.5, 715-721, 2002.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M. M. C.; MELO, E. H. M.; MORAIS, M. A. J.; LEDINGHAM, W. M.; FILHO, J. L. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v. 76, n. 1, p. 23-27, 2001.

MARCOLINO JUNIOR, L. H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêuticos**. 2007. (tese doutorado)-Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

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

MARTÍNEZ, L. M. P.; TORRES, S. M.; GOMES, H. T.; SILVA, A. M. T. Nanotubos e Grafeno: Os primos Mais Jovens na Família do Carbono. *Química 128*, 2013.

MARTINS, M. **Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/ftalocianina**. 162p. (Dissertação Mestrado) Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999.

MAXIMIANO, E. M.; CARDOSO, C. A. L.; ARRUDA, G. J. Detecção Eletroquímica de Carbendazim em Sucos de Frutas Cítricas Utilizando Eletrodo de Pasta de Carbono. *Orbital: The Electronic Journal Of Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 232-239, 2016.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Anal. Sci.*, v. 20, p. 1113-1126, 2004.

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.

MELO, L. F. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. High-performance liquid chromatography determination of pesticides in tomatoes using laboratorymade NH₂ and C18 solid-phase extraction materials. *Journal of Chromatography A*, n. 1073, p. 75-81, 2005.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 119-134, 2012.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. O.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L.C. Aplicação quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim. Nova*. v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, R. K.; MOINO, B. P.; GUILHERME; NOQUEIRA, A. B. Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico obtido com extrato vegetal para determinação de triglicerídeos em biodiesel. *Ver. Virtual Quim*, v.6, n. 4, p.1033-1046, 2014.

MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; VALLE, M. D.; ALEGRET. S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon Nanotubes. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n.9, 2005.

MESSIAS, M.C.T.B.; LEITE, M.G.P.; MEIRA-NETO, J.A.A.; KOZOVITS, A.R. Life-form spectra of quartzite and itabirite rocky outcrop sites, Minas Gerais, Brazil. *Biota Neotropica*, n.11, v.2, p. 1-14, 2011.

MILLER, N. J.; MILLER, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química analítica.* Pearson Educación, S.A., Madrid, 2002.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria N° 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade de água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde – Gabinete do Ministro.

MOURA, L.W.F; OLIVEIRA, M.V; LÔ, M.M; MOTA, J.G.S.M; MAGALHÃES, E.A; LIMA, M.C.L; MAGALHÃES, F.E.A. Bioprospeção de Atividade Lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.15, n.2, p.157-165, 2013.

NAKATANI, H. S. **Utilização de fontes naturais de enzimas para construção de biossensores**. 1995. (Tese de Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

NARASIMHAN, V.; VALENTIN BHIMBA B. Screening of extracellular lipase releasing microorganisms isolated from sunflower vegetable oil contaminated soil for bio-diesel production. *Asian J. of Pharm. Clin Res.* V. 8, n. 2, p. 427-430, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J. Enzymatic biossenors. *Molecular Biotechnolog*, v. 32, n, p. 249-268,2006.

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.

NUNE, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J. L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed eletrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. Comparative study. *Analytica Chimica Acta*, v. 523, n. 1, p. 107-115, 2004.

NUNES, G. S. et al. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from drosophila melanogaster. *Analytica Chimica Acta*, v. 434, p.1-8, 2001.

O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. Square-Ware voltammtry applied to the totally irreversible reduction of adorrbate. *J. Electroanal. Chem.*, v. 345, p. 287-301, 1993

OLIVEIRA, A. C. Desenvolvimento e aplicação de eletrodos à base de nanotubo de carbono. (Tese doutorado). Universidade Federal de São Carlos, 2008.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B. Lipase production by endophytic yeasts through factorial design. *Academia Journal of Microbiology Research*. v.1, p. 016-021, 2013.

OLIVEIRA, G. C. MOCCELINI, S. K.; CASTILHO, M.; TEREZO, A. J.; POSSAVATZ, J.; MAGALHÃES, M. R. I.; DORES, E. F. G. C. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta*, v. 98, p. 130-136, 2012.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por *spray drying* e usadas na construção de biossensores. *Quim. Nova*, v. 32, n. 5, p. 1195- 1201, 2009.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; LIMA-NEO, P.; CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P.P.; DELERUE-MATOS, C. Sensitive bi-enzymatic biossensor based on polyphenoloxidase-goldnanoparticles-chitosan hybridfilm-graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection. *Bioelectrochem.*, v. 98, p. 20-29, 2014.

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

OLLIS, D. L.; CHEAH, E., CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H.G.; GOLDMAN, A. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering Design and Selection*. V. 5, p. 197-211, 1992.

ONISHI, K. A. Relatório de Estágio supervisionado; diretoria de vigilância sanitária do estado de Santa Catarina. Universidade de Santa Catarina, centro tecnológico departamento de engenharia química, 2013.

OSHITA, D. JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. *Quim. Nova*, v. 38, n° 10, p. 1237-1281, 2015.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Ver. Virtual de Química*, v. 5, n° 4, p. 516-537, 2013.

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.

PASTORE, G.L.; MACEDO, G. A. Utilização dos fungos na industria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. *Caxias do Sul: Educs*, 2004. p. 311-334

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

PARELLADA, J.; NARVÁEZ, M. A.; DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, J.J.; PAVLOV, V.; KATAKIS, I. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Analytica Chimica Acta*, n. 362, p. 47-57. 1998.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendência em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

PERSSON, B. J. A Chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3- β -naphthoyl-touidine blue O. *J. Electroanal. Chem.*, v. 287, p. 61-89, 1990.

QUITES, F. J.; GERMINO, J. C.; ATVARIS, T. D. Z. Improvement in the emission properties of a luminescent anionic dye intercalates between the lamellae of zinc hydroxide-layered. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 459, p. 194-201, 2014.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO-JR, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 475-493, 2013.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular Lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 938-943, 1992.

RAZZINO, C. A.; SGOBBI, L. F.; CANEVARI, T. C.; CANCINO, J. MACHADO, S. A. S. Sensitive determination of carbendazim in Orange juice by electrode modified with hybrid material. *Food Chemistry*, v. 170, p. 360-365, 2015.

REDDY, K. G.; MADHAVI, G.; SWAMY, B. E. K.; JYOTHI, P. J.; REDDY, A. V. B.; REDDY, S. Determination of carbophenothion and dibrom pesticides by liquid phase lipase enzyme by voltammetric methods. *Anal. Bioanal. Electricchem.*, v. 4, n. 5, p. 457-467, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, G. B. C.; COLLINS, H. C.; JARDIM, F. S. C. I. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. C. A.; DORES, E. F. G. C.; AMORIM, R. S. S.; LOURENCETTI, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Quim. Nova*, v. 36, nº 2, p. 284-290, 2013.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; VILDOSO-AGUILLA, C. I. ARAÚJO, W. L.; KLEINER-PIZZIRANI, A. A. Resistência a benzimidazóis por *guignardia citricarpa*. *Pesq. Agropec. Bras.* v.42, n. 3, p. 323 -327, 2007.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 77- 86, 2001.

SALGADO, A. M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo.** (Tese de Doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SANTOS, A. J. M.; MIRANDA M.S.; SILVA, J. C. G. E. ESTEVES. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research*; v 46, p. 3167-176, 2012.

SANTOS, D. P. **Determinação eletroquímica de fenóis após processo de degradação de benzeno usando sensor a base de nanotubos de carbonos-ftalocianina de cobalto.**

(Dissertação de mestrado)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.

SANTOS, T. L. L.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Construção, caracterização e otimização de biossensor amperométrico baseado em eletrodos de mi-nicavidade com pasta de carbono. *Cad. Pes. São Luís*, v. 21, n. especial, jul. 2014.

SASSOLA, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 489-511, 2012.

SCHOONHEYDT, R. A., PINNAVAIA, T., LAGALY, G., GANGAS, N. Pillared clays and pillared layered solids. *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, p. 2367-2371, 1999.

SECUNDO, F., MIEHE-BRENDLE, J., CHELARU, C., FERRANDI, E.E., DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Micropor Mesopor Mater*, v. 109, p. 350-361, 2008.

SELECI, M.; AG., D; YALCINKAYA, E. E.; DEMIRKOL, D. O.; GULER, C.; TIMUR, S. Amine-intercalated montmorillonite matrices for enzyme immobilization and biosensing applications. *RSC Advances*, v. 2, p. 2112-2118, 2012.

SHAMAGSUMOVA, R. V.; SHURPIK, D. N.; PADNYA, P. L.; STOIKOV, I. I., EVTUGYN, G. A. Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pilla[5]arene. *Talanta*, v. 144, p. 559-568, 2015.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*. v.03, p. 307-316, 2003.

SILVA, L. M. C. **Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para Fenol e Uréia com Foco na Aplicação Ambiental**, (Tese de Doutorado) 2011b, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SILVA, V.; MANGRICH, A. S.; WYPYCH, F. Liberação de nitrato de hidróxidos duplos lamelares como potenciais fertilizantes de liberação lenta. *R. Bras. Ci. Solo*, n. 37, p. 821-830, 2014.

SILVA, V. P. A.; ALVES, C. R.; DUTRA, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; RONDINA, D.; FURTADO, R. F. Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. *Eclética Química*, v. 36, n. 2, 2011.

SIQUEIRA, L. P. **Desenvolvimento de um biossensor para determinação de triglicerídeos.** Universidade federal de Pernambuco- Centro de ciências biológica (Dissertação de mestrado), Recife- PE, fevereiro, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental.** 6ª ed. Porto Alegre: Brookman, 2009.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Quim. Nova*, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. v.5, p.535-544, 2003.

TASHTOUSH, G.; AL-WIDYAN M. I.; AL-SHYOUKH, A. O. "Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace" . *Applied Thermal Engineering*, v. 23, p. 285–293. 2003.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.*, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors e Bielectronics*, v. 16, p. 121-131, 2001.

TREICHEL, HELEN, DÉBORA DE OLIVEIRA, MARCIO A. MAZUTTI, MARCO DI LUCCIO, AND J.VLADIMIR OLIVEIRA. "A Review on Microbial Lipases Production." *Food Bioprocess Technol*,v.3, p. 182–96. 2010.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R., Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Legis Summa.2004.

TWARI, A.; ARYAL, S.; PILLA, S.; GONG, S. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, v. 78, n. 4-5, p. 1401-1407, 2009.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da hidrólise de triacilgliceróis. *Rev. Eletrônica de Biologia*. v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

VILA, M. M. D. C. **Determinação Enzimática de Salicilato com sistema de análise por injeção em fluxo.** Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química (Tese doutorado). Campinas – SP 2002.

VO-DINH, T.; CULLU, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*. v. 336, n. 6-7, p. 540-551, 2000.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal. Bacteriology*, v. 138, p. 663-670, 1979.

ZABIN, A. J.G. Química de (nano)materiais. *Quim. Nova*, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHAI, R.; ZHANG, B.; LIU, L.; XIE, Y.; ZHANG, H.; LIU, J. Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes. *Catal. Commun.*, v. 12, n. 4, p. 259-263, 2010.

ZHANG, Y.; LEE, K. L. Determination of ultraviolet filters in environmental water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1271, p. 56-61, 2013.

ZHANG, S.; ZHAO, H.; JOHN, R. Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensor – theoretical and practical considerations. *Biosensor e Bioelectronics*, v. 16, p. 119-1126, 2011.