



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E LIMNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA**

ISABELA GUTERRES PINTO PAULO

**APROVEITAMENTO E APLICAÇÃO DE SERINOPROTEASES DE *Genyatremus*
luteus EM BIOCSENSOR PARA DETECÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

**SÃO LUIS
2018**

ISABELA GUTERRES PINTO PAULO

**APROVEITAMENTO E APLICAÇÃO DE SERINOPROTEASES DE *Genyotremus*
luteus EM BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia. Linha de Pesquisa: Biodiversidade e Ecologia de Ecossistemas Aquáticos. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Talita da Silva Espósito.

SÃO LUÍS

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Paulo, Isabela Guterres Pinto.

Aproveitamento e Aplicação de Serinoproteases de *Genyotremus luteus* em Biossensor para Detecção de Metais em Amostras Ambientais / Isabela Guterres Pinto Paulo. - 2018.

51 f.

Orientador(a): Talita da Silva Espósito.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Aproveitamento de resíduos. 2. Haemulidae. 3. Monitoramento ambiental. 4. Serinoprotease. I. Espósito, Talita da Silva. II. Título.

**APROVEITAMENTO E APLICAÇÃO DE SERINOPROTEASES DE *Genyotremus*
luteus EM BIOCSENSOR PARA DETECÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Oceanografia, linha de pesquisa: Biodiversidade e Ecologia de Ecossistemas Aquáticos. Outorgado pela Universidade Federal do Maranhão, e em cuja Biblioteca Central encontrar-se-á à disposição dos interessados.

Aprovada em: 06 / 02 / 2018

Profa. Dra. Talita da Silva Espósito (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Marianna Basso Jorge
Doutora em Fisiologia Animal Comparada
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes
Doutora em Química
Universidade Federal do Maranhão

Dedico aos meus pais, por me incentivarem e por me mostrarem sempre o melhor caminho a seguir.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelos ensinamentos e graças que tem proporcionado em minha vida. Por guiar meus passos, me amparar nos melhores e piores momentos, me dar força, discernimento e coragem. Por estar a meu lado, sendo meu aliado em todas as batalhas.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro e meus maiores exemplos, por me ensinarem a cada dia o valor da família e o quão grande é a força de uma família quando permanece unida nos enfrentamentos e batalhas da vida. Por estarem sempre a meu lado, me apoiando e incentivando meu crescimento.

Ao meu namorado, pelo companheirismo, apoio e compreensão. Por ter sempre uma palavra de carinho e ser um constante incentivador do meu crescimento.

À Universidade Federal do Maranhão que, por meio do Programa e Pós Graduação em Oceanografia permitiu meu crescimento profissional e intelectual.

Ao Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP), aos integrantes e ex-integrantes Marlon e Laiane e a coordenadora do referido Núcleo, Profa. Gilvanda Nunes, por terem me auxiliado e contribuído de forma tão significativa para este trabalho, disponibilizando o Laboratório e seus equipamentos para realização das análises.

Ao BIOAqua e suas ex-integrantes Suanny, Nathalie, Rafaela e Ana Kate, pela receptividade com a qual me receberam no laboratório, pela troca de conhecimentos e disponibilidade de me repassarem seus ensinamentos e principalmente pela amizade formada ao logo desses dois anos. Sou eternamente grata.

A Profa, Talita da Silva Espósito, pela oportunidade.

Enfim, meus profundos agradecimentos, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e avanço deste novo passo da minha carreira profissional.

*“Feliz aquele que transfere o
que sabe e aprende o que
ensina”.*

Cora Coralina

RESUMO

Metais são poluentes ambientais de ampla ocorrência em todo o mundo. Devido à sua periculosidade, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis de detecção. Neste trabalho, foi construído um biossensor mediante imobilização de uma fração rica em tripsina (FRT) extraída dos cecos pilóricos do *Genyatremus luteus* no eletrodo de trabalho de um sensor serigrafado. Foram realizados ensaios com a FRT livre em solução e imobilizada em sensor, de forma a verificar sua atividade. Após otimização das condições operacionais, tais como concentração do substrato, pH do meio, tipo de imobilização enzimática, entre outras, o biossensor foi caracterizado mediante voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria, tendo sido em seguida determinadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, precisão, sensibilidade e exatidão. No estudo cinético, foi observado um aumento crescente na atividade da tripsina com a concentração do substrato, até estabilização em uma concentração média de $0,178 \text{ mmol.L}^{-1}$. Os resultados indicaram bom desempenho para a FRT de *G. luteus* com relação à linearidade (para os metais), à repetibilidade (CV médio de $15,61\% \pm 2,0\%$ entre intramedidas) e à sensibilidade (com limites de detecção de 0,029, 0,025 e $17,6 \mu\text{.L}^{-1}$, para os metais Hg, Fe e Zn, respectivamente). Os resultados evidenciaram que a FRT extraída de *G. luteus* pode efetivamente ser empregada na obtenção de biossensores altamente sensíveis e reprodutíveis voltados para a detecção/quantificação de metais no meio aquático.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, aproveitamento de resíduos, serinoprotease, Haemulidae.

ABSTRACT

Heavy are widespread environmental pollutants worldwide, and because of their hazardous nature, it is necessary to develop rapid and sensitive detection methods. In this work, a biosensor was constructed by immobilization of a trypsin rich fraction (FRT) extracted from the pyloric cecum of the *Genyotremus luteus* on the working electrode of a silkscreen sensor. Assays were performed with the free enzyme in solution and immobilized in a sensor, in order to verify its activity. After optimization of the operating conditions, such as substrate concentration, medium pH, type of enzymatic immobilization, among others, the biosensor was characterized by differential pulse voltammetry and chronoamperometry, and the following merit figures were then determined: linearity, precision, sensitivity and accuracy. In the kinetic study, an increase in trypsin activity with substrate concentration was observed until stabilization at a mean concentration of 0.178 mmol.L⁻¹. The results indicated good performance for the FRT of *G. luteus* with respect to linearity (for metals), to repeatability (mean CV of 15,61% ± 2,0% between measurements with different biosensors) and sensitivity (with detection limits of 0.029, 0.025 and 17.6 µ.L⁻¹, for the Hg, Fe and Zn, respectively). The results showed that FRT extracted from *G. luteus* can effectively be used to obtain highly sensitive and reproducible biosensors for the detection / quantification of metals in the aquatic environment.

Key words: environmental monitoring, waste utilization, serine protease, Haemulidae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Enzima Tripsina (E.C 3. 4. 21. 4).....	17
Figura 2-	<i>Genyatremus luteus</i>	18
Figura 3-	Biossensor amperométrico serigrafado de três eletrodos: eletrodo de referência com Ag/AgCl, eletrodo auxiliar com grafite, e eletrodo de trabalho com mediador.....	19

ARTIGO: Biossensor amperométrico à base de tripsina extraída de *Genyatremus luteus* para detecção de metais pesados

Figura 1-	Biossensor de FRT aplicado em potenciostato e imerso em solução previamente preparada.	32
Figura 2-	Cinéticas de reação entre a FRT (<i>G.luteus</i>) e a Tripsina comercial (Tripsina de pâncreas suíno/Sigma Aldrich)	35
Figura 3-	Respostas cronoamperométricas do biossensor à base da FRT obtida de cecos pilóricos de peixe <i>G. luteus</i> (imobilizada no eletrodo de trabalho) em meios reacionais com diferentes valores de pH. Condições operacionais: [substrato] = BapNa 8mmol.L; potencial de trabalho = 250,0 mV; mediador eletroquímico = MBRS.....	37
Figura 4-	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos durante as reações enzima-substrato empregando biossensor (A) tripsina comercial e (B) FRT obtida de <i>G. luteus</i> . Condições operacionais: [substrato] = BapNa 8mmol.L; tempo de estabilização: 3s; tempo de modulação: 0,05s; intervalo entre medidas: 0,1s; amplitude da modulação: 0,05055V. Velocidade de varredura 25mV s ⁻¹	38
Figura 5-	Cronoamperogramas obtidos durante a reação enzima-substrato, empregando biossensor (A) Tripsina comercial e (B) FRT obtida de <i>G. Luteus</i> . Condições operacionais: mediador = MBRS; [substrato] = BapNa 8mmol; potencial de trabalho = 250 mV.....	39

Figura 6

Inibição relativa percentual (IR %) da tripsina comercial (TC) e da fração rica em tripsina (FRT) devido à presença de metais pesados, empregando-se o material enzimático livre em solução ou imobilizado no eletrodo de trabalho do sensor serigrafado, com ou sem o mediador Meldola's Blue e Sal de Reinecke (MBRS). (Letras iguais em colunas referentes aos metais Hg, Zn e Fe nas categorias Sem Mediador e MBRS para as enzimas TC e FRT não diferem estatisticamente entre si pelo teste T de Student, $p < 0,05$).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Cinética de reação para a tripsina livre em contato com seu substrato, utilizando-se a fração rica em tripsina (FRT) obtida do peixe <i>G. luteus</i>	36
Tabela 2	- Comparativo da sensibilidade da tripsina de diferentes espécies tropicais aos metais testados nesta pesquisa: Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Fe^{2+} . *Este trabalho.	40
Tabela 3	- Limites de detecção e quantificação obtidos pelo biossensor de FRT.	42
Tabela 4	- Eficiência do método de detecção dos metais pesados empregando o biossensor amperométrico contendo a fração rica em tripsina (FRT) e o mediador eletroquímico Meldola's Blue-Sal de Reinecke (MBRS). Concentração molar dos inibidores: 0,01mM.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
A	Absorbância
Abs	Absorbância
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de Prata
Al	Alumínio
BAPNA	N α -Benzoyl-DL-arginine 4 nitroanilide hydrochloride
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de Variação
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EBA	Extrato Bruto Aquecido
ϵ	Coefficiente de Extinção Molar
Fe	Ferro
FRT	Fração Rica em Tripsina
HCl	Ácido Clorídrico
Hg	Mercúrio
I	Comprimento da Cubeta
<i>in situ</i>	“no local”
L	Litros
M	Molar
mL	Mililitros
Mmol	Milimolar
MRBS	Meldola’s Blue Sal de Reineck
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Polivinila
TRIS	Hidroximetil Aminometano
UV/VIS	Ultra Violeta/Visível
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
1.1 TECNOLOGIAS LIMPAS	14
1.2 ENZIMAS	15
1.3 <i>Genyatreumus luteus</i> (Bloch, 1790)	17
1.4 BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS	18
1.4.1 Biossensores a base de enzimas	20
1.5 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR ELEMENTOS METÁLICOS.....	20
REFERÊNCIAS	22
1. INTRODUÇÃO	29
2. METODOLOGIA	30
2.1. <i>Soluções e Reagentes</i>	30
2.2. <i>Instrumentação</i>	30
2.3. <i>Aquisição das espécimes</i>	31
2.4. <i>Obtenção da Fração Rica em Tripsina (FRT)</i>	31
2.5. <i>Estudo cinético da Atividade da Tripsina</i>	31
2.6. <i>Construção do Biossensor</i>	32
2.7. <i>Medidas Eletroquímicas, Otimização do pH e Ensaio de Inibição Enzimática</i>	33
2.8. <i>Sensibilidade, Exatidão e Precisão do Biossensor</i>	34
2.9. <i>Análises Estatísticas</i>	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. <i>Cinética Enzimática da Tripsina e da FRT</i>	34
3.2. <i>Otimização do pH do Meio</i>	36
3.3. <i>O Mediador Eletroquímico e o Potencial de Trabalho</i>	37
3.4. <i>Testes de inibição com Metais</i>	40
4. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 TECNOLOGIAS LIMPAS

Em décadas anteriores, as empresas tinham como foco a maximização do retorno financeiro aos seus acionistas. Entretanto, a partir de 2000 foram influenciadas por um ambiente de concorrência global e pressões por adequações legais relacionadas às questões ambientais e sociais. Assim, o foco voltou-se para a incorporação destas temáticas em seus processos de negócio. Os processos produtivos nas organizações atuais passaram a adotar a eficiência econômica e a responsabilidade social e ambiental (OLIVEIRA-NETO et al, 2015).

Essas atividades sustentáveis atualmente adotadas compõem o conceito de Produção Mais Limpa ou Tecnologia Limpa, que trabalham de modo a minimizar os impactos predatórios das atividades produtivas ao meio ambiente. Estas abrangem técnicas e disciplinas que orientam empresas na adoção de produção mais limpa, ações de prevenção de perdas e poluição, redução no uso de recursos, melhorias na ecoeficiência e redução de resíduos de indústrias e embalagens na fonte (OLIVEIRA-NETO et al, 2015; FONSECA, 2015).

As indústrias piscícolas demandam de Produção Mais Limpa, devido à presença de resíduos ricos em compostos orgânicos e inorgânicos, os quais geram preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos, já que as águas residuais apresentam sólidos suspensos totais e elevadas demandas químicas e bioquímicas de oxigênio, o que contribuem para a contaminação do meio aquático. As tecnologias limpas geradas com os resíduos de pescado visam à obtenção de produtos de valor agregado e redução dos resíduos gerados na industrialização dessa matéria-prima, como aproveitamento para consumo animal (silagens, compostagens e outros), aproveitamento para consumo humano (produtos derivados de pescado) e aproveitamento para a indústria (enzimas, biodiesel e outros) (FELTES et al, 2010).

O processamento do pescado gera muitos resíduos, como cabeça, cauda, pele, ossos e vísceras, geralmente lançados no ambiente sem tratamento prévio e não apresentam valor comercial. Sendo assim, geram um problema para a indústria de pesca e a sua disposição tem grande impacto econômico e ambiental. Este desperdício é considerado como uma das fontes mais ricas de enzimas proteolíticas, sendo possível a recuperação de 1g da enzima por 1kg de vísceras (BEZERRA et al., 2001; GILDBERG e OVERBO, 1990).

Diversos estudos mostram que estes subprodutos da indústria pesqueira são passíveis de aplicação em muitos segmentos industriais: na alimentação animal (ESTEBAN et al., 2006); na produção de biodiesel/biogás (LANARI e FRANCI, 1998); na incorporação de produtos dietéticos (quitosana) (GILDBERG e STENBERG, 2001); na produção de pigmentos naturais

(SACHINDRA et al., 2006); embalagens de alimentos (quitosana, gelatina e colágeno) (ARVANITTOYANNIS et al., 1998; CARVALHO et al., 2008); na obtenção de enzimas, principalmente proteases (BEZERRA et al., 2001; BEZERRA et al, 2005; COSTA et al., 2013; ESPÓSITO et al., 2009a; ESPÓSITO et al, 2009b; ESPÓSITO et al, 2010; FREITAS- JUNIOR et al., 2012; MARCUSCHI et al., 2010; SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2007) e na indústria farmacêutica e de cosméticos (colágeno) (BENJAKUL et al., 2010; LIU et al., 2012).

1.2 ENZIMAS

As enzimas foram descobertas no século XVIII, quando houve o início de estudos sobre digestão de alimentos. No século XIX, Pasteur estabeleceu o conceito de enzimas como células vivas, porém a denominação enzima (grego: “em leveduras”) só foi exposto por Khune em 1878, sendo que os trabalhos de purificação de enzimas só começaram após 1920. As enzimas são em maioria proteínas que catalisam reações biológicas; estas possuem um centro ativo que é o local onde são processadas as reações com seus substratos específicos, porém trabalham sob condições ideais de pH, temperatura e pressão (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; ANDRADE, 2006).

Por serem catalisadoras as enzimas aceleram reações promovendo alcance de equilíbrio sem alterá-las, a partir da diminuição da energia de ativação. Essa catalise da reação química com o reagente estruturalmente similar (substrato) garante o uso das mesmas em biossensores devido sua especificidade e propriedades catalíticas. Sendo que, as reações catalisadas por enzimas, podem ser usadas para determinação de substratos, ativadores, inibidores, e a própria enzima (ANDRADE, 2006; BRITO et al, 2016).

As proteases compõem a classe de enzimas mais utilizadas no mundo, respondendo por 60% da produção de enzimas totais, mundial (GUPTA et al, 2002). Devido à diversidade de aplicações que estas proteínas, principalmente, proteases alcalinas, têm em várias indústrias, por exemplo, alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos (ESPÓSITO et al., 2009a; KLOMKLAO et al., 2005). Vários estudos relatam que vísceras de peixe podem ser usadas como uma importante fonte de proteases alcalinas (BEZERRA et al., 2005; KHANTAPHANT e BENJAKUL, 2010; KLOMKLAO et al., 2009; SOUZA et al., 2007), sendo uma alternativa quando o objetivo é minimizar a perda econômica e perigos ecológicos causados por resíduos (BOUGATEF et al, 2007; SOUZA et al, 2007).

Os inibidores das enzimas são moléculas que interagem com as enzimas ou compostos que quelam íons iônicos requeridos pela enzima para manter a sua conformação (WANDERLEY et al, 2017).

A tripsina (EC. 3.4.21.4) está presente em peixes como isoenzimas, apresentando essencialmente a mesma especificidade comparado às tripsinas de mamíferos (CASTILLO-YANEZ et al., 2005). Como outras serinoproteases, a tripsina se caracteriza por possuir um resíduo de serina no sítio ativo, por apresentar o maior nível de atividade nos valores de pH entre 8,0 e 11,0 e em temperaturas de 35° – 45°C, por serem inibidas ou desestabilizadas em pH abaixo de 5,0 e acima de 11,0 na presença de diisopropil-fluorofosfato (DFP), fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF), inibidor de tripsina de soja (SBTI) e de aprotinina. A tripsina hidrolisa substratos sintéticos como N- α -benzoil-L-arginina-p-nitoanilida (BAPNA) e tosil-arginina-metil-éster (TAME) (WHITAKER, 1994; SIMPSON, 2000), sendo esse o princípio bioquímico que fornece base para métodos colorimétricos práticos voltados à determinação da velocidade de catálise por espectrofotometria.

Ao longo das últimas décadas, tripsinas obtidas a partir de vísceras de peixes têm sido extraídas, purificadas e caracterizadas. As tripsinas de peixes tropicais estudadas por GUIZZANI et al. (1991), BEZERRA et al. (2001; 2005), KISHIMURA et al. (2006), KLOMKLAO et al. (2007), SOUZA et al. (2007), SILVA et al. (2011), FREITAS-JUNIOR et al. (2012) e COSTA et al. (2013) demonstraram ser termoestáveis, com alta atividade em pH alcalino e sensível a metais.

O processo de purificação de enzimas possui inúmeras etapas pré-definidas que passam por métodos cuidadosos e tem como função distinguir proteínas com base na sequência de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e lipídios da estrutura tridimensional e na sua atividade biológica (BIAZUS et al, 2010). Geralmente as enzimas são purificadas utilizando-se um dos vários métodos de cromatografia (filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica ou afinidade) porém, além desses também podem ser utilizados métodos tradicionais de extração enzimática como: precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, extração de tampão Tris-HCl, entre outros (WANDERLEY et al, 2017).

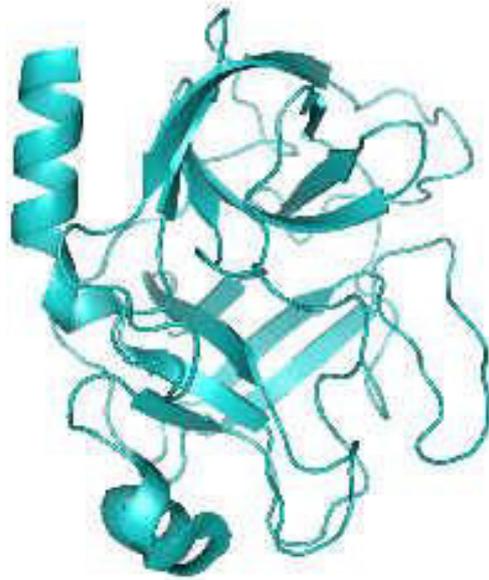


Figura 1: Enzima Tripsina (E.C 3. 4. 21. 4). (Foto: www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas)

1.3 *Genyatremus luteus* (Bloch, 1790)

A espécie *Genyatremus luteus*, vulgarmente conhecido como peixe-pedra é proveniente da família Haemulidae e característico de ambientes costeiros com substratos consolidados, porém mantém hábitos demersais. Sua distribuição abrange regiões abaixo das Antilhas e a costa norte da América do Sul, da porção leste da Colômbia até o Brasil. Sua fisiologia compõe-se por cabeça pequena, boca com dois poros metonianos, pré-opérculo serrado até o ângulo, corpo ovalado e comprimido, nadadeira caudal emarginada, nadadeira dorsal com 13 espinhos e 12 raios, sendo que o quinto raio é mais alongado e a nadadeira anal com 11 raios (NUNES e MENDONÇA, 2008).

A captura do peixe-pedra é desempenhada em sua maioria pela pesca artesanal (utilizando como arte de pesca a linha de mão) e em alguns casos a mesma aparece como fauna acompanhante na captura do *Litopenaeus shimith* (ALMEIDA, NUNES e ALVES, 2005; DIAZ LUGO et al, 2015). Tem grande valor comercial, palatabilidade e aceitação pela população e apresenta estágio III a IV de maturação na maior parte do ano (GOMEZ, GUZMAN e CHACON, 2002), trata-se, pois, de uma espécie abundante em seu habitat.

ALMEIDA et al (2005) afirmam que o *G. luteus* (FIGURA 2) em seu espectro trófico é eurifágico e oportunista, não havendo preferência em sua alimentação e que a grande abundância de um determinado item pode estar na sua grande oferta ao meio.

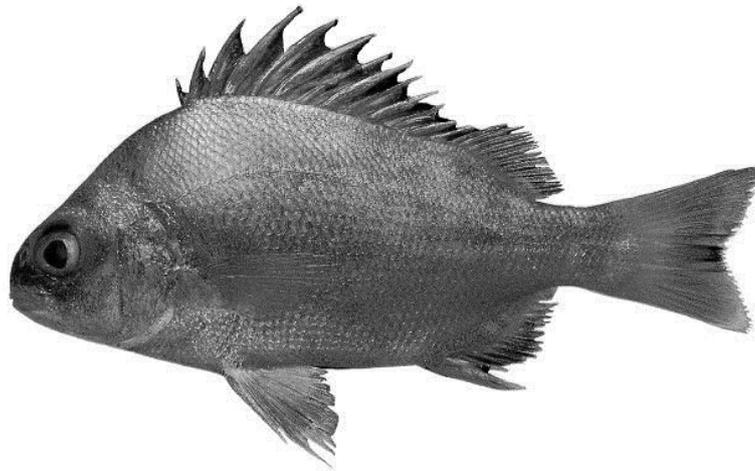


Figura 2: *Genyatremus luteus* (foto: <http://www.fishbase.us>)

1.4 BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Biossensores são sensores modificados com material biológico (MARQUES e YAMANAKA, 2008). Essas ferramentas garantem suplementar técnicas existentes, pois promovem a seletividade, baixo custo de construção e estocagem, facilidade de automação, potencial de miniaturização, construção de equipamentos simples e portáteis para monitoramento “on site” (ROSATTO et al, 2001), baixo nível de interferentes para o sensoriamento de micropoluentes, especificidade, tempo de resposta e de vida útil, reprodutibilidade e exatidão das medidas (OLIVEIRA, 2013). A definição deste equipamento se dá como um dispositivo analítico composto de um elemento biológico de reconhecimento intimamente com o transdutor.

O elemento de biorreconhecimento ou bioreceptor (enzimas, micróbios, organelas, células animais ou vegetais, anticorpos, ácidos nucleicos, DNA, entre outros) (MARQUES et al, 2006) incorporado ao sensor e o método de transdução do sinal (eletroquímico, óptico, térmico, piezelétrica, etc.) que determinam as medidas.

Os biossensores eletroquímicos dividem-se em amperométricos (a corrente resultante é medida continuamente a partir do potencial aplicado entre os eletrodos de trabalho e referência), potenciométricos (medida da densidade de carga da superfície do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência), condutimétrico (variação nas medidas de condutância, resultante de produtos da reação catalítica) e impedimétricos (medidas das

propriedades elétricas resultante dos eventos de biorreconhecimento na superfície do trabalho) (OLIVEIRA, 2013).

A reação de ativação deste dispositivo dá-se a partir do analito, contido na amostra fluída, esta, ao entrar em contato com o elemento de biorreconhecimento imobilizado na superfície do sensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, índice de refração, resistência, capacitância, etc.), sendo identificada por um transdutor. O sinal adquirido é processado, mostrando se o analito foi ou não detectado (MARQUES et al, 2006) ou seja, o biossensor irá converter um evento biológico em um sinal detectável, pela ação de um transdutor e um receptor (SILVA, 2010; SILVA et al, 2011).

Uma das características mais importantes de um biossensor é a sua seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, tal característica é proporcionada pelo componente biológico. No caso das enzimas como componentes biológicos, a sua especificidade, associada ao baixo custo, alta sensibilidade e a seletividade de um detector eletroquímico demonstram às vantagens da detecção usando biossensores enzimáticos (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2002; SILVA, 2010; SILVA et al, 2011).

Há uma gama de biossensores destinados à detecção de metais, tais como os bioluminescentes que dependem de medidas de intensidade (fluorescentes) ou medidas espectrais (ratiométricos) (GABRIEL e VIVIANE, 2016), biossensores com compostos condutores de tintas serigráficas (CANKURTARAN et al, 2016), biossensores baseados em macro, micro e nanopartículas (GUMPU et al, 2015), biossensores à base de enzimas (SYSHCHYK et al, 2015), biossensores serigrafados (FIGURA 3) dentre muitos outros.

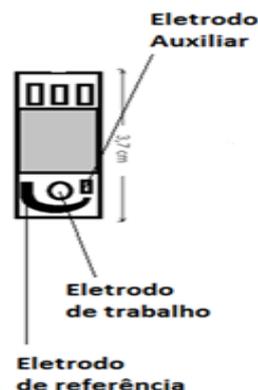


Figura 3: Biossensor amperométrico serigrafado de três eletrodos: eletrodo de referência com Ag/AgCl, eletrodo auxiliar com grafite, e eletrodo de trabalho com mediador.

1.4.1 Biossensores a base de enzimas

Quando o material biológico utilizado para imobilizar um sensor é uma enzima, o biossensor obtido é denominado enzimático. Estes utilizam a atividade enzimática como sinal analítico a ser monitorado. Os biossensores enzimáticos mais comuns são os que utilizam o monitoramento do analito baseado no princípio de inibição da enzima. Para isso, a enzima é exposta a um inibidor específico por um determinado tempo proporcionando que sua atividade seja verificada antes e após inibição, que é medida quantitativamente determinando a concentração deste agente inibidor em porcentagem (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

As técnicas de imobilização da enzima no sensor variam entre, adsorção direta sobre filmes condutores, ligação covalente em superfícies previamente modificadas, fixação da enzima em matriz sol-gel ou micela reversa, eletroposição em matriz polimérica e ligação cruzada com reagentes multifuncionais (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; OLIVEIRA, 2013).

Tais procedimentos possibilitam a reutilização das enzimas, aumentam a estabilidade, reduzem custos e aumentam em alguns casos a atividade enzimática, porém em outros pode ocorrer uma perda parcial ou total da atividade da enzima, nestes casos os fatores podem ser atribuídos as propriedades da própria enzima, do suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais, comprometendo a viabilidade e a vida útil do dispositivo (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; OLIVEIRA, 2013).

A alta seletividade e especificidade dos biossensores enzimáticos com o analito permitem a detecção de poluentes em matrizes complexas, ou seja, os mesmos são detectados mesmo na presença de contaminantes antrópicos, incipientes ou interferentes naturais (OLIVEIRA, 2013).

1.5 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR ELEMENTOS METÁLICOS

Os metais são umas das principais fontes de contaminação lançadas no ambiente aquático, comprometendo tanto o habitat, quanto as fontes alimentares e a vida e saúde da população (BARRETO e FREITAS, 2017). Dos principais sistemas de escoamento (residencial, industrial e de águas pluviais), o que desencadeia a maior concentração de metais é o industrial, particularmente dos setores de produção de aço e fabricação de metais, mineração, agricultura e por fim resíduos domésticos, este em menos escala (OLIVEIRA-NETO et al, 2015; COPAJA et al, 2016), em razão do aumento populacional e aumento das atividades industriais perto de rios e nascentes a qualidade das águas vem sendo afetadas continuamente (ANSILAGO et al, 2016).

Ao longo das décadas, a poluição ambiental por metais tornou-se um dos problemas mais importantes no mundo (CHANDRAN et al., 2005). O ambiente marinho está continuamente sujeito à poluição química proveniente das atividades antropogênicas que podem aumentar a descarga de metais pesados em várias concentrações nos ecossistemas aquáticos naturais (PAPAGIANNIS et al., 2004) e prejudicar os organismos aquáticos que vivem naquele ambiente (ALINK, 1982). Esta contaminação ocorre devido ao uso extenso de metais nos processos agrícolas, químicos e industriais (PREGO e COBELO-GARCIA, 2003; CHEUNG et al., 2005).

Atualmente, o mundo enfrenta importantes problemas ambientais causados pela poluição por metais pesados nas zonas costeiras (YAO et al, 2017). Pelo fato de não serem biodegradáveis, torna-se praticamente inviável sua remoção do ecossistema aquático (COPAJA et al, 2016), persistindo no ambiente, o que acabam por se tornar bioacumulados e biomagnificados ao longo da cadeia trófica (AYOTUNDE et al, 2012). Deste modo, os organismos aquáticos tornam-se indicadores da qualidade ecológica de todo o fluxo da água, devido a toxicidade, persistência e comportamento cumulativo dos metais, comprometendo o ecossistema e também a saúde humana (COPAJA et al, 2016; ARANTES et al, 2016).

Além disso, a toxicidade desses contaminantes causam a longo prazo disfunções e danos ao sistema nervoso central e mental, processos degenerativos físicos, musculares e neurológicos que imitam a doença de Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular e esclerose múltipla (AYOTUNDE et al, 2012).

Desta forma, há uma necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental, o que ocasiona um estímulo para maior produção desses métodos, e os biossensores demonstram grande perspectivas em relação a sua utilização para o monitoramento de efluentes e demais matrizes de interesse ambiental (ROSATTO et al, 2001).

REFERÊNCIAS

- ALINK, G. M. Genotoxins in waters. In: SORNA, M.; VANIO, H. (eds.), **Mutagens in our Environment**. Alan R. Liss, New York, p. 261–276, 1982.
- ALMEIDA, Z. S., NUNES, J., ALVES, M.; Dieta alimentar de *Genyatremus luteus* (BLOCH, 1790) - (TELEOSTEI, PERCIFORMES: HAEMULIDAE) na baía de São José, Maranhão, Brasil, **Atlântica**, vol.27, no.1, pp. 39-47, 2005.
- ANDRADE, V. M.; Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de polipirrol, 112 p., Dissertação (Mestrado em Engenharia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalurgica e de Materiais, Porto Alegre, 2006.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivation of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* in bench scale using medium contaminated with heavy metals, **Eng. Sanit. Ambient.**, vol.21, no.3, Rio de Janeiro, July/Sept. 2016
- ARANTES, F. P.; SAVASSI, L. A.; SANTOS, L. B.; GOMES, M. V. T.; BAZZOLI, N. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil, **An. Acad. Bras. Ciênc.**, vol.88, no.1, Rio de Janeiro, Mar. 2016 Epub Feb 05, 2016.
- ARVANITTOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. . Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties, **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 371–382, 1998.
- AYOTUNDE, E. O.; OFFEN, B. O.; ADA, F. B. Heavy metal profile of water, sediment and freshwater cat fish, *Chrysichthys nigrodigitatus* (Siluriformes: Bagridae), of Cross River, Nigeria, **Rev. biol. Trop.**, vol.60, n.3, San José, Sep. 2012.
- BARRETO, M. F., FREITAS, M. C. S. Segurança alimentar e nutricional e contaminação ambiental: tabu e estigma, **Ciênc. Saúde coletiva**, vol.22, n.2, p.527-534, Rio de Janeiro, Fev. 2017.
- BENJAKUL, S.; THIANILAKUL, Y.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S.; KISHIMURA, H.; PRODPRAND, T.; MEESANE, J. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*), **J. of the Sci. of Food and Agric.**, v. 90, p. 132– 138, 2010.
- BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem.**, 40, 1829–1834, 2005.
- BEZERRA, R.S; SANTOS, J.F; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO, L.B., JR. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **J. Food Biochem.** 25, 199-210, 2001.
- BIAZUS, J. P. M., SANTANA, J. C. C., SOUZA, R. R., TAMBOURGE, E. B. Purificação de amilases de malte e Zea mays, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol.30, n.1, p.2118-223, Campinas, Jan/Mar. 2010.

BOUGATEF, A.; SOUISSI, N.; FAKHFAKH, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; NASRI, M. Purification and characterisation of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*), **Food Chem.**, n. 102, p. 343-350, 2007.

BRITO, M. S., MELO, M. B., ALVES, J. P. A., FONTENELLE, R. O. S., MATA, M. S., ANDRADE, L. B. S. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions, **Hoehnea**, vol.43, no.1, São Paulo, Jan./Mar. 2016.

CANKURTARAN, H., KARADAYI, E. B., SUNGUR, S., Conductive composites of serigraphic inks and their usage in heavy metal sensor and biosensor, **Progress in Organic Coatings**, v.98, pp. 6-9, 2016.

CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; THOMAZINE, M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin, **Food Hydroc.**, v. 22, p. 1117–1123, 2008.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*, **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 140, p. 422–426, 2005.

CHEUNG, C. C. C.; SIU, W. H. L.; RICHARDSON, B. J.; DE LUCA-ABBOTT, S. B.; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*, **Environ. Pollut.**, v. 128, p. 393–403, 2005

COPAJA, S. V.; NUÑES, V. R.; MUÑOZ, G. S.; GONZALEZ, G. L.; VILA, I.; VELIZ, D. Heavy metal concentrations in water and sediments from affluents and effluents of Mediterranean Chilean reservoirs, **J. Chil. Chem. Soc.**, vol.61, no.1, Concepción, mar. 2016.

COSTA, H.M.S; FREITAS JÚNIOR, A.C.V.; AMARAL, I.P.G.; HIRATA, I.Y.; PAIVA, P.M.G.; CARVALHO JR, L.B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization, **Chem. Cent. J.**, 7:166, 2013.

DIAZ LUGO, Ángel A et al. Análisis de la comunidad de peces asociada a la pesca artesanal de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, en el Golfo de Venezuela, **Zootecnia Trop.** [online]. 2015, vol.33, n.1, pp. 7-22. ISSN 0798-7269.

ESPÓSITO, T. S., AMARAL, I. P. G., BUARQUE, D. S., OLIVEIRA, G. B., CARVALHO, L. B., JR., & BEZERRA, R. S. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent, **Food Chem.**, 112, 125–130, 2009a.

ESPÓSITO, T. S., AMARAL, I. P. G., MARCUSCHI, M., CARVALHO, L. B., JR., & BEZERRA, R. S. Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio*) processing waste, **J. of Food Biochem.**, 33(6), 821–834, 2009b.

ESPÓSITO, T. S.; MARCUSCHI, M.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Trypsin from the processing waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents, **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 58, p. 6433 – 6439, 2010.

- ESTEBAN, M. B.; GARCIA, A. J.; RAMOS, P.; MARQUEZ, M. C. Evaluation of fruit-vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets, **Waste Managem.**, v. 27, p. 193–200, 2006.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecido e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática, **Quim. Nova**, vol. 25, n. 03, p. 455-464, 2002.
- FELTES, M. M. C., CORREIA, J. F. G., BEIRÃO, L. H., BLOCK, J. M., NINOW, J. L., SPILLER, V. R., Alternatives for adding value for the fish processing wastes, **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** [online]. vol.14, n.6, pp.669-677, 2010.
- FONSECA, S. A.; Incubadoras como vetores para promoção de tecnologias limpas em empreendimentos de pequeno porte: possibilidades e limites, RAM, **Rev. Adm. Maquenzie** [online], vol.16, no.1, São Paulo, Jan/Fev. 2015.
- FREITAS-JÚNIOR, A.C.V.; COSTA, H.M.S.; ICIMOTO, M.Y.; HIRATA, I.Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO JR., L.B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chem.**, v. 133, p. 1596–1602, 2012.
- GABRIEL, G. V. M., VIVIANE, V. R., Engineering the metal sensitive sites in *Macrolampis sp2* firefly luciferase and use as a novel bioluminescent ratiometric biosensor for heavy metals, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, 30, pp. 8881- 8893, 2016.
- GILDBERG, A.; OVERBO, K. Purification and characterization of pancreatic elastase from Atlantic cod (*Gadus morhua*), **Comp. Biochem. Physiol.**, B, 97, 775-782, 1990.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste, **Process Biochem.**, v. 36, p. 809-812, 2001.
- GOMEZ, G.; GUZMAN, R. e CHACON, R. Algunos aspectos de la biología reproductiva y poblacional del torroto, *Genyatremus luteus*, (Bloch, 1797) (Pisces: Haemulidae) en el golfo de Paria, Venezuela, **Zootecnia Trop.** [online]. 2002, vol.20, n.2, pp. 223-234. ISSN 0798-7269.
- GUIZANI, N.; ROLLE, R. S.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Isolation, purification and characterisation of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Compt. Biochem. Physiol.**, v. 98(B), p. 517–521, 1991.
- GUMPU, M. B., SETHURAMAN, S., KRISHNAN, U. M., RAYAPPAN, J. B. B., A review on detection of heavy metals ions in water – An electrochemical approach, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.213, pp.515-533, 2015.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LARENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 15-32, 2002.
- KHANTAPHANT, S., & BENJAKUL, S. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chem.**, 120, 658–664,2010.
- KISHIMURA, H.; HAYASHI, K.; MIYASHITA, Y.; NONAMI, Y. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*), **Food Chem.**, v. 97, p. 65 – 70, 2006.
- KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., SIMPSON, B. K., & KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems, **Process Biochem.**, 40, 3061–3067, 2005.

KLOMKLAO, S., KISHIMURA, H., NONAMI, Y., & BENJAKUL, S. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chem.**, 115, 155–162, 2009.

LANARI, D.; FRANCI, C. Biogas production from solid wastes removed from fish farm effluents, **Aquat. Living Resourc.**, v. 11, p. 289–295, 1998.

LIU, D., LIANG, L., REGENSTEIN, J.M. & ZHOU, P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chem.**, 133, 1441 – 1448, 2012.

MARCUSCHI, M.; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F. M.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F. M.; SILVA, M. V.; CARVALHO JR., L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 396, p. 667–673, 2010.

MARQUES, C. V. V. C. O.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. N.; Biossensor amperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento, **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v.16, p.81-92, jan/dez, 2006.

MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process, **Quim. Nova**, vol. 31, n. 7, São Paulo, 2008.

NUNES, J. L. S.; MENDONÇA, M. A. Biodiversidade Marinha da ilha do Maranhão, São Luís, EDUFMA, 208p. 2013.

OLIVEIRA, I. R. W. Z., VIEIRA, I. C. Construction and analytical applications of biosensors using different immobilization procedures of vegetable peroxidase on chitosan matrix, **Quim. Nova**, vol. 29, n. 5, São Paulo, Set./Out., 2006.

OLIVEIRA, T. M. B. F. Biossensores enzimáticos para detecção e quantificação de carbamatos em amostras de alimentos, 131 f., Tese (Doutorado) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.

OLIVEIRA-NETO, G. C.; GODINHO-FILHO, M.; VENDRAMETTO, M.; GANGA, G. M. D.; NAAS, I. A.; Governança corporativa voltada a produção mais limpa: Influência dos stakeholders, **Gest. Prod.** [online]. vol.22, no.1, São Carlos, Jan./Mar. 2015.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece), **Environ. Int.**, v. 30, p. 357–362, 2004.

PREGO, R.; COBELO-GARCIA, A. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula), **Environ. Pollut.**, v. 121, p. 425–452, 2003.

ROSATTO, S. S., FREIRE, R. S., DURAN, N., KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental, **Quim. Nova**, vol. 24, n. 1, São Paulo, Jan./Fev., 2001.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents, **Wast. Managem.**, v. 26, p. 1092–1098, 2006.

SILVA, J. F.; ESPÓSITO, T. S.; MARCUCCHI, M.; RIBEIRO, K.; CAVALLI, R. O.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the Silver mojarra (*Diapterus rhombeus*), **Food Chem.**, n. 129, p. 777-782, 2011.

SILVA, J. S.; Biossensor amperométrico a base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares, 82 p., Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

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 Quim.**, v.36, n 2, 2011.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. e KUBOTA, L. T. Enzymeless Biosensors: Uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos, **Quim. Nova**, vol. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.

SOUZA, A. A. G., AMARAL, I. P. G., ESPÍRITO SANTO, A. R., CARVALHO JR, L. B., & BEZERRA, R. S. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chem.**, 100, 1429–1434, 2007.

SYSHCHYK, O., SKRYSHEVSKY, V. A., SOLDATKIN, O. O., SOLDATKIN, A. P., Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals, **Biosensors and Bioelectrtonics**, v.66, pp.89-94, 2015.

WANDERLEY, M. C. A., DUARTE NETO, J. M. W., LIMA FILHO, J. L., TEIXEIRA, J. A. C., FIGUEIREDO PORTO, A. L. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review, **Braz. J. Microbiol.**, vol. 48, n.1, São Paulo, Jan./Mar. 2017.

YAO, X., ZHANG, J., TIAN, L., GUO, J. The effect of heavy metal contamination on the bacterial community structure at Jiaozhou Bay, China, **Braz. J. Microbiol.**, vol.48, no.1, São Paulo, Jan./Mar. 2017.

**Biossensor amperométrico à base de tripsina extraída de *Genyatrems luteus* para
detecção de metais**

Isabela Guterres Pinto PAULO

A ser submetido à ANALYTICA CHIMICA ACTA

Normas no ANEXO

Biossensor amperométrico à base de tripsina extraída de *Genyatremus luteus* para detecção de metais

Isabela Guterres Pinto PAULO

Resumo: Metais são poluentes ambientais de ampla ocorrência em todo o mundo. Devido à sua periculosidade, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis de detecção. Neste trabalho, foi construído um biossensor mediante imobilização de uma fração rica em tripsina (FRT) extraída dos cecos pilóricos do *Genyatremus luteus* no eletrodo de trabalho de um sensor serigrafado. Foram realizados ensaios com a FRT livre em solução e imobilizada em sensor, de forma a verificar sua atividade. Após otimização das condições operacionais, tais como concentração do substrato, pH do meio, tipo de imobilização enzimática, entre outras, o biossensor foi caracterizado mediante voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria, tendo sido em seguida determinadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, precisão, sensibilidade e exatidão. No estudo cinético, foi observado um aumento crescente na atividade da tripsina com a concentração do substrato, até estabilização em uma concentração média de $0,178 \text{ mmol.L}^{-1}$. Os resultados indicaram bom desempenho para a FRT de *G. luteus* com relação à linearidade (para os metais), à repetibilidade (CV médio de $15,61\% \pm 2,0\%$ entre intramedidas) e à sensibilidade (com limites de detecção de 0,029, 0,025 e $17,6 \mu\text{.L}^{-1}$, para os metais Hg, Fe e Zn, respectivamente). Os resultados evidenciaram que a FRT extraída de *G. luteus* pode efetivamente ser empregada na obtenção de biossensores altamente sensíveis e reprodutíveis voltados para a detecção/quantificação de metais no meio aquático.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, aproveitamento de resíduos, serinoprotease, Haemulidae.

1. INTRODUÇÃO

A expansão da indústria e a popularização de produtos químicos tem ocasionado efeitos nocivos ao ecossistema aquático e ameaças a saúde humana, bem como, a saúde dos animais. Os ambientes aquáticos sofrem danos constantes devido à contaminação da água por despejos de produtos tóxicos (GAO et al, 2017).

Os metais pesados (MPs), muito presentes nestes efluentes, interferem nas vias bioquímicas através da interação com enzimas e proteínas, tendo capacidade de alterar mecanismos de reparação (PRABHAKAR et al, 2016). Quando encontrados em grandes concentrações no meio, os MPs acumulam-se nos diferentes organismos aquáticos, afetando seu crescimento e seus tecidos, deste modo, esses organismos podem ser utilizados como biomonitores de poluição ambiental (HOMAEI, 2017).

Algumas técnicas proporcionam análises da toxicidade e avaliação segura da água, porém ainda são limitadas, no que tange a trabalhos de monitoramentos da poluição aquática, que muitas das vezes exigem respostas rápidas e seguras. Um método alternativo e rápido de detecção de contaminantes é o biossensor, que possui mérito de detecção em linha, resposta rápida, baixo custo, não sendo afetado pela turbidez da água (GAO et al, 2017; STEPURSKA et al, 2015) e apresenta ainda facilidade de uso em monitoramento em tempo real (PRABHAKAR et al, 2016).

Os sensores eletroquímicos têm como princípio básico a reação eletrocatalítica entre eletrodos com os analitos presentes nas amostras, sendo o biossensor um dispositivo analítico que opera com interações biomoleculares para detectar alterações bioquímicas (BISWAS et al, 2017).

Os biossensores dependem de características da arquitetura interfacial, onde as biomoléculas devem ser imobilizadas para seu melhor desempenho, por meio de processos que garantam a manutenção da atividade biológica e a acessibilidade aos locais ativos (PICCININI et al, 2017). A imobilização da enzima ocasiona efeitos protetores para a estrutura enzimática como proteção contra perda de atividade por inibição ou distorção enzimática, inativação das enzimas e controle do pH (BISWAS et al, 2017).

Os biossensores mais usados têm sido os enzimáticos. A atividade enzimática é função direta das estruturas terciária e quaternária da enzima. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima, como aquecimento, alteração do pH do meio e outros, modifica também a estrutura do sítio ativo, diminuindo suas propriedades catalíticas (MELO, 2008;

LEHNINGER, 1989). A maioria dos trabalhos com biossensores enzimáticos utiliza a enzima acetilcolinesterase como material de biorreconhecimento.

No presente artigo, relatou-se pela primeira vez a utilização de uma fração rica em tripsina (FRT) do peixe *Genyatremus luteus* para imobilização desta em sensores eletroquímicos. Objetivou-se, assim, estudar a inibição da enzima em presença de diferentes metais. Espera-se que os resultados deste trabalho forneçam base sólida para futuras investigações e trabalhos de monitoramento *in situ*.

2. METODOLOGIA

2.1. Soluções e Reagentes

Foram utilizados os reagentes glutaraldeído (Fluka Chemie, Basel, Suíça), hidroxietilcelulose (HEC) (Fluka Chemie), soro albumina bovina (BSA) (Biochemical BDH Lim, Poole, Inglaterra), grafite ultrapuro (Sigma-Aldrich, Brasil), mediador Meldola's Blue com Sal de Reinech (Aldrich Co, Steinheim, Alemanha), tripsina de pâncreas suíno (Sigma Aldrich, 99,9% de pureza), tris (hidroximetil) Aminometano (Sigma Aldrich, Brasil), BapNa (N α -Benzoyl-DL-arginine 4 nitroanilide hydrochloride) (Sigma Aldrich, Brasil), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, Brasil) e extrato enzimático concentrado de tripsina de *Genyatremus luteus* (extraído por semipurificação no BIOAQUA/UFMA).

A solução tampão Tris-HCl (0,1 mol.L⁻¹, pH 8,0) foi preparada a partir da mistura de Tris 0,1 mol.L⁻¹ e Ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹. A solução do substrato específico (BapNa) foi diluída diretamente em DMSO para concentração de 8 mmolL⁻¹. A solução estoque da enzima tripsina de pâncreas suíno foi preparada em partes de 1:10 com dissolução em *ependorf* de 1,5 mL em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0 e armazenada em refrigerador a temperatura inferior a 10 °C.

2.2. Instrumentação

As medidas espectrofotométricas, para determinação da atividade enzimática e estudo cinético foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vís (Biospectro SSP-220, Madison, EUA), e as medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema potenciostato/galvanostato (Micro-AUTOLAB Tipo III, Methrom).

2.3. Aquisição das espécimes

As espécimes da espécie *Genyatrems luteus* foram adquiridas junto a pescadores da Baía de São José no município de São José de Ribamar, MA e armazenadas em gelo na proporção de 1:1. Após foram transportadas ao Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (BIOAQUA/ UFMA) para o procedimento de extração enzimática a partir dos cecos pilóricos.

2.4. Obtenção da Fração Rica em Tripsina (FRT)

Para a obtenção da fração rica em tripsina foram utilizadas etapas do processo de purificação descrito por BEZERRA et al (2001). O procedimento de extração enzimática foi realizado a partir da maceração e homogeneização dos cecos pilóricos em homogeneizador de tecidos (IKA RW 20 DIGITAL, 45 rpm), na concentração de 40 mg (m/v) de tecido em solução Tris-HCl 0,01mol.L⁻¹, pH 8,0 formando assim, o extrato bruto (EB).

A partir do EB foram realizadas as etapas de semipurificação: a primeira, tratamento térmico do EB, que seleciona enzimas termoestáveis. O EB foi levado a banho de imersão térmica por 30 minutos a 45 °C e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm durante 25 minutos à 4 °C formando o extrato bruto aquecido (EBA). O sobrenadante do EBA foi recolhido para a etapa seguinte e o precipitado, descartado.

Na segunda etapa, o EBA foi submetido a fracionamento salino, precipitando as proteínas com o reagente sulfato de amônio puro, com saturação em graus de 0-40% (fração 1 – F1) e 40-80% (fração 2 – F2). O sal foi adicionado sob agitação lenta em banho de gelo. Com a total dissolução do sal o EBA foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido para a segunda precipitação no grau de saturação de 40-80% e o precipitado foi ressuscitado com Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹, pH 8,0, obtendo-se a F1. O processo de adição do sal e centrifugação se repetiu com o sobrenadante da etapa anterior e novamente o precipitado foi ressuscitado com Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹ pH 8,0 para obtenção da F2. As frações foram dialisadas em Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹, pH 8,0 sob refrigeração durante 16 horas, com troca após 6 horas sob agitação lenta. Após diálise foram realizados testes de atividade com substrato específico para tripsina em todas as frações.

2.5. Estudo cinético da Atividade da Tripsina

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a metodologia de SOUZA et al (2007) adaptada. Em uma cubeta de plástico de 1ml foram misturados 200 µL da solução da

tripsina (atividade específica =3,86 U), 550 μL de solução tampão Tris-HCl pH 8,0 e 50 μL de solução do substrato específico BapNa 8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ totalizando volume final de 800 μL . A reação catalisada pela enzima em contato com o substrato libera uma substância denominada p-nitroanilida que apresenta coloração amarelada e pode ser monitorada pela medida da absorbância a 405nm após 5 min de reação.

Para determinação do controle foi utilizado o branco, onde as medidas espectrofotométricas, realizadas em triplicata, foram feitas sem a presença da enzima. Para o estudo cinético foi empregada a metodologia de Souza et al (2007) adaptada, onde foram combinados 7 tubos com diferentes concentrações de substrato e aferida a absorbância à 405nm (em triplicata) após quinze minutos de reação. A Abs_{405} foi calculada a partir da diferença entre as médias das absorbâncias da enzima (Abs_{SE}) e do branco (Abs_{B}).

2.6. Construção do Biossensor

Os sensores utilizados foram do tipo serigrafado à base de PVC, contendo três eletrodos: de referência (Ag/AgCl), auxiliar (grafite) e de trabalho, na qual foi incorporado o mediador Meldola's Blue combinado com Sal de Reinecke (MBRS), o procedimento de preparo do MBRS foi previamente descrito por LIMA et al (2007).

Os biossensores foram preparados a partir da imobilização em sensor serigrafado, com pasta contendo a FRT, hidroxiacetilcelulose, grafite ultrapuro, BSA(soro albumina bovino) e glutaraldeído, todos homogeneizados em vortex. A pasta homogeneizada foi depositada com pipeta de 0,2 μL na região do eletrodo de trabalho do sensor. Após imobilização os biossensores foram acondicionados à 4°C por 48 horas, tendo sido então conectados ao Potenciostato a partir de conectores elétricos apropriados, a fim de serem empregados nas medidas eletroquímicas.



Figura 1: Biossensor de FRT aplicado em potenciostato e imerso em solução previamente preparada.

2.7. Medidas Eletroquímicas, Otimização do pH e Ensaio de Inibição Enzimática

Inicialmente, foi determinada a melhor concentração do substrato para operação do biossensor no intervalo de tempo de 60 s em potencial de trabalho fixo em 100 mV. O objetivo desta etapa foi determinar a concentração de substrato ocasionaria uma corrente mais estável. As concentrações variaram entre 2,0 e 24,0 mmol.L⁻¹.

O estudo da enzima livre em solução foi realizado para verificação e identificação em potenciostato da ocorrência de reação enzimática utilizando enzima livre em presença do seu substrato específico, no meio reacional tamponado no pH ótimo. Foram utilizados sensores sem e com mediador eletroquímico (MBRS), tendo sido os mesmos mergulhados em solução previamente preparada contendo enzima/substrato/tampão e submetidos a leituras (em triplicata) mediante as técnicas de Cronoamperometria (CA) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).

Foi feito um estudo para otimização do pH, mediante verificação da resposta cronoamperométrica, em presença da enzima livre e do seu substrato em solução, sendo ambos em concentrações fixas, e variando-se apenas o pH do meio.

Depois de fixados os parâmetros cinéticos, a concentração do substrato e o pH do meio, o sensor foi submetido à verificação da inibição enzimática (redução da corrente) por contato com o inibidor. Assim, os sensores foram incubados nas soluções previamente preparadas contendo também os metais Hg, Zn e Fe. Brevemente, um sensor que não continha a enzima imobilizada foi mergulhado em solução contendo enzima livre e o tampão Tris-HCl pH 8,0, tendo sido em seguida adicionado o substrato e monitorado o sinal cronoamperométrico. A corrente inicial (I_0) foi registrada após estabilização. Em seguida, este mesmo sensor foi lavado com tampão Tris-HCl e incubado em uma solução contendo os metais (inibidores) durante 10 min, sendo então novamente lavado e a corrente medida em presença da enzima livre e do substrato. A corrente final (I) foi registrada após estabilização do sinal. Foram realizadas leituras (em triplicata) por VPD e CA, na ausência e na presença dos inibidores.

Ensaio de inibição foram também realizados com a enzima imobilizada no eletrodo de trabalho do biossensor. Em todos os ensaios de inibição, com a enzima livre ou imobilizada, a concentração dos metais foi de 1 mg.L⁻¹. A percentagem de inibição foi determinada pela redução da corrente, conforme a equação:

$$IR(\%) = [1 - (I / I_0)] \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

onde, IR representa a inibição relativa, I_0 a intensidade de corrente antes da inibição enzimática e I a intensidade de corrente após inibição enzimática.

2.8. Sensibilidade, Exatidão e Precisão do Biossensor

A sensibilidade dos biossensores foi determinada pelo cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos metais pesados selecionados para estudo. Para isso, foram construídas curvas analíticas, de inibição relativa(%) versus concentração dos metais (mg.L^{-1}), com concentrações crescentes dos metais e sucessivas medidas de inibição, conforme item 2.7.

Para avaliação da exatidão, foram realizados ensaios de fortificação. Um certo volume de água deionizada foi fortificado com os MPs Hg, Zn e Fe em uma concentração final de 0,1 mg.L^{-1} . Após fortificação, as amostras permaneceram em repouso por 24 horas para acondicionamento. Em seguida, procedeu-se as medidas de corrente, utilizando-se os biossensores com enzimas imobilizadas, na presença e na ausência de cada um dos inibidores, de forma a se determinar a inibição relativa percentual (IR%), conforme metodologia no item 2.7. O valor de cada IR% individual foi plotado nas curvas de calibração de cada metal e a concentração encontrada foi comparada com a concentração real, de forma a se determinar o índice de recuperação do método.

Para verificação da repetitividade intramedidas de um dado biossensor contendo, no eletrodo de trabalho, o mediador MBRS e a enzima imobilizada, foi determinado o coeficiente de variação percentual (CV%) mediante 10 registros das intensidades de correntes geradas durante a reação enzima-substrato com o mesmo biossensor. Entre cada medida, o mesmo biossensor era lavado e procedida a nova reação enzimática. Também foram tomadas medidas de corrente com 10 biossensores diferentes, preparados da mesma forma, de forma a se calcular o coeficiente de variação intermedidas.

2.9. Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram inteiramente casualizados. Foram feitas comparações de médias mediante uso do teste t de *Student* não-pareado, com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética Enzimática da Tripsina e da FRT

A cinética enzimática tem como principal objetivo estudar a velocidade da reação e as condições que a afetam. Porém, esta não está associada apenas ao tempo, mas a concentração da enzima, concentração do substrato, pH do ensaio, temperatura e concentração de ativadores e inibidores (LIMA et al, 2007).

A tripsina comercial foi utilizada como padrão para identificação da atividade enzimática e sinal analítico nos sensores, proporcionando a validação dos ensaios posteriores com a FRT.

Como esperado, o valor de atividade enzimática obtido para a FRT foi inferior ao da tripsina comercial, isto provavelmente ocorreu devido a FRT tratar-se de uma fração parcialmente purificada, podendo conter alguns interferentes que afetam a atividade enzimática. No entanto, a menor atividade não a torna inadequada, uma vez que, processo de purificação é caro e demorado, e o uso de uma fração semipurificada, diminuiria o custo final para construção do biossensor, além de ter-se obtido resultado satisfatório para a FRT..

Existem fatores que afetam as reações catalisadas por enzimas, atuando no mecanismo cinético destas, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, isso se dá, pela modificação na estrutura dos sítios ativos das diferentes enzimas e conseqüentemente, alteração da atividade catalítica entre eles na presença ou ausência de ativadores.

O estudo cinético conduzido com a tripsina comercial e a FRT demonstrou que, até um determinado ponto a atividade enzimática cresceu proporcionalmente à concentração do substrato (Figura 2), a elevada pureza da enzima comercial, tornou mais rápida a reação com o substrato específico. Já a velocidade de reação usando a FRT foi relativamente alta e crescente até $[S]=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. A partir daí em todos os demais pontos a quantidade de produto da reação não se alterou significativamente. Logo, a $[S] = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi fixada como concentração ótima do substrato.

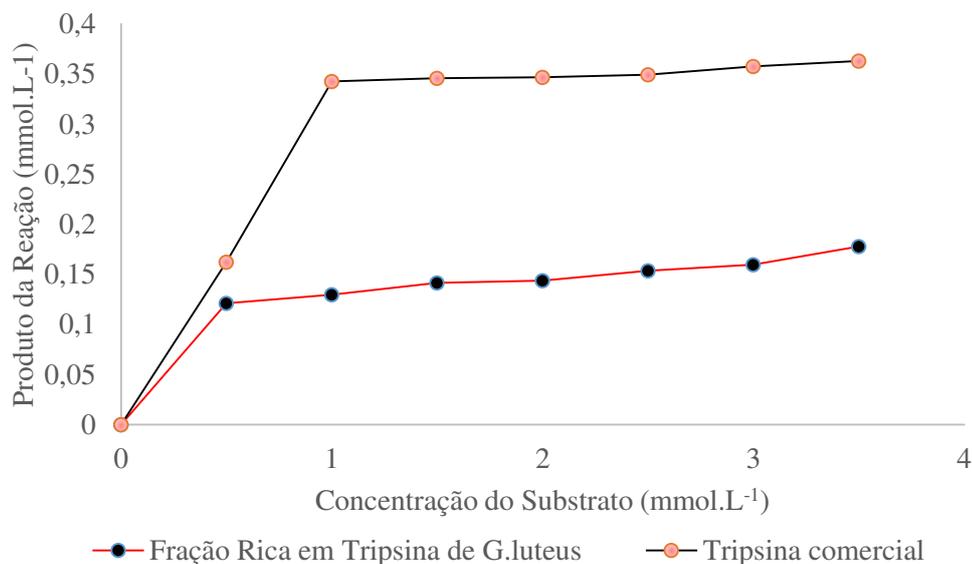


Figura 2: Cinéticas de reação entre a FRT (*G.luteus*) e a Tripsina comercial (Tripsina de pâncreas suíno/Sigma Aldrich) livres em solução.

De fato, os valores das absorvâncias obtidas cresceram proporcionalmente à concentração do substrato, assim como a concentração do produto até um determinado ponto. Tal efeito está de acordo com LEHNINGER (1989), que afirma que a velocidade da reação enzimática cresce de forma proporcional à concentração do substrato até um ponto no qual a velocidade não se modificará muito, mesmo que sejam adicionadas quantidades crescentes de substrato havendo, assim, um efeito de saturação (Tabela 1). Tal efeito acontece quando todas as moléculas de enzimas têm seus sítios ativos encaixados ao substrato (ligação conhecido com chave-fechadura).

Tabela 1: Cinética de reação para a tripsina livre em contato com seu substrato, utilizando-se a fração rica em tripsina (FRT) obtida do peixe *G. luteus*

Tubos	Conc. Substrato mmol.L⁻¹	Abs₄₀₅	Produto formado (mmol.L⁻¹)	Velocidade da reação (mmol.L⁻¹/min)
1	0,5	1,101	0,121	0,0078
2	1,0	1,178	0,130	0,0079
3	1,5	1,286	0,141	0,0089
4	2,0	1,306	0,144	0,0090
5	2,5	1,396	0,153	0,0086
6	3,0	1,452	0,160	0,0086
7	3,5	1,616	0,178	0,0092

Com esse estudo, foi possível observar que a atividade da enzima, mesmo na FRT apresentou níveis aceitáveis para imobilização no sensor. Em uma avaliação prévia, poder-se-ia afirmar que a redução da atividade em função da presença de impurezas na FRT não afetaria a resposta de um biossensor contendo, ao invés de uma enzima comercial, uma porção dessa fração. Isso reduziria em muito os custos na fabricação do biossensor.

3.2. Otimização do pH do Meio

Para avaliação do efeito do pH sobre a atividade da FRT estudou-se por cronoamperometria a atividade enzimática na faixa de pH de 7,0 a 9,0, devido ao fato de serem proteases alcalinas. Adicionalmente, OLIVEIRA et al (2014) verificaram que a tripsina apresenta inibição ou instabilidade em pH abaixo de 5,0 e acima de 11,0; a partir disto, pode ser observado em qual pH a resposta permaneceu mais estável e assim verificar as melhores condições de uso da fração rica em tripsina.

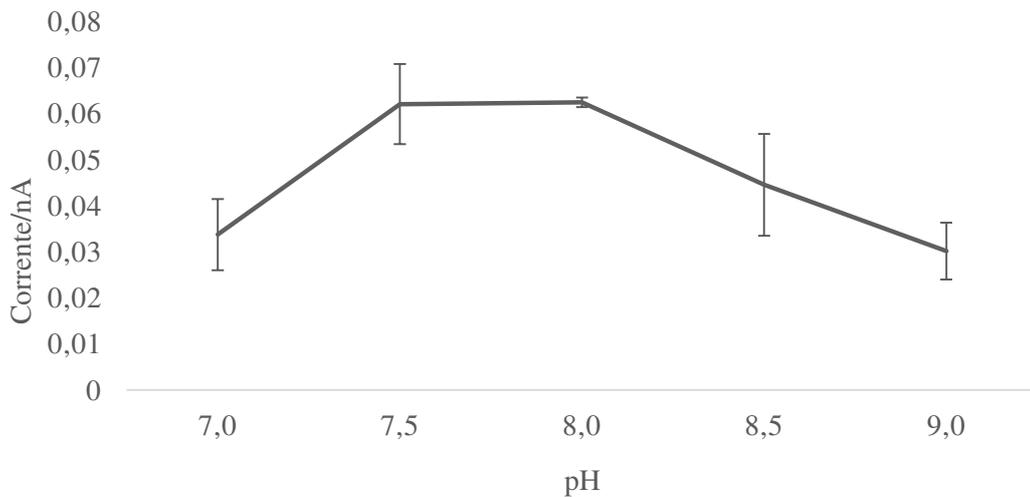


Figura 3: Respostas cronoamperométricas do biossensor à base da FRT obtida de cecos pilóricos de peixe *G. luteus* (imobilizada no eletrodo de trabalho) em meios reacionais com diferentes valores de pH. Condições operacionais: [substrato] = BapNa 8mmol; quantidade de FRT imobilizada: 3,86 U/mg/eletrodo; potencial de trabalho = 250,0 mV; mediador eletroquímico = MBRS.

A intensidade da corrente avaliada por cronoamperometria a um potencial de trabalho fixo de 150 mV foi maior entre valores de pH 7,5 e 8,0 (Figura 3). Esses resultados corroboram com MELO (2008) que afirma que em meio muito básico é observado redução de corrente ou desnaturação da enzima.

Assim, fixou-se o valor de pH 8,0, esse resultado corroborou com os encontrados nos trabalhos de Kishimura et al (2007), Bougatef et al (2007), Kishimura et al (2010), Kurtovic et al (2006) e Castillo-Yanez et al (2005) encontraram pH ótimo 8,0 para a tripsina de peixe.

3.3. O Mediador Eletroquímico e o Potencial de Trabalho

O potencial de trabalho é uma função do mediador; assim, biossensores contendo mediadores são menos susceptíveis a interferentes, pois o potencial de oxidação aplicado é menor. Os mediadores são incorporados à superfície do eletrodo, na mesma matriz que a enzima que será inibida, ou mesmo em uma matriz diferente, objetivando uma rápida transferência eletrônica (PEREIRA et al, 2002).

O potencial de trabalho relativamente baixo (150 mV) foi proporcionado pelo uso do mediador MBRS, tendo sido extremamente favorável, por reduzir as interferências eletroquímicas que possam estar contidas na solução (NUNES et al, 2014; MENDONÇA et al, 2012).

Neste trabalho, o uso do mediador MBRS resultou em potenciais mais baixos em relação a sensores sem mediador, tanto para a enzima comercial quanto para a FRT (Figura 4). Resultado esperado, tendo em vista que o mediador auxilia na transferência de elétrons e reduz o potencial de trabalho, mitigando as interferências eletroquímicas (MARQUES et al, 2006; MARQUES e YAMANAKA, 2008).

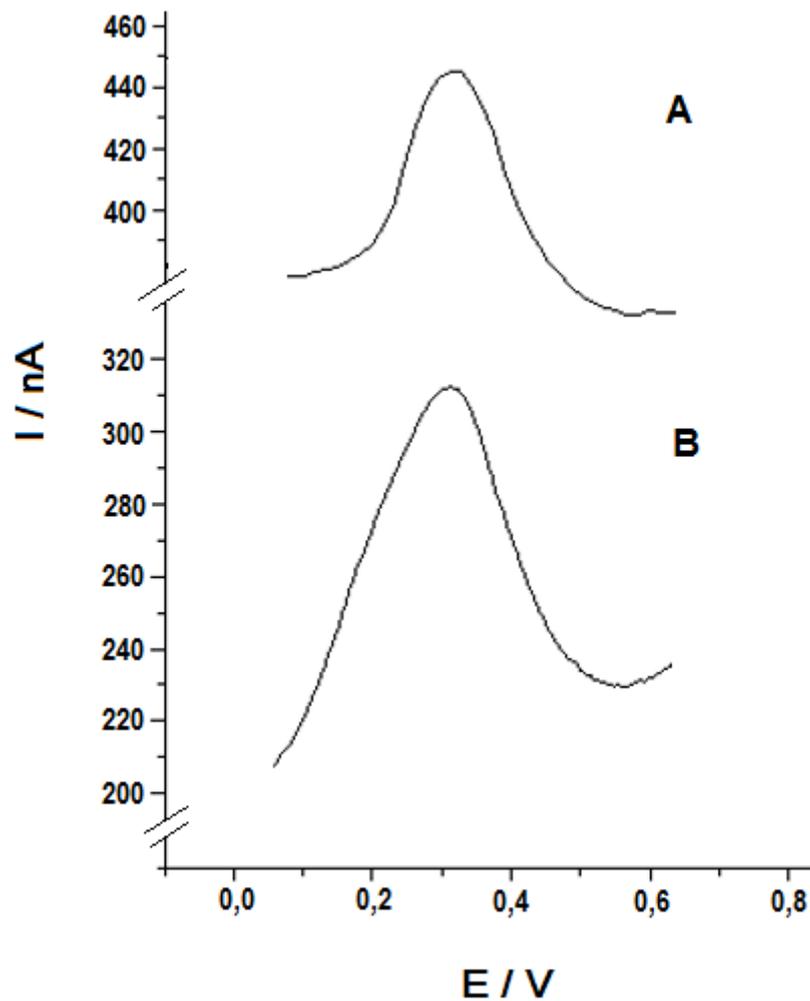


Figura 4: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos durante as reações enzima-substrato empregando biossensor (A) tripsina comercial e (B) FRT, juntamente com o mediador MBRS. Condições operacionais: [substrato] = BapNa 8mmol.L; tempo de estabilização: 3s; tempo de modulação: 0,05s; intervalo entre medidas: 0,1s; amplitude da modulação: 0,05055V. Velocidade de varredura 25mV s⁻¹.

De acordo com a Figura 4, observa-se que os testes utilizando a FRT immobilizada na superfície de trabalho dos eletrodos impressos resultaram em menores valores de corrente (pico 315 nA) que aqueles encontrados quando utilizada a enzima tripsina comercial (445 nA), sob mesmas condições experimentais. Vale ressaltar que, a intensidade de corrente de partida mais baixa, como a encontrada no biossensor à base de FRT, é ideal para os ensaios de inibição, quando o foco é a detecção de traços de metais.

Quando a intensidade de corrente é elevada, uma pequena diminuição da corrente, provocada pela leve inibição enzimática em função da presença do inibidor em concentrações muito baixas, pode ser confundida com o ruído de fundo. Não obstante a FRT extraída do peixe não tenha sido submetida a um processo de completa purificação, o que inclusive tornou o produto final menos oneroso, esta mostrou-se adequada para a construção do biossensor enzimático voltado para detecção de metais.

Vale mencionar ainda que o peixe em estudo é amplamente utilizado na alimentação humana na região Nordeste, sendo uma fonte de baixo custo para extração da tripsina, o que torna o processo de construção dos biossensores menos oneroso, em comparação àqueles construídos com a tripsina comercial. Em uma análise econômica básica, considerando todos os reagentes empregados, um único biossensor à base da enzima tripsina comercial pode chegar a U\$ 2,50 (dois dólares e meio), enquanto que a substituição da enzima comercial pela FRT reduz o valor para U\$ 1,80 (um dólar e oitenta centavos).

Monitorando-se a corrente gerada em um tempo de 1 min durante a reação enzimática foi possível obter bons sinais analíticos e praticamente nenhum ruído com o potencial fixo de 150 mV (Figura 5).

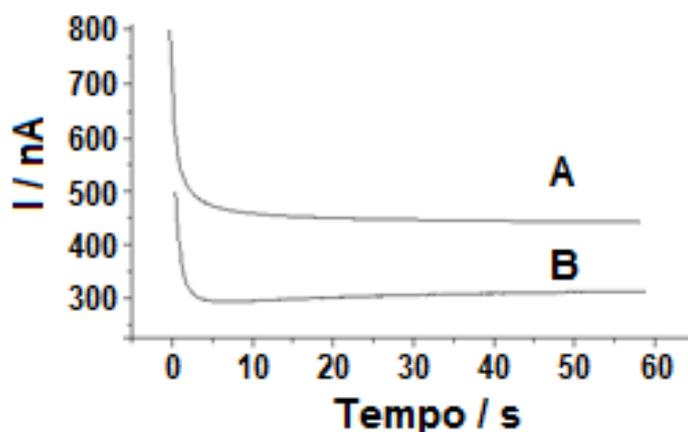


Figura 5: Cronoamperogramas obtidos durante a reação enzima-substrato, empregando biossensores (A) Tripsina comercial e (B) FRT. Condições operacionais: mediador = MBRS; [substrato] = BapNa 8mmol; potencial de trabalho = 150 mV.

3.4. Testes de inibição com Metais

Foram testados íons Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^+ e Al^{3+} previamente em espectrofotômetro para identificação da sensibilidade da enzima (Tabela 2) na fração. No entanto os elementos Fe, Hg e Zn provocaram redução de 5,81%, 8,17% e 17,3%, respectivamente, na atividade da tripsina. Como, é necessário reduções prévias maiores que 5% para que seja aplicado em biossensor para resultados satisfatórios da inibição relativa (%), os íons Al e Cu não foram testados em biossensor no potenciostato. Devido a isto, metais Fe, Hg e Zn foram utilizados para otimização do biossensor, baseado no princípio da inibição enzimática.

Tabela 1: Comparativo da sensibilidade da tripsina de diferentes espécies tropicais aos metais testados nesta pesquisa: Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Fe^{2+} . *Este trabalho.

Espécie	[S] ₁ mmol.L ⁻¹	Propriedade de ótima		Metais					Referência
		pH	°C	Al^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Fe^{2+}	
<i>Diapterus rhombeus</i>	1	8,5	55	66,9	28,7	69,2	46,8	79,5	Silva et al (2011) ¹
<i>Arapaimas gigas</i>	1	9,0	65	9,00	19,9	49,8	19,9	30,8	Freitas et al (2012) ¹
<i>Caranx hippos</i>	1	8,0	50	0,42	17,7	23,8	44,9	—	Costa et al (2013) ¹
<i>Genyatremus luteus</i>	1	8,0	35	4,54	17,3	2,60	8,17	5,81	*

A inibição da tripsina presente na FRT na presença dos metais foi determinada por cronoamperometria, computando-se o decréscimo da corrente, após incubação do biossensor nas soluções previamente preparadas contendo os inibidores separadamente. Os testes foram realizados com a tripsina comercial e a FRT, estando ambos os materiais enzimáticos livres ou imobilizadas no eletrodo de trabalho, na ausência e na presença do mediador MBRS. Os resultados de inibição relativa são mostrados na Figura 6.

Observou-se um percentual alto de inibição da tripsina e da fração rica em tripsina sob ação dos metais em concentração de 0,1 mg.L⁻¹.

Os íons de metais e metais pesados são encontrados comumente no ecossistema aquático por meio de despejos naturais ou antropogênicos, causando prejuízo a comunidades da biota aquática. Esses poluentes lançados na coluna d'água são transportados e acumulados nos fundos subaquáticos, que tem capacidade de liberar esses contaminantes.

A descarga de metais no ambiente pode causar alterações nos parâmetros físico-químicos da água, como por exemplo: pH, potencial redox e concentração de oxigênio (SILVA et al, 2017).

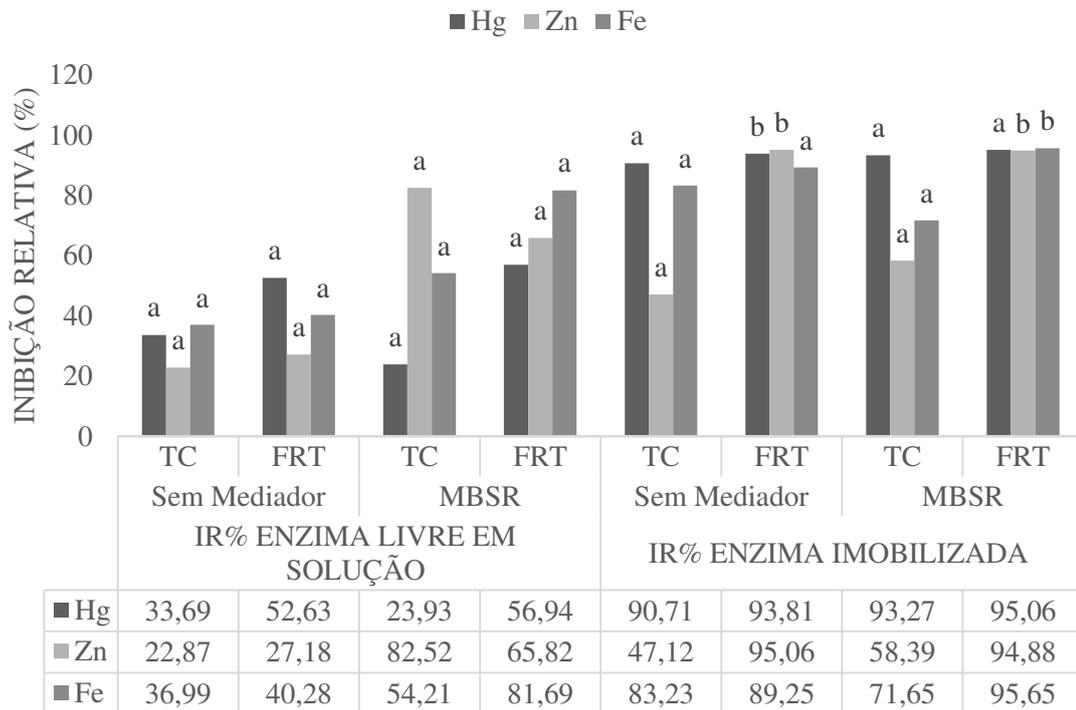


Figura 6: Inibição relativa percentual (IR %) da tripsina comercial (TC) e da fração rica em tripsina (FRT) devido à presença de metais pesados, empregando-se o material enzimático livre em solução ou imobilizado no eletrodo de trabalho do sensor serigrafado, com ou sem o mediador Meldola's Blue e Sal de Reinecke (MBRS). (Letras iguais em colunas referentes aos metais Hg, Zn e Fe nas categorias Sem Mediador e MBRS para as enzimas TC e FRT não diferem estatisticamente entre si pelo teste T de Student, $p < 0,05$).

KIMURA et al (2017) em seu trabalho sobre biomassa seca de macrófito amazônico absorvente de metais pesados Zn e Cu, mostraram que a *Papalun repens* absorve metais pesados em suas folhas e raiz, onde as folhas absorvem em concentrações maiores que 37,07% para o Zn; deste modo podemos perceber que os metais pesados quando em contato com o ambiente aquático se acumulam na biota aquática podendo causar prejuízos em todos os níveis tróficos.

ZAPATA et al (2017) analisaram a bioacumulação de metais pesados nos músculos, fígado e rins de *Oncorhynchus mykiss* em comparação com a água do meio. Os autores detectaram por espectrofotometria, que as concentrações de Cu, Zn, Fe e Pb excederam os limites máximos permitidos pela União Europeia tanto nos órgãos quanto na água, comprovando assim que esses metais se acumulam proporcionalmente em ambos.

Nos testes com a enzima comercial livre em solução, a inibição foi de 23,93%; 82,52% e 54,21% para os íons Hg, Zn e Fe, respectivamente, com o mediador MBRS. Enquanto que para a enzima comercial imobilizada a inibição foi muito maior para os íons Hg e Fe, totalizando 93,27% e 71,65%; respectivamente. Com isso, foi possível verificar cronoamperometricamente

que houve elevada redução do sinal de corrente gerada durante a reação catalisada pela tripsina livre em solução na presença dos íons Hg e Fe.

A inibição enzimática empregando a FRT imobilizada foi 93,81%, 95,06% e 89,25%, respectivamente. Resultados maiores que os encontrados para os mesmos íons com a enzima comercial, ambos empregando sensores isentos de mediador.

Adicionalmente, quando se empregou a FRT imobilizada em sensor contendo o compósito MBRS como mediador eletroquímico, a inibição foi 95,06%, 94,88% e 95,65% respectivamente, para os íons Hg, Zn e Fe. Em comparação com a enzima comercial purificada, foram obtidos resultados maiores. Assim, a fração rica em tripsina, apesar de não ter sido totalmente purificada, pode ser considerada uma alternativa viável para a construção dos biossensores voltados para a detecção destes poluentes, pois foi possível obter resultados satisfatórios.

Os teores de ferro dissolvido, mercúrio total e zinco total para águas destinadas ao consumo humano, águas de classe 1, de acordo com a Resolução CONAMA N° 357/2005 são de 0,3 mg/L; 0,0002mg/L e 0,09 mg/L, respectivamente. Deste modo, os limites de detecção e quantificação (Tabela 3) que variaram entre 10^{-4} e 0,1mg/L encontram-se dentro dos teores permitidos pela legislação brasileira. Como, o intuito do biossensor é identificar o contaminante no meio aquático mesmo em concentrações abaixo do permitido, será possível detectá-los.

Tabela 3: Limites de detecção e quantificação obtidos pelo biossensor de FRT.

Inibidor	CONAMA (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Mercúrio (Hg)	0,0002	0,029	0,097
Zinco (Zn)	0,09	0,176	0,587
Ferro (Fe ⁺)	0,3	0,025	0,085

Para a comprovação da exatidão e eficácia do biossensor, empregando-se a FRT imobilizada, foram realizados ensaios de recuperação, mediante fortificação de amostras, a partir da diluição de metais em água deionizada (Tabela 4). Quando em contato com o ambiente aquático contaminantes como metais pesados tornam-se diluídos em comparação as concentrações descartadas no meio. Deste modo, foi possível avaliar os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, por essa vertente. Tendo em vista que os resultados encontrados para a recuperação foram menores que os resultados dos ensaios de inibição, podemos supor que a

concentração do metal em meio aquático define a inibição a ser detectada pelo biossensor proposto.

Tabela 4: Eficiência do método de detecção dos metais pesados empregando o biossensor amperométrico contendo a fração rica em tripsina (FRT) e o mediador eletroquímico Meldola's Blue-Sal de Reinecke (MBRS). Concentração molar dos inibidores: 0,01mM

Inibidor	Conc. Adicionada (mM)	Inibição Relativa (IR %)	Índice de Recuperação (%)
Mercúrio (Hg)	0,1	95,06	67,47
Zinco (Zn)	0,1	94,88	74,68
Ferro (Fe ⁻)	0,1	95,65	83,87

Em relação à precisão das unidades do biossensor, observou-se valores de coeficiente de variação de 15,61% para intramedidas, tal valor evidência a precisão do protótipo.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o biossensor apresentou bons resultados quando preparado mediante imobilização da fração rica em tripsina (FRT) de *Genyatreumus luteus* obtida a partir do processo de semipurificação.

Deste modo, a fração demonstrou ser uma alternativa para viabilização de biossensores para detecção dos metais estudados, visto que foram resultados satisfatórios de inibição na presença de íons metálicos, por ter sido obtido a partir do reaproveitamento de resíduos e da qual é uma fonte de baixo custo. Dado que biossensores enzimáticos são geralmente preparados com enzimas comercialmente purificadas, o que são extremamente caras.

Por conseguinte, a utilização da fração apresentou resultados acima do esperado, tornado o processo menos oneroso, o que facilitou o custo benefício, além de ter reduzido o tempo de elaboração e execução do mesmo.

REFERÊNCIAS

BISWAS, P., KAM, A. K., KALE, P. G., Biosensor for detection of dissolved chromium in potable water: A review, **Biosens. and Bioelectr.**, v. 94, pp. 589-604, 2017.

- BOUGATEF, A.; SOUISSI, N.; FAKHFAKH, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; NASRI, M., Purification and characterization of tripsyn from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chem., v.102, pp343-350, 2007.
- CASTILLO-YANEZ, F. J.; PACHECO-AGUILAR, R.; GARCIA-CARRENO, F. L.; TORO, M. A. N.; Isolation and characterization of tripsyn from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*, Comp. Biochem. Physiol., v. 140, pp. 91-98, 2005.
- GAO, G., FANG, D., YU, Y., WU, L., WANG, Y., ZHI, J., A double-mediator based whole cell electrochemical biosensor for acute biotoxicity assessment of wastewater, **Talanta**, v.167, pp. 208-216, 2017.
- GUMPU, M. B., SETHURAMAN, S., KRISHNAN, U. M., RAYAPPAN, J. B. B., A review on detection of heavy metals ions in water – An electrochemical approach, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.213, pp.515-533, 2015.
- HOMAEI, A., Immobilization of *Penaeus merguensis* alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metals detection, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.136, pp. 1-7, 2017.
- KIMURA, S. P. R.; SANTOS, R. R.; FONSECA, J. C. P.; SILVA, J. A.; SILVA, R. N. A.; MACEDO NETO, J. C.; EVANGELISTA NETO, J.; FREITAS, B. M.; PASCOALOTO, D.; Dry Biomass of the Amazonian Macrophyte Paspalum Repens for Evaluation as Adsorbent Material of Heavy Metals Zn and Cu, **Mat. Res.**, ahead of print Epub Nov 06, 2017
- KISHIMURA, H.; KOMKLAO, S.; NALINANON, S.; BENJAKUL, S. CHUN, B. S.; ADACHI, K.; Comparativy study on thermal stability of tripsyn from the pyloric ceca of threadfin hake (*Laemonema longipes*). J. Food Biochem., v.34, pp. 50-65, 2010.
- KISHIMURA, H.; TOKUDA, Y.; YABE, M.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; ANDO, S., Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegeli*) and elkorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): isolation and characterization. Food Chem., v. 100, pp. 1490-1495, 2007.
- KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; SIMPSON, B. K., Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsca*). Comp. Biochem. Physiol., v. 143, pp. 432-440, 2006.
- LEHNINGER, A. L. Princípios e Bioquímica, **Editora Savier**, 1989.
- LIMA, R. S.; NUNES, G. S.; NOGUER, T.; MARTY, J. L. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor, **Quim. Nova**, v. 30, No. 1, pp. 9-17, 2007.
- MARQUES, C. V. V. C. O.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção *screening* de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento, **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 16, p. 81-92, 2006.
- MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process, **Quim. Nova**, vol. 31, n. 7, São Paulo, 2008.
- MELO, É. E. C. D., NASCIMENTO, C. W. A. D., SANTOS, A. C. Q., & SILVA, A. S. D. Disponibilidade e fracionamento de Cd, Pb, Cu e Zn em função do pH e tempo de incubação com o solo. **Ciência e Agrotecnologia**. 2008.

- MENDONÇA, C. D.; VERBINNEN, R. T.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; Construção de biossensores à base da enzima acetilcolinesterase contendo macroalga de ambiente estuarino para detecção do agente anticolinesterase paration metílico, **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 19, n. especial, jul. 2012.
- NUNES, G. S.; LINS, J. A. P.; SILVA, F. G. S.; ARAÚJO, L. C.; SILVA, F. E. P. S.; MENDONÇA, C. D.; BADEA, M.; HAYAT, A.; MRTY, J. L. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem, **Chemosphere**, v. 111, pp. 623-630, 2014.
- PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.; Tendências em odificação de eletrodos amperometricos para aplicações eletroanalíticas, **Quim. Nova**, v. 25, No. 6, pp. 1012-1021, 2002.
- PICCININI, E., BLIEM, C., REINER-ROZMAN, C., BATTAGLINI, F., AZZARONI, O., KNOLL, W., Enzyme-polyelectrolyte multilayer assemblies on reduced graphene oxide field-effect transistors for biosensing applications, **Biosensors and Bioelectronics**, v.92, pp. 661-667, 2017.
- PRABHAKAR, D., PRASAD, D., VIDYARTHI, A. S., Heavy metals: Their impact on ecosystem and methods of detection, **Indian Journal of Environmental Protection**, v. 36, pp 751-766, 2016.
- SILVA, C. A. R.; FONSECA, E. M., GROTO, B. W., SOUZA, F. E.S., BATISTA NETO, J. A., Potentially mobile of heavy metals on the surface sediments in tropical hyper-saline and positive estuaries, **An. Acad. Bras. Ciênc.**, vol.89, no.4, Rio de Janeiro, 2017
- SILVA, J. S.; Biossensor amperométrico a base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares, 82 p., Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.
- 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 Quim.**, v.36, n 2, 2011.
- SOUTO, L. A. S. Desenvolvimento de biossensores amperometricos à base de acetilcolinesterase para detecção de microcistinas, 76 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química/CCET, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.
- STEPURSKA, K. V., SOLDATKIN, O. O., KUCHERENKO, I. S., ARKHYPOVA, V. M., DZYADEVYCH, S. V., SOLDATKIN, A. P., Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature, **Analytica Chimica Acta**, v.854, pp.161-168, 2015.
- SYSHCHYK, O., SKRYSHEVSKY, V. A., SOLDATKIN, O. O., SOLDATKIN, A. P., Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals, **Biosensors and Bioelectronics**, v.66, pp.89-94, 2015.
- ZAPATA, F. C. C., VILLANUEVA, M. C., ESQUIVEL, R. A. P., PAYANO, I. G. U., Bioaccumulation of heavy metals in *Oncorhynchus mykiss* for export at production centers in the Peruvian Central Highlands, *Rev. Ambient. Água*, vol.12, no.4, Taubaté, 2017.

ANEXO

GUIA PARA AUTORES – ANALYTICA CHIMICA ACTA

Estrutura do artigo

Subdivisão - **seções** **numeradas**
 Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas 1.1 (então 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração das seções). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não basta referir-se a 'o texto'. Qualquer subseção pode receber um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça uma base adequada, evitando uma pesquisa detalhada da literatura ou um resumo dos resultados.

Materiais e métodos

Os **métodos** experimentais devem ser descritos após o material introdutório. Descrições experimentais detalhadas devem ser restritas a uma seção do documento. Devem ser fornecidos detalhes suficientes para permitir que qualquer trabalhador experiente implemente os procedimentos descritos. As etapas processuais não devem ser numeradas.

Resultados **Os**
 resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de resultados e discussão geralmente é apropriada. Evite extensas citações e discussões de literatura publicada.

Conclusões

Isso deve incluir achados importantes da pesquisa, números de desempenho analítico quantitativo (se apropriado) e sua significância para matrizes de amostras reais.

Apêndices

Se houver mais de um apêndice, eles devem ser identificados como A, B, etc. As fórmulas e as equações nos apêndices devem receber numeração separada: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. ; em um apêndice posterior, Eq. (B.1) e assim por diante. Similarmente para tabelas e figuras: Tabela A.1; Fig. A.1, etc.

Informações essenciais sobre a página de título no início do arquivo do manuscrito.

- **Título do artigo.** Conciso e informativo. Os títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Não devem ser utilizadas abreviaturas e evitar fórmulas sempre que possível.
- **Nomes e afiliações de autores.** Onde o nome da família pode ser ambíguo (por exemplo, um nome duplo), indique isso claramente. Apresentar os endereços de afiliação dos autores (onde

o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra minúscula de sobrescrito imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

• ***Autor correspondente.*** Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as etapas de arbitragem e publicação, também pós-publicação. **Certifique-se de que os números de telefone (com país e código de área) sejam fornecidos além do endereço de e-mail e do endereço postal completo. Os detalhes de contato devem ser atualizados pelo autor correspondente.**

• ***Endereço atual / permanente.*** Se um autor se mudou uma vez que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o principal endereço de afiliação. Os números arábicos do Superscript são usados para essas notas de rodapé.

Resumo

Um **resumo** conciso e factual é obrigatório. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por este motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o (s) autor (es) e ano (s). Além disso, as abreviaturas não-padrão ou incomum devem ser evitadas, mas, se essenciais, elas devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Não devem ser utilizadas abreviaturas. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

Abreviações

Definir abreviaturas que não são padrão neste campo (as abreviaturas padrão podem ser visualizadas [aqui](#) em uma nota de rodapé para serem colocadas na primeira página do artigo. Essas abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas como mencionadas pela primeira vez, bem como na nota de rodapé. Garanta a consistência das abreviaturas em todo o artigo.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não as inclua na página de título, como nota de rodapé do título ou de outra forma. Liste aqui os indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda de linguagem, assistência de redação ou prova de leitura do artigo, etc.).

Formatação de fontes de financiamento

Lista **fontes de** financiamento desta forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelos Institutos Nacionais de Saúde [números de concessão xxxx, aaaa]; a Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [grant number zzzz]; e os Estados Unidos Institutos de Paz [concessão número aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de concessões e prêmios. Quando o financiamento é de uma subvenção em bloco ou outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Nomenclatura, abreviaturas e símbolos

Use L por litros. Sempre deixe um espaço entre as unidades e use as sobrescritas em vez de /. Por exemplo: use **mg mL⁻¹** e não **mg / ml**. Não use ppm ou ppb para indicar concentrações sólidas / líquidas.

Não use abreviaturas no título ou nas palavras-chave. Defina abreviaturas que não são padrão neste campo em sua primeira ocorrência no resumo e no texto principal. Garantir a consistência das abreviaturas durante o resto do manuscrito.

Em todos os outros casos, as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) devem ser seguidas, e deve ser dada atenção às recomendações da Divisão de Química Analítica na revista *Química pura e aplicada* (ver também o Compendium IUPAC de Nomenclatura Analítica, Regras Definitivas, 1987).

Fórmulas de matemática

Envie as equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Presente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use o solidus (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X / Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Os poderes de e são frequentemente mais convenientemente indicados pela exp. Número consecutivamente, quaisquer equações que devem ser exibidas separadamente do texto (se referido explicitamente no texto).

Notas de

rodapé As **notas de** rodapé devem ser utilizadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto podem criar notas de rodapé no texto e esse recurso pode ser usado. Caso contrário, indique a posição das notas de rodapé no texto e liste as notas de rodapé separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista de referência.

Legendas da figura

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas à figura. Uma legenda deve incluir um título breve (**não** na figura em si) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas ilustrações propriamente ditas, mas explique todos os símbolos e abreviaturas utilizados.

Tabelas

Favor enviar tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no final. Classifique as tabelas consecutivamente de acordo com a aparência no texto e coloque as notas de tabela abaixo do corpo da tabela. Seja poupador no uso de tabelas e assegure-se de que os dados apresentados neles não dupliquem os resultados descritos em outro lugar no artigo. Evite usar regras verticais e sombreamento em células da tabela.

Biografias *e* **fotografias**
 Autores de revisões e tutoriais serão necessários para carregar uma imagem colorida e biografia curta de cada autor individual. As biografias devem conter 2 a 3 frases (máximo de 100 palavras), indicando a afiliação atual dos autores, número de publicações, prêmios, interesses de pesquisa atuais e site se disponível.

Referências

Citação *no* **texto**
 Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referência (e vice-versa). Qualquer referência citada no resumo deve ser dada na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referência, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referência, elas devem seguir o estilo de referência padrão do jornal e devem incluir uma substituição da data de publicação com "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como "na imprensa" implica que o item foi aceito para publicação.

Referências *da* **Web**
 Como mínimo, o URL completo deve ser dado e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referência) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referência.

Referências *de* **dados**
 Esta revista encoraja você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua Lista de Referência. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente global. Adicione [conjunto de dados] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo adequadamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá no seu artigo publicado.

Referências *em* *um* **problema** *especial*
 Certifique-se de que as palavras "este problema" sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos na mesma edição especial.

Software *de* **gerenciamento** *de* **referência**
 A maioria dos periódicos da Elsevier possui seu modelo de referência disponível em muitos dos produtos de software de gerenciamento de referência mais populares. Estes incluem todos os produtos que suportam estilos de estilos de estilo de citação, como Mendeley e Zotero, bem como EndNote. Usando os plug-ins do processador de texto desses produtos, os autores só

precisam selecionar o modelo de diário adequado ao preparar seu artigo, após o qual citações e bibliografias serão formatadas automaticamente no estilo da revista. Se nenhum modelo ainda estiver disponível para este periódico, siga o formato das referências e citações da amostra, conforme mostrado neste Guia.

Os usuários do Mendeley Desktop podem facilmente instalar o estilo de referência para esta revista clicando no seguinte link:
<http://open.mendeley.com/use-citation-style/analytica-chimica-acta>

Ao preparar seu manuscrito, você poderá então para selecionar este estilo usando os plug-ins do Mendeley para o Microsoft Word ou o LibreOffice.

Estilo de referência A descoberta da pesquisa e a revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line às fontes citadas. Para permitir-nos criar links dentro do ScienceDirect e para resumir e indexar serviços, como Scopus, CrossRef ou PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estejam corretos. Tenha em atenção que os apelidos incorretos, títulos de revistas / livros, ano de publicação e paginação podem impedir a criação do link. Ao copiar referências, tenha cuidado porque já podem conter um erro.

Não há requisitos rigorosos na formatação de referência na submissão. As referências podem ser em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Nome (s) do (s) autor (es), título do jornal / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, volume e capítulo do problema / livro e a paginação deve estar presente. O estilo de referência usado pelo jornal será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na prova. Observe que dados incorretos ou ausentes serão destacados na fase de prova para o autor corrigir.

O estilo de referência usado por esta revista é **numerado**. Se você deseja formatar as referências você mesmo, eles devem ser organizados de acordo com os seguintes exemplos:

Sistema de números com títulos de artigos e capítulos

Texto : Indique as referências por número (s) entre colchetes de acordo com o texto. Os autores reais podem ser encaminhados, mas o número (s) de referência deve ser sempre dado.

Exemplo: "... como demonstrado [3, 6]. Barnaby e Jones [8] obtiveram um resultado diferente ..."

Lista : Numerar as referências (números entre colchetes) na lista na ordem em que aparecem no texto.

Exemplos:

Referência a uma publicação de revista:
 [1] J. van der Geer, JAJ Hanraads, RA Lupton, A arte de escrever um artigo científico, J. Sci. Comum. 163 (2010) 51-59.

Referência a um livro:
 [2] W. Strunk Jr., EB White, The Elements of Style, quarto ed., Longman, Nova York, 2000.

- Referência a um capítulo de um livro editado:
- [3] GR Mettam, LB Adams, Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo, em: BS Jones, RZ Smith (Eds.), Introdução à Era Eletrônica, E-Publishing Inc ., Nova Iorque, 2009, pp. 281-304.
- [4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Dados de mortalidade para a doença de corte de carvalho japonês e composições florestais circundantes, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Fonte *de* *abreviaturas* *dos*
diários Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com a Lista de abreviaturas de palavras de título