



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Aplicação de enzimas em biossensores para a monitorização de poluentes metálicos em meio aquoso

Daniel Filipe Ferreira Martins Mota

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Magrinho

Covilhã, Outubro de 2011



# Dedicatória

À minha mãe pelo apoio que me deu, apesar desta má fase que passou.

# Agradecimentos

A elaboração de uma tese académica não resulta exclusivamente do esforço solitário do seu autor, mas do contributo, estímulo e incentivo de algumas pessoas e entidades. A todas desejo expressar, desde já, o meu reconhecimento e sincero agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Manuel Magrinho, que me ajudou e possibilitou as condições necessárias para a elaboração desta dissertação.

À Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, pelo apoio e acompanhamento durante os últimos 5 anos.

À Professora Doutora Albertina Marques, pelo apoio que me deu durante a elaboração desta dissertação.

À Professora Doutora Amélia Rute, pelo apoio que me deu durante os últimos 5 anos.

A todos os professores que aqui não refiro e me deram apoio e formação durante os 5 anos que passei nesta instituição.

A todos os técnicos de laboratório que me facultaram o acesso e ajuda nos laboratórios, e muitas vezes apoio.

Aos meus pais, que me ajudaram e contribuíram para a minha formação académica e pessoal.

À minha namorada pelo apoio que me deu durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus colegas de curso, pelo apoio que me deram durante os últimos anos.

Ao meu colega João Matos, e sua família, pelo acolhimento e apoio durante toda a minha estadia na cidade da Covilhã.

Aos meus amigos pelo apoio que me deram sempre, nos bons e maus momentos.

## Resumo

Com a evolução humana, os metais pesados foram libertados de uma forma contínua e foram-se acumulando na cadeia humana. Esse problema acresce uma grande preocupação com o meio ambiente que pode afectar as gerações futuras.

Os biossensores são uma crescente aposta, pois são de fácil utilização, baixo custo, alta sensibilidade e selectividade, assim, podemos desenvolver um método para monitorizar os metais pesados. A inibição das enzimas por metais pesados é uma alternativa fiável, mas que apresenta por vezes alguns problemas.

Neste trabalho foram abordadas duas técnicas de imobilização, sendo a ligação cruzada o método que apresenta a melhor estabilidade do eléctrodo. Também foram utilizadas diversas enzimas, mas não conseguimos desenvolver um método eficaz, devido a alguns problemas. Mas segundo a bibliografia, estes métodos são verdadeiros, e uma forte alternativa aos métodos tradicionais.

Foram utilizados vários biossensores com enzimas imobilizadas, como, urease, peroxidase, polifenol oxidase, todas elas apresentam resposta aos metais pesados utilizados, sendo a urease aquela que apresenta uma maior resposta. A peroxidase e a polifenol oxidase, foram enzimas extraídas, sendo que a sua concentração não era constante, foi difícil ter dados reprodutíveis.

## Palavras-chave

Biossensores, metais pesados, mercúrio, chumbo, polipirrol, ligação cruzada, urease, peroxidase, polifenol oxidase.

## Abstract

With human evolution, heavy metals are being released on an ongoing basis and are accumulating in the human chain. This problem adds a great concern for the environment that may affect future generations.

The biosensors area is a growing investment, due to their easiness to use, low cost, high sensitivity and selectivity, so we can develop a method for monitoring heavy metals. The inhibition of enzymes by heavy metals is a reliable alternative, but it still may present some problems

In this paper, we addressed two immobilization techniques and a cross-linking method that offers the best stability for the electrode. Several enzymes were also used, but an effective method was not developed due to some problems. Nevertheless, according to the literature, all these methods are true, and a strong alternative to traditional ones

A range of biosensors with immobilized enzymes, such as urease, peroxidase, polyphenol oxidase, have all given positive response in the presence of heavy metals, with urease being the one that presents a greater response. Peroxidase and polyphenol oxidase enzymes were extracted, however, due to the inability for determining their concentration, it was difficult to have reproducible data.

## Keywords

Biosensors, heavy metals, mercury, lead, polypyrrol, cross-linking, urease, peroxidase, polyphenol oxidase.

# Índice

1. Objectivo .....	1
2. Introdução .....	2
3. Revisão bibliográfica .....	3
3.1. Metais pesados e o meio ambiente .....	3
3.1.1. Mercúrio .....	3
3.1.2. Chumbo .....	3
3.2. Parâmetros químicos de qualidade das águas .....	4
3.2.1. Águas de Consumo Humano .....	4
3.2.2. Descarga de águas provenientes de Lixiviados .....	5
3.3. Métodos para a determinação de metais em meio aquoso.....	6
3.4. Sensores químicos e biossensores.....	6
3.4.1. Definição.....	6
3.4.2. Classificação.....	7
3.4.3. Sensores electroquímicos.....	7
3.4.4. Construção de biossensores electroquímicos .....	8
3.4.5. Técnicas de medição electroquímica.....	15
3.5. Outros métodos para a determinação de metais pesados.....	17
3.5.1. Espectrometria de absorção atómica.....	17
3.5.2. Espectrometria de emissão atómica .....	19
3.5.3. Método do diatizona .....	21
3.6. Biossensores para a determinação de metais pesados.....	21
3.6.1. Glicose oxidase .....	24
3.6.2. Urease.....	25
3.6.3. Peroxidase .....	25
3.6.4. Polifenol oxidase .....	26
4. Parte Experimental .....	27
4.1. Reagentes .....	27
4.2. Aparelhos e Software .....	27
4.3. Métodos .....	33

4.3.1.	Aprisionamento com polipirrol .....	33
4.3.2.	Entrecruzamento com glutaraldeído.....	34
5.	Resultados e Discussão .....	36
5.1.	Aprisionamento com polipirrol .....	36
5.1.1.	Peroxidase .....	36
5.1.2.	Urease.....	40
5.2.	Entrecruzamento com glutaraldeído .....	42
5.2.1.	Urease.....	42
5.2.2.	Polifenol oxidase .....	46
5.2.3.	Peroxidase .....	48
6.	Conclusão.....	50
7.	Bibliografia.....	51

## Lista de Figuras

Figura 1 - Apresentação esquemática da imobilização baseada em polipirrol com AMPS/PEG/Enzima (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009).....	12
Figura 2 - Cronoamperograma de diferentes enzimas imobilizadas com polipirrol conjugado com agentes dopantes: (a) PAMPS/PEG/GOD, (b) PAMPS/PEG/LOD, (c) PAMPS/PEG/GAO, V=800mV, concentração de dopante 0,1 wt% (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009).....	13
Figura 3 - Biossensores para a análise de metais pesados (Gonçalves, 2008).....	22
Figura 4 - Mecanismo de oxi-redução de enzimas e produtos na superfície do transdutor. (Ruiz, 2006).....	24
Figura 5 - Mecanismo de oxi-redução da polifenol oxidase. (Akyilmaz, Kozgus, Türkmen, & Çetinkaya, 2010).....	26
Figura 6 - Balança analítica de marca Mettler.....	28
Figura 7 - Balança de precisão marca Mettler.....	28
Figura 8 - Unidade de ultrafiltração. ....	29
Figura 9 - Unidade de produção de água milli Q. ....	30
Figura 10 - Unidade de medição de pH, de marca Vernier. ....	30
Figura 11 - Frigorífico de Marca LG para conservação de reagentes e utilização no método de imobilização. ....	31
Figura 12 - Potenciostato/Galvanostato utilizado para medições electroquímicas e preparação de transdutores. ....	31
Figura 13 - Unidade de registo de sinal proveniente do potenciostato. ....	32
Figura 14 - Potenciostato / Galvanostato mais avançado. ....	32

## Lista de Tabelas

Gráfico 1 - Voltametria cíclica de um eléctrodo de platina com uma camada de polipirrol, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, em 1º electrodo sem enzima e depois electrodo com enzima. ....	37
Gráfico 2 - Cronoamperograma a vários potenciais, com um eléctrodo de platina/polipirrol e adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 Volumes, e inibição com $Hg^{2+}$ . ....	38
Gráfico 3 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e 9 adições de 100 $\mu L$ de mercúrio $2.65 \times 10^{-4}$ M.....	38
Gráfico 4 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e adições de 100 $\mu L$ de mercúrio $2.65 \times 10^{-4}$ M.....	39
Gráfico 5 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e adições de 100 $\mu L$ de mercúrio $2.65 \times 10^{-4}$ M.....	40
Gráfico 6 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, e adição de ureia. ....	40
Gráfico 7 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, e adição de ureia. (escala ampliada) .....	41
Gráfico 8 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, adição de ureia e 100 $\mu L$ adição de $Hg^{2+}$ a $2.65 \times 10^{-4} M$ .....	42
Gráfico 9 - Variação da resposta do desenho experimental ao Potencial e ao pH separadamente.....	43
Gráfico 10 - Variação da resposta do desenho experimental ao Potencial e ao pH separadamente.....	44
Gráfico 11 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada com glutaraldeído e testado um potencial de 1.1V e um pH de 7, a solução tampão já continha uma concentração de ureia de 1M. ....	45
Gráfico 12 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada com glutaraldeído e testado um potencial de 1.1V e um pH de 7, a solução tampão já continha uma concentração de ureia de 1M (escala ampliada). ....	45

Gráfico 13 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase immobilizada proveniente de um extracto de mirtilo. ....	46
Gráfico 14 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase immobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, várias concentrações de catecol. ....	47
Gráfico 15 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase immobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, com adição de catecol. ....	47
Gráfico 16 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com peroxidase e polifenol oxidase immobilizada proveniente de um extracto de mirtilo. ....	48
Gráfico 17 - Cronoamperometria com um eléctrodo de carbono vítreo com peroxidase e polifenol oxidase immobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, adição de peróxido de hidrogénio, água e chumbo. ....	49

# 1. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de um biossensor para determinação de metais pesados, nomeadamente, o controlo de efluentes de lixiviados. Os lixiviados apresentam um meio muito complexo, e para proceder à sua determinação, tem que se proceder a tratamento e separação. Após essa separação pode-se proceder à sua análise.

## 2. Introdução

A libertação contínua de metais pesados para o meio ambiente, a partir de inúmeras fontes resultantes da actividade humana, é uma realidade, esses resíduos podem ser provenientes da indústria, das emissões de gases, dos aterros sanitários, da queima de combustíveis fósseis, de escavações de minerais, entre outros. Com a evolução, houve a necessidade de desenvolver técnicas analíticas para a determinação sensível e selectiva em vários tipos de amostra. O destino dos iões metálicos para a biosfera, o seu ciclo bioquímico e a sua conversão, tornam estes iões como espécies muito tóxicas, o que leva a um grande impacto ambiental.

## 3. Revisão bibliográfica

### 3.1. Metais pesados e o meio ambiente

A toxicidade dos metais em ambientes aquosos depende de sua forma físico-química. Por exemplo, iões de cobre são muito tóxicos, enquanto o cobre ligado à matéria orgânica natural é menos prejudicial. Os poluentes iónicos podem estar na forma de iões simples, iões complexos ou como complexos lipossolúveis ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ). As formas iónicas simples e as formas lipossolúveis são aquelas que mais contribuem para a toxicidade. (Rajeshwar & Ibanez, 1997)

#### 3.1.1. Mercúrio

O mercúrio é frequentemente utilizado em fábricas de papel como um retardador de molde para o papel. As espécies comuns aquosas são  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$  e forma complexos estáveis com ligantes orgânicos. O envenenamento por mercúrio aconteceu no Japão na década de 1950 como resultado do consumo de moluscos que continham mercúrio. O mercúrio é considerado não essencial para as plantas e animais. A United States Environmental Protection Agency foi a primeira agência a legislar o limite máximo de mercúrio na água potável de  $2 \mu\text{g dm}^{-3}$ . O método da espectrometria atómica sem chama (vaporização a frio) é o método de referência. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

O método da ditizona é um método colorimétrico que pode ser usado para determinar os níveis elevados de mercúrio ( $> 2 \mu\text{g dm}^{-3}$ ) nas águas potáveis. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999) O método da ditizona remonta a 1948 na análise de zinco, que consiste na reacção dos metais com a ditizona em clorofórmio, e estes complexos têm cores características que podem ser analisadas por espectroscopia. (Vallee & Gibson, 1948)

#### 3.1.2. Chumbo

O Chumbo é usado em baterias, munições, solda, tubos, pigmentos, insecticidas e ligas. O chumbo foi também usado na gasolina por muitos anos como agente antidetonante na forma de tetra etilo de chumbo. As espécies iónicas mais comuns são: complexos aquosos de  $\text{Pb}^{2+}$  e hidróxido de chumbo ou carbonato de chumbo. O Chumbo contido numa água pode vir de

minas, indústrias e de descargas de fundição ou da dissolução dos tubos e canalizações. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

O chumbo não é essencial para as plantas e animais. É tóxico por ingestão e é um veneno cumulativo. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

O método de espectrometria de absorção atómica tem um limite de detecção relativamente alto e exige um procedimento de extracção para as baixas concentrações, mas é o método padrão segundo a legislação. A absorção atómica (AA) é o método mais sensível para baixas concentrações e não requer a extracção. A polarografia também é um método padrão e pode ser usado para a quantificação de chumbo em amostras aquosas. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### 3.2. Parâmetros químicos de qualidade das águas

As águas em Portugal são regulamentadas pelo ministério do ambiente, o qual regulamenta tanto os parâmetros de qualidade das águas para consumo humano, como os restantes tipos de águas. Os sistemas de descarga para o meio ambiente também são regulamentados, e assim, não se pode proceder a uma descarga se os parâmetros químicos não estiverem dentro dos limites legais.

#### 3.2.1. Águas de Consumo Humano

Em Portugal, a legislação actual define os parâmetros químicos da água destinada ao consumo humano através do Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, em que os valores limite para os metais pesados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Limite de metais pesados em águas para consumo humano. Adaptado do DL nº 306/2007

Componente	Concentração permitida / $\mu\text{g dm}^{-3}$
Arsénio	10
Cádmio	5,0
Cromo	50
Cobre	2000
Chumbo	25

Mercúrio	1,0
Níquel	20
Selénio	10

### 3.2.2. Descarga de águas provenientes de Lixiviados

Segundo o Decreto-Lei nº 152/2002 de 23 de Maio, em cada uma das classes de aterro, os resíduos e os seus eluatos deverão respeitar os valores especificados para os vários parâmetros, constantes da tabela 2, os quais constituem valores máximos de aceitação para todas as classes de aterros.

Tabela 2 - critérios de aceitação - Análise sobre o eluato Adaptado do DL nº 152/2002

Componente	Classes de aterros		
	Inertes	Não perigosos	Perigosos
Arsénio (mg dm <sup>-3</sup> )	0,1	0,5	1
Cádmio (mg dm <sup>-3</sup> )	0,1	0,2	0,5
Cobre (mg dm <sup>-3</sup> )	2	5	10
Cromo VI (mg dm <sup>-3</sup> )	0,1	0,1	0,5
Cromo total (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	2	5
Mercúrio (mg dm <sup>-3</sup> )	0,02	0,05	0,1
Níquel (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	1	2
Chumbo (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	1	2
Zinco (mg dm <sup>-3</sup> )	2	5	10

### 3.3. Métodos para a determinação de metais em meio aquoso

### 3.4. Sensores químicos e biossensores

No campo da química analítica, a tendência é para simplificar os protocolos de análise de uma amostra determinada, reduzindo assim os tempos de análise e o seu custo. Tradicionalmente usa-se instrumentação analítica muito sofisticada, tal como espectrometria de absorção atómica, espectrometria de emissão atómica, etc, de custo elevado e requerem especialização por parte do operário. Este tipo de equipamento é incompatível com análise em contínuo ou provas de campo. (Ristic, 1994)

Os sensores químicos apresentam-se como uma clara alternativa, pois permitem realizar análises em contínuo, em detrimento, a sua sensibilidade e fiabilidade é menor em comparação com a instrumentação analítica convencional. Dentro deste tipo de sensores, temos que destacar os biossensores, já que são aqueles que têm uma maior selectividade, e portanto, com mais aplicações potenciais em química analítica. (Ristic, 1994)

#### 3.4.1. Definição

Um sensor químico é um dispositivo capaz de traduzir uma informação química de uma amostra num sinal analítico útil. Os sensores químicos constam de dois componentes básicos: um sistema de reconhecimento ou receptor e um transdutor, que se encontra imobilizado no primeiro. (Ristic, 1994)

Esta definição foi proposta pela IUPAC (2001):

“Um biossensor electroquímico é um dispositivo auto-contido integrado, que é capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que é mantido em contacto directo com um elemento de transdução electroquímico.” (Thévenot, 2001)

### 3.4.2. Classificação

Existem duas formas de classificar os receptores: quanto ao tipo de receptor e quanto ao tipo de transdutor utilizado. Quanto aos tipos de receptor, estes podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Os receptores físicos, são aqueles que não envolvem reacções químicas, por exemplo o caso dos materiais piezoeléctricos, utilizados para detectar mudanças de massa.

Os receptores químicos, são aqueles em que o sinal é obtido a partir de uma reacção química, por exemplo agentes quelantes.

Os receptores biológicos, são aqueles que o material receptor tem procedência biológica, por exemplo enzimas. Neste caso os sensores químicos são denominados biossensores. (Isao & George, 1987)

Quanto ao tipo de transdutor, estes podem ser: Ópticos, Electroquímicos, Piezoeléctricos e Térmicos.

Os transdutores ópticos, são aqueles que transformam uma alteração produzida num sinal óptico, produzido pela interacção de um analito com um receptor.

Os transdutores electroquímicos, são aqueles em que o sinal transformado é devido a uma interacção electroquímica entre o analito e o eléctrodo.

Os transdutores piezoeléctricos, são aqueles que transformam uma alteração na massa que se dá sobre o eléctrodo modificado com materiais com propriedades piezoeléctricas.

Os transdutores térmicos, são aqueles capazes de medir a alteração de calor na superfície do eléctrodo. (Eggins, 1996)

### 3.4.3. Sensores electroquímicos

Os sensores electroquímicos, nos últimos anos têm tido uma maior atenção, pois a sua produção é simples e económica comparando com outros tipos de transdutores e possuem um amplo intervalo de linearidade e tempos de resposta muito curtos, da mesma maneira que os equipamentos necessários para recolher e processar o sinal, que é o caso de potenciostatos ou conductímetros, são económicos, de fácil manutenção, fáceis de trabalhar e de reduzido tamanho, e são de uso comum na maioria dos laboratórios de análise. (Galan, 1996)

### 3.4.4. Construção de biossensores electroquímicos

Na construção de biossensores electroquímicos é necessário ter em conta a forma como é imobilizado o bioreceptor, e a técnica electroquímica aplicada. (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

#### Tipos de bioreceptores

##### Receptores biológicos

Uma das principais características do material biológico é a alta selectividade, permitindo diferenciar em alguns casos, isómeros de uma molécula. Esta particularidade faz destes componentes de grande interesse na sua aplicação como receptores.

Existem diferentes tipos de bioreceptores que se podem imobilizar sobre transdutores electroquímicos:

- Anticorpos
- Ácidos Nucleicos
- Microorganismos
- Tecidos Orgânicos
- Enzimas

As enzimas são aquelas que mais são utilizadas na produção de biossensores devido ao seu baixo custo, disponibilidade no mercado e fácil manipulação. (Eggins, 2002)

##### Anticorpos

Os anticorpos junto com o ADN, são os agentes biológicos mais selectivos que existem, devido à sua estrutura tridimensional pode ligar-se com uma substância (antigénio) de uma maneira muito específica. O inconveniente deste tipo de material para aplicações na construção de biossensores é que não tem capacidade catalítica, o que implica o uso de anticorpos ou antigénios marcados, com um isótopo radioactivo, enzimas, partículas luminescentes, etc. (Marco, Gee, & Hammock, 1995)

## Ácidos Nucleicos

A alta especificidade dos pares de bases (adenina/timina e citosina/guanina) distribuídas ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de ADN, faz deste material de grande interesse na construção de biossensores. Como em outros biossensores, as cadeias curtas de ADN estão imobilizadas na superfície do eléctrodo, a hibridação desta molécula imobilizada é detectada pelo transdutor. Como no caso dos anticorpos, este tipo de material não tem capacidade catalítica, por isso, para ser detectado é preciso ser marcado. (Eggins, 2002)

## Microorganismos

Os microorganismos têm uma grande importância em diferentes processos biotecnológicos, na indústria vitivinícola, em processos de síntese de fármacos ou em tratamento de água.

Muitos biossensores baseados em células foram desenvolvidos para o controle dos ditos processos.

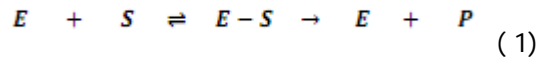
Os microorganismos podem assimilar compostos orgânicos e gerar uma alteração que é detectada pelo transdutor. (Eggins, 2002)

## Tecidos Orgânicos

Os tecidos orgânicos podem ser utilizados como elemento de reconhecimento praticamente sem preparação. Geralmente, têm uma grande variedade de enzimas imobilizadas e por isso não é tão selectivo como outros materiais biológicos. Por outro lado, está no seu meio natural e é mais difícil a sua degradação, o que aumenta o tempo de vida do biossensor. (Baeumner, 2003)

## Enzimas

As enzimas são proteínas capazes de catalisar uma reacção química. Reagem de maneira selectiva com um analito ou família de analitos, acelerando a reacção química sem se consumirem. O mecanismo básico da catálise enzimática é o seguinte:



Onde E é a enzima, S o substrato, E-S o complexo enzima substrato e P o produto. A actividade enzimática está regulada pelo pH do meio, a força iónica, a temperatura, e em alguns casos, requer a presença de um cofactor. As enzimas são formadas por uma estrutura tridimensional composta por péptidos, com uma zona activa que reage com o substrato. Esta zona activa confere a especificidade a enzima.

Existem diversos tipos de enzimas, classificados segundo o tipo de reacção:

- Transferases;
- Hidrolases;
- Liases;
- Isomerases;
- Ligases;
- Oxiredutases.

As oxiredutases, catalisam reacções redox, ou seja, há uma espécie que se reduz e outra que se oxida, com transferência de electrões. Estas enzimas são aquelas que mais se utilizam.

A grande vantagem da utilização das enzimas é a sua alta selectividade, o curto tempo de resposta em relação a outros tipos de bioreceptores e têm como inconveniente a perda de actividade ao serem immobilizadas bem como um tempo de vida relativamente curto. (Benedetto, Palmisano, & Zambonin, 1996)

### Métodos de immobilização

A immobilização do material biológico é um processo mediante o qual se deposita o bioreceptor sobre o transdutor electroquímico, para dar lugar a um conjunto insolúvel que retém a sua actividade. É o processo mais importante na produção de um biossensor, já que características como o tempo de vida e a sensibilidade dependem exclusivamente da metodologia de immobilização. Como vantagem podemos destacar o aumento da estabilidade do receptor biológico e a possível reutilização do biossensor, diminuindo o custo do processo. Como desvantagem podemos destacar a alteração da conformação do material biológico respectivamente ao seu estado nativo e no caso de utilização de enzimas, perda de actividade catalítica. (Arroyo, 1998; Hartmeier, 1985)

Podemos dividir os métodos de immobilização em 2 grandes grupos: retenção física e união química. Mas estes grupos subdividem-se: na retenção física podemos ter: aprisionamento e

microencapsulação, na união química podemos ter: adsorção na superfície, ligação cruzada (cross-linking) e união covalente. (Arroyo, 1998)

## Aprisionamento

Consiste na retenção física da enzima nas cavidades interiores de uma matriz sólida porosa, constituída geralmente por monómeros endurecidos por luz ou polímeros do tipo de poliacrilamina, colagénio, alginato, carrigenato ou resinas de poliuretano. Também se usam polímeros condutores como polipirrol. (Lomillo, Ruiz, & Pascual, 2005)

Esta técnica tem uma grande facilidade do ponto de vista experimental e não requer grande quantidade de material biológico. Como vantagem, podemos destacar que a enzima não sofre nenhuma alteração na estrutura, como desvantagem, podemos destacar que se cria uma grande barreira que dificulta a difusão do analito até ao centro activo da enzima, aumentando o tempo de resposta do sensor. O aprisionamento requer um controlo rigoroso das condições de polimerização já que pode se alterar os grupos reactivos da proteína, e pode provocar uma perda da actividade enzimática. (Eggins, 1996)

O polipirrol pode ser sintetizado por diversas vias, tais como, (i) síntese por oxidantes químicos, (ii) síntese por indução fotoquímica ou (iii) síntese por deposição electroquímica. (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

Síntese por oxidantes químicos é utilizada para polimerizações em grande escala, que usam grandes quantidades de monómero, e utilizam agentes oxidantes ( $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ). (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

Síntese por indução fotoquímica consiste na irradiação do monómero com luz com baixo comprimento de onda. (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

Síntese por deposição electroquímica é utilizada para polimerização sobre superfícies condutoras, de maneira que podemos obter desde filmes a superfícies mais espessas, dependendo do tempo de polimerização e do potencial aplicado. (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

Dentro da deposição electroquímica podemos ter vários regimes de polimerização: potencioestático, galvanostático ou voltametria cíclica.

Potencioestático - A deposição electroquímica é feita a potencial constante, em que se faz a polimerização aplicando um potencial constante de 800 mV relativamente ao eléctrodo de prata/cloreto de prata durante um certo período de tempo. (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009)

Galvanostático - A deposição electroquímica é feita a corrente constante, em que se faz a polimerização aplicando uma corrente constante de  $10 \text{ mA cm}^{-2}$  durante um certo período de tempo. (Stankovic, Stankovic, Ristic, Pavlovic, & Vojnovic, 1997)

Voltametria cíclica - A deposição electroquímica é feita a potencial variável, fazendo vários ciclos, variando o potencial entre  $-100 \text{ mV}$  e  $+900 \text{ mV}$  a uma velocidade de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (Martínez, Lomillo, Renedo, & Matos, 2009)

São usados também aditivos, que contribuem para a ligação da enzima ao polímero. Na figura 1 é representado a estrutura do polímero e a interacção do polímero com a enzima, o AMPS<sup>1</sup> e o PEG<sup>2</sup> são aditivos. Os aditivos fazem com que o polímero fique mais reticulado e assim, favorecer a migração do substrato e outros compostos a superfície da enzima e também promover a ligação contínua da enzima nesta matriz, fazendo com que a enzima ao longo do tempo não perca a actividade. (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009)

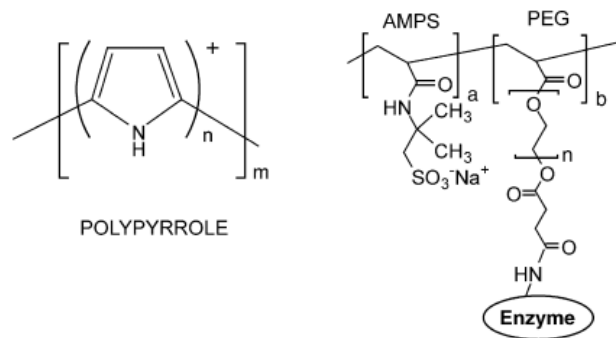


Figura 1 - Apresentação esquemática da imobilização baseada em polipirrol com AMPS/PEG/Enzima (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009)

O polipirrol é usado como suporte para ligar enzimas, de forma, a que estas fiquem aprisionadas no interior da matriz. O polipirrol com aditivos favorece a atenuação do ruído na medição, pois como a enzima se encontra no interior da matriz, esse ruído não é tão notável. Podemos ver na figura 2 diferentes enzimas imobilizadas com polipirrol e agentes dopantes, e verifica-se que não há um ruído notável. O polipirrol com aditivos também garante que as enzimas não percam a actividade, pois como se encontram ligadas, não se quebra a ligação e não se perdem enzimas para o electrólito. (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009)

<sup>1</sup> AMPS - 2-Acrylamido-2-methylpropane Sulfonic acid, Sodium salt

<sup>2</sup> PEG - Poly ethylene glycol

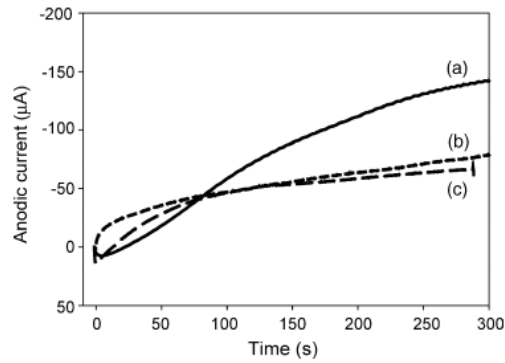


Figura 2 - Cronoamperograma de diferentes enzimas imobilizadas com polipirrol conjugado com agentes dopantes: (a) PAMPS/PEG/GOD, (b) PAMPS/PEG/LOD, (c) PAMPS/PEG/GAO,  $V=800\text{mV}$ , concentração de dopante 0,1 wt% (Singh, Kathuroju, & Jampana, 2009)

O polipirrol também é usado em biossensores catalíticos, que promovem uma óptima resposta, dentro destes podemos destacar: Glicose oxidase, FAD oxidase,  $\text{NAD}^+$  desidrogenase, PQQ desidrogenase, peroxidases e outras enzimas com multifactores. É usado em imunossensores. Também é usado em sensores de DNA. Entre estas aplicações, podemos destacar muitas mais, pois podemos imobilizar outras enzimas em que as aplicações sejam outras. (Ramanavicius, Ramanaviciene, & Malinauskas, 2006)

### Microencapsulação

Nesta técnica, as enzimas estão rodeadas por membranas semipermeáveis que permitem a passagem de moléculas de substrato e de produto, mas não de enzima. Este método permite que o material biológico esteja em contacto directo com o transdutor, mantendo, por sua vez a alta selectividade das enzimas sem que o pH, a temperatura ou a força iónica afectem a enzima. (Eggins, 2002)

### Adsorção

Na adsorção a enzima une-se ao suporte sem funcionalização mediante interações iónicas, forças de Van der Waals e pontes de hidrogénio. Podem-se utilizar diferentes substâncias com grande capacidade para absorver material biológico, como por exemplo, alumina, grafite e sílica gel. Os principais factores que influenciam a adsorção são:

- pH do meio;
- Força iónica;
- Diâmetro do poro;

- Presença de iões que actuam como cofactores da enzima.

Este método de preparação fácil, de baixo custo e que não implica mudança de especificidade enzimática, tem como inconveniente que é pouco estável desde um ponto de vista mecânico e que a união com o suporte é débil. (Eggins, 2002)

### Ligação cruzada (cross-linking)

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para a estabilidade da enzima. (Wongy & Wong, 1992) Este método consiste na utilização de reagentes bifuncionais (dialdeídos, diiminoésteres, diisocianatos, sais de diazónio, ou diaminas se estão activadas com carbodiimida) que originam uniões intermoleculares entre moléculas de enzima. Os reagentes mais utilizados para este processo são: glutaraldeído, hexametildisocianato e 1,5-dinitro-2,4-diflorobenzeno. (Eggins, 1996)

A ligação cruzada permite eliminar as perdas de actividade enzimática devido a efeitos difuncionais, cruzando o material biológico com proteínas sem actividade enzimática e rica em resíduos de lisina como, por exemplo, albumina sérica bovina (BSA). (Arroyo, 1998)

### União Covalente

A metodologia da união covalente consiste na activação de grupos químicos de suporte para que reagem com nucleófilos das proteínas. De entre os 20 aminoácidos diferentes que se encontram na estrutura da enzima, os mais utilizados para a formação de ligações covalentes são principalmente a lisina, a cisteína, a tirosina e a histidina, e em menos quantidade o triptofano, a arginina e os ácidos aspártico e glutâmico. Os restantes aminoácidos, devido ao seu carácter hidrofóbico, não se encontram expostos até ao exterior da superfície proteica e não podem intervir na união covalente. (Eggins, 2002)

Este tipo de imobilização precisa de um controlo dos parâmetros como o pH e a força iónica da solução, assim como dispor de uma superfície do transdutor perfeitamente limpa. A grande vantagem deste método é que permite conseguir tempos de vida muito longos, entre 4 a 14 meses. (Eggins, 1996)

### 3.4.5. Técnicas de medição electroquímica

Existem 3 tipos de técnicas de medição electroquímica:

- Potenciometria;
- Conductometria;
- Voltametria.

#### Potenciometria

As medidas potenciométricas consistem na determinação de uma diferença de potencial a intensidade nula entre um eléctrodo de trabalho e um de referência. A diferença de potencial medida entre os eléctrodos relaciona-se com a concentração do analito de acordo com a equação de Nernst,

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} \times a_j^{z_i/z_j} \right) \quad (2)$$

Onde  $a_i$  é a actividade do ião principal,  $a_j$  a actividade do ião interferente,  $z_i$  e  $z_j$  as cargas dos iões principal e interferente e  $k_{i,j}^{pot}$  é o coeficiente de selectividade. (Pravda, 1998)

Os transdutores potenciométricos são o grupo de dispositivos electroquímicos mais desenvolvidos e estudados. Historicamente, a origem dos sensores químicos remonta a princípios do século XX com o desenvolvimento do eléctrodo de vidro, (Gopel & Zemel, 1991) um dos sensores potenciométricos mais utilizados.

#### Conductometria

Este tipo de transdutores baseia-se na medida de alterações de condutividade provocadas pelo analito, ou seja, na solução de medida ou na membrana selectiva. Em alguns casos pode chegar a medir alterações de condutividade do próprio analito. (Janata, 1998) A condutividade é proporcional a concentração de iões segundo a equação:

$$\Lambda = \frac{k}{c} \quad (3)$$

Onde  $k$  é a condutividade específica ( $S \text{ cm}^{-1}$ ),  $C$  a concentração de iões ( $\text{mol cm}^{-3}$ ).

As medidas de resistividade em corrente contínua, são as mais comuns para o funcionamento destes sensores, apesar de que para registar valores de impedância utiliza-se corrente alterna. (McNeil, 1995) Estas medidas de impedância utilizam-se para caracterizar alguns líquidos e/ou superfícies de eléctrodos modificados. (Hofmann, Schröder, Zacheja, & Binder, 1996; Katz & Willner, 2003)

## Voltametria

Este tipo de dispositivos baseia-se na aplicação de um potencial fixo entre o eléctrodo de trabalho, geralmente de platina, ouro ou grafite, e o eléctrodo de referência. Um terceiro eléctrodo denominado auxiliar, é necessário na maioria dos casos para completar a célula electroquímica. (Thévenot, 2001) Também é possível, realizar análises baseadas em técnicas voltamperométricas variando o potencial de trabalho de forma controlada.

É necessário que haja um electrólito de suporte (solução condutora) e espécies electroactivas (espécies oxidáveis ou reduzíveis). (Eggins, 1996)

A amperometria é um método voltamétrico que se baseia na medição da corrente resultante da oxidação ou redução electroquímica de espécies electroactivas. Neste método o potencial é mantido constante entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência. (Thévenot, 2001) (Domínguez & Arcos, 2006)

Esta técnica esta fundamentada através da lei de Faraday, em que existe uma proporcionalidade entre a concentração da espécie electroactiva e a corrente eléctrica registada ao oxidar-se ou a reduzir-se sobre a superfície do eléctrodo.

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C_{ox}}{\delta} \quad (4)$$

Onde F é a constante de Faraday, A é a área do eléctrodo de trabalho, D é o coeficiente de difusão, C a concentração do analito e  $\delta$  o tamanho da capa de difusão. (Eggins, 1996) Estes são os biossensores electroquímicos mais utilizados devido à sua elevada sensibilidade, rapidez e baixo custo. (Domínguez & Arcos, 2006)

### 3.5. Outros métodos para a determinação de metais pesados

#### 3.5.1. Espectrometria de absorção atómica

A determinação de metais por espectrometria de absorção atómica varia conforme o metal e a sua concentração, ou seja, para quantificar os vários metais pode-se usar diferentes métodos de espectrometria de absorção atómica como espectrometria de absorção atómica de chama, espectrometria de absorção atómica de vapor frio ou espectrometria de absorção atómica electrotérmica. Na tabela 3 estão representadas as técnicas de espectrometria de absorção atómica, bem como o gás utilizado, se é ou não necessário efectuar alguma extracção de forma a concentrar a amostra e quais os metais a que a técnica é eficiente.

Tabela 3 - Método de Espectrometria aplicado à análise de cada metal, para concentrações altas ou baixas, e gases aplicados em cada método. Adaptado de (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

Método	Espectrometria de absorção atómica de chama				Espectrometria de absorção atómica de vapor frio	Espectrometria de absorção atómica electrotérmica
	Gás	Ar / Acetileno	Ar / Acetileno	Óxido nitroso / Acetileno		
Concentração / Extracção	Alta/ -	Baixa/APDC-MIBK	Alta/ -	Baixa / 8-hidroxiquinolina - MIBK	-	-
Metal ↓						
Alumínio			•	•		•
Antimónio	•					•
Arsénio						•
Bário			•			•
Berílio			•	•		•
Bismutíu	•					
Cádmio	•	•				•
Cálcio	•		•			
Césio	•					

Cromo	•	•				•
Cobalto	•	•				•
Cobre	•	•				•
Ouro	•					
Irídio	•					
Ferro	•	•				•
Chumbo	•	•				
Lítio	•					
Magnésio	•					
Manganes	•	•				•
Mercúrio					•	
Molibdénio			•			•
Níquel	•	•				•
Ósmio			•			
Paládio	•					
Platina	•					
Potássio	•					
Rénio			•			
Ródio	•					
Ruténio	•					
Selénio						•
Prata	•	•				•
Titânio			•			
Zinco	•	•				

### Espectrometria de absorção atómica de chama

Em espectrometria de absorção atómica de chama, a amostra é aspirada para a chama e atomizada. Um feixe de luz, de um único comprimento de onda, é direccionado através da chama e é analisado no detector que mede a quantidade de luz absorvida pelo elemento atomizado na chama. Para alguns metais, a absorção atómica apresenta uma sensibilidade superior em relação a emissão atómica, porque cada metal tem o seu comprimento de onda de absorção característica, é utilizada uma lâmpada do mesmo elemento, o que torna este método livre de interferências espectrais ou radiação. A quantidade de energia no comprimento de onda característica absorvida na chama é proporcional à concentração do elemento na amostra numa faixa de concentração limitada. A maioria dos equipamentos de espectrometria de absorção atómica também está preparada para operar em modo de emissão, e proporcionam uma melhor linearidade em alguns elementos. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

Nesta técnica, são utilizados diferentes gases, de forma a poderem atomizar os metais de forma diferente, e assim poder detectar outros elementos. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### Espectrometria de absorção atómica de vapor frio

Em espectrometria de absorção atómica de vapor frio, a amostra é aspirada e atomizada apenas com ar. Um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado através da chama e é analisado no detector que mede a quantidade de luz absorvida pelo elemento atomizado. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### Espectrometria de absorção atómica electrotérmica

A espectrometria de absorção atómica electrotérmica é baseada no mesmo princípio de atomização em chama directa, mas num atomizador aquecido electricamente ou num forno de grafite, que substitui a cabeça do queimador padrão. Um volume de amostra é adicionado dentro do tubo de amostra de grafite. As determinações são feitas por aquecimento da amostra em três ou mais etapas. Primeiro, uma baixa corrente aquece o tubo para secar a amostra. Segundo, ocorre carbonização da amostra, este estágio destrói a matéria orgânica e outros componentes da matriz volatilizam a uma temperatura intermédia. Terceiro, uma corrente alta aquece o tubo até à incandescência e, numa atmosfera inerte, atomiza o elemento que esta a ser determinado. Outras etapas são adicionadas para ajudar na secagem e na carbonização, e também para limpar e arrefecer o tubo entre as amostras. Quando a amostra está atomizada, é emitida uma radiação monocromática e o elemento a analisar absorve esta radiação. O detector mede a intensidade de radiação transmitida. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### 3.5.2. Espectrometria de emissão atómica

A espectrometria de emissão de plasma foi desenvolvida em meados da década de 1960 como sendo um método rápido, sensível e conveniente para a determinação de metais em amostras de água e água residual. Os metais dissolvidos são determinados em amostras filtradas e acidificadas. Os metais totais são determinados após uma digestão. Deve-se ter um especial

cuidado para eliminar possíveis interferentes, especialmente quando os sólidos dissolvidos excedem os 1500 mg/L. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### Plasma acoplado indutivamente - ICP

A fonte de plasma consiste num fluxo de argon ionizado por um campo de frequência de rádio, tipicamente oscilando em 27,1 MHz. Este campo é indutivamente acoplado ao gás ionizado por uma bobina refrigerada a água em torno de uma "tocha" de quartzo que suporta e confina o plasma. A amostra de aerossol é gerada num nebulizador apropriado numa câmara de spray e é transportada para o plasma através de um tubo injector localizado dentro da tocha. O aerossol da amostra é injectado directamente no ICP, sujeitando os átomos constituintes a temperaturas de cerca de 6000-8000°K. Isso resulta na dissociação quase completa das moléculas. A alta temperatura do plasma excita a emissão atómica de forma eficiente. A ionização de uma percentagem elevada de átomos produz espectros de emissão iónica. O ICP fornece uma "fonte" opticamente fina que não está sujeita a auto-absorção, excepto em concentrações muito elevadas. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

A excitação eficiente fornecida pelo ICP resulta em limites de detecção baixos para muitos elementos. Isso permite a determinação multielementar de metais. A luz emitida pelo ICP é focalizada sobre a fenda de entrada de qualquer monocromador ou um policromador. A fenda de saída é alinhada de forma a isolar uma parte do espectro de emissão para a medição da intensidade através de um tubo fotomultiplicador. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### Plasma acoplado indutivamente / espectrometria de massa (ICP/MS)

Este método é usado para a determinação de metais vestigiais e metalóides no ar, terra e água potável por plasma acoplado indutivamente / espectrometria de massa (ICP/MS). Também pode ser adequado para águas residuais, solos, sedimentos, lamas e amostras biológicas após digestão, seguindo de diluição e/ou limpeza. O método é mais adequado para a determinação de metais no ambiente ou em água doce. Matrizes mais complexas podem exigir algum tipo de limpeza para reduzir os efeitos da matriz para um nível admissível. Existem técnicas de limpeza para reduzir as interferências da matriz e/ou concentrar analitos de interesse. (Clescerl, Greenberg, & Eaton, 1999)

### 3.5.3. Método do diatizona

Este método é usado para a determinação de mercúrio, chumbo e cádmio, e consiste num método colorimétrico, em que se utiliza o diatizona, que forma um complexo com o metal e apresenta uma coloração característica consoante o metal a analisar. (Clesceri, Greenberg, & Eaton, 1995)

Este método vai absorver a radiação monocromática que se faz irradiar sobre a amostra, e vai-se analisar a percentagem de radiação absorvida ou transmitida. Na tabela 4 estão apresentados os comprimentos de onda onde o mercúrio, o chumbo e o cádmio absorvem.

Tabela 4 - Comprimento de onda onde o mercúrio, o chumbo e o cádmio absorve através do método do diatizona. Adaptado de (Clesceri, Greenberg, & Eaton, 1995)

Metal	Comprimento de onda
Mercúrio	492 nm
Chumbo	510 nm
Cádmio	518 nm

### 3.6. Biossensores para a determinação de metais pesados

Os metais pesados são a causa de um dos problemas de poluição mais graves do nosso tempo. Determinados iões metálicos são reconhecidos como altamente tóxicos, perdendo apenas para os pesticidas em termos de importância ambiental, o que torna a sua presença indesejável em águas ambientais ou solos. (Gonçalves, 2008)

Uma vez que não são biodegradáveis, tais metais podem-se acumular no meio ambiente e produzir efeitos tóxicos em plantas e animais, mesmo em concentrações muito baixas. Por isso tornou-se muito importante a detecção de vestígios de metais pesados em materiais biológicos, águas naturais, solo e ar. Na figura 3, estão expostos exemplos de alguns tipos de biossensores utilizados na análise de metais pesados. (Gonçalves, 2008)

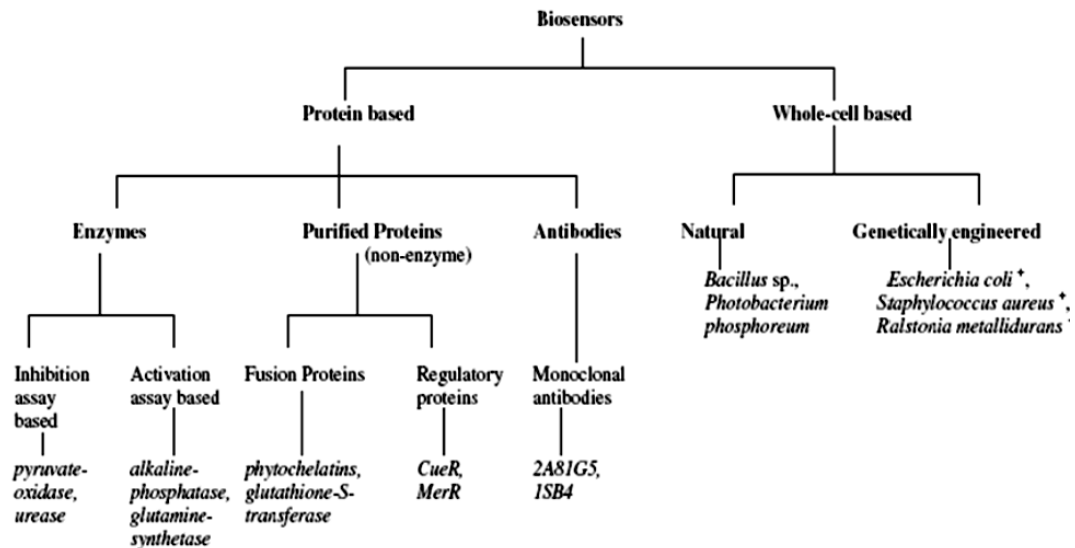


Figura 3 - Biosensores para a análise de metais pesados (Gonçalves, 2008)

Há uma clara necessidade de encontrar tecnologias eficientes e de baixo custo para o tratamento e detecção da presença de metais pesados que afectam negativamente a saúde humana. Neste tipo de tecnologia podemos destacar os biosensores, que apresentam um nível eficiente para a detecção e que apresentam um baixo custo comparado com outras técnicas. (Gonçalves, 2008)

Os metais podem interferir na actividade de uma enzima, competindo pelo centro activo, inibindo-as, mas nem todos os metais têm esta capacidade de inibição. Algumas enzimas apresentam na sua constituição alguns metais como zinco ou níquel. (Gonçalves, 2008)

A detecção com um biossensor com inibição enzimática pode ser realizada de uma maneira muito sensível, uma vez que a interacção de uma molécula de inibidor livre com uma enzima pode resultar numa redução significativa da actividade enzimática, assim agindo como um amplificador. (Gonçalves, 2008)

A resposta de um biossensor baseado na inibição enzimática depende tanto da concentração do analito como do tipo de inibição. Uma das características mais marcantes dos biossensores baseados na inibição é o seu comportamento não ideal, ou seja, quase todos são irreversíveis e, em alguns casos, a metodologia de produção de eléctrodos é focada no desenvolvimento de biossensores descartáveis. Mas em alguns casos, o biossensor pode ser regenerado, aplicando ao biossensor um tratamento adequado. A regeneração é sempre parcial, embora alguns autores referem a quase total regeneração, dependendo do grau de inibição. (Gonçalves, 2008)

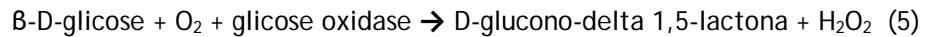
Na tabela 5, podemos resumir as características dos biossensores com várias enzimas imobilizadas em diferentes tipos de transdutores para determinação de metais pesados, principalmente iões de mercúrio e chumbo.

Tabela 5 - Biossensores enzimáticos para a detecção de metais pesados, nomeadamente mercúrio.

Inibidor	Enzima	Matriz de imobilização	Técnica electroquímica	Limite de detecção	Referência
Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , outros	Glicose oxidase	Platina/poli-o-fenilenodiamina	Amperometria	0,5 ppm, 0,3 ppm, 0,56 ppm	(Guascito M. R., Malitesta, Mazzotta, & Turco, 2008)
Hg <sup>2+</sup>	Glicose oxidase	Platina/ polianilina/ ferroceno/ glutaraldeído	Amperometria	0,00049 ppm	(Jian-xian, Xiang-min, Lin, & Guang-ming, 2009)
Hg <sup>2+</sup>	Urease	Eléctrodo impresso/ nanopartículas de ouro/ Glutaraldeído/ Albumina sérica Bovina	Amperometria	0,0112 ppm	(Domínguez-Renedo, Alonso-Lomillo, Ferreira-Gonçalves, & Arcos-Martínez, 2009)
Hg <sup>2+</sup>	Urease	Írídio/ Óxido de Írídio / Poli cloreto de vinilo	Potenciometria	0,1 ppm	(Krawczyk, Moszczyńska, & Trojanowicz, 2000)
Hg <sup>2+</sup>	Urease	PVC-NH <sub>2</sub> / Nanopartículas de ouro	Potenciometria	0,01 ppm	(Yang, et al., 2006)
Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Invertase / Glicose oxidase	Platina / Agarose - (manose : galactose - 2:1)	Voltametria cíclica	0,0001 ppm, 0,006 ppm	(Bagal-kestwal, Karve, kakade, & Pillai, 2008)
Hg <sup>2+</sup>	Invertase / Glicose Oxidase	Membrana	Amperometria	10 ppb	(Bertocchi, et al., 1999)
Hg <sup>2+</sup>	Invertase / Mutarotase / Glicose Oxidase	Platina / Glutaraldeído	Amperometria	3 ppb	(Mohammadi, Amine, Cosnier, & Mousty, 2005)

### 3.6.1. Glicose oxidase

O sensor de glicose oxidase já foi muito estudado, e já se conhece muito bem o mecanismo de acção, assim, podem ser desenvolvidos biossensores com vista a detecção de metais pesados. Pode ser usado uma conjugação de duas enzimas neste tipo de biossensores, a glicose oxidase e a horse radish peroxidase. Esta conjugação faz com que o sinal obtido tenha uma maior resolução. (Gu, Wang, Tu, & Di, 2010) Na equação mostra-se a reacção envolvida no processo.



Após esta reacção, a D-glucono - delta 1,5-lactona é hidrolisada a ácido glucónico. Na superfície do transdutor ocorre a redução do peróxido de hidrogénio a água.

A análise de metais pesados com o biossensor de glicose, baseia-se na inibição da enzima, que vai perdendo a sua capacidade de resposta, para a mesma concentração de glicose, o sinal vai ser menor, e a concentração de metal vai ser proporcional ao decréscimo do sinal. (Guascito & Malitesta, 2005)

Neste tipo de biossensor, é necessário o uso de um mediador por exemplo o ferrocianuro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que reduz o potencial de oxidação electroquímica do peróxido de hidrogénio, de acordo com o esquema apresentado na figura 4. (Ruiz, 2006)

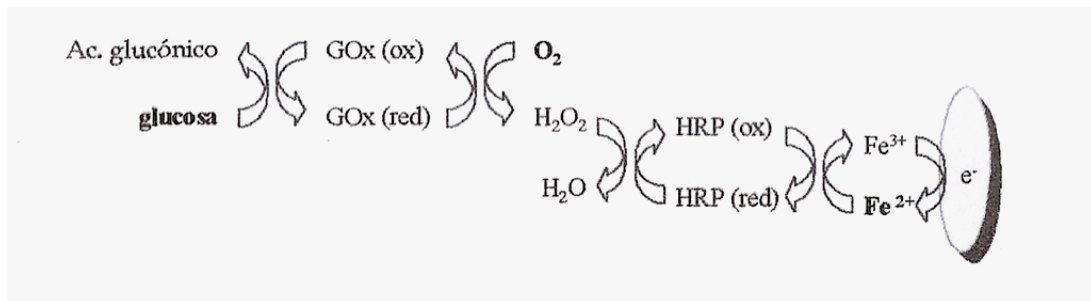


Figura 4 - Mecanismo de oxi-redução de enzimas e produtos na superfície do transdutor. (Ruiz, 2006)

O uso do mediador faz com que o processo de oxi-redução, na superfície do transdutor seja mais rápido.

### 3.6.2. Urease

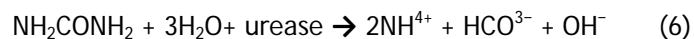
O efeito do ião  $Hg^{2+}$  na enzima urease é devido a ligação a grupos tiol presentes no centro activo. Ensaio baseado na inibição da urease mostram uma alta selectividade na inibição por alguns metais pesados. (Gonçalves, 2008)

Apesar da sua alta sensibilidade e selectividade para os metais pesados, ensaios de inibição da urease têm sido pouco utilizados para a avaliação e identificação de toxicidade devido a problemas com a medição de inibição da urease de amostras ambientais complexas. (Gonçalves, 2008)

O biossensor baseado na imobilização da urease, tem apresentado alguns problemas por perda de sensibilidade da inibição dos iões metálicos, devido a problemas com o processo de imobilização, o método deve ser optimizado para maximizar a estabilidade da enzima e a sensibilidade, assim como a sua afinidade para o substrato e para o inibidor. (Gonçalves, 2008)

Existem outros factores que também afectam a actividade, como a espessura da camada de enzima, a quantidade de enzimas e as condições para manter a actividade enzimática durante a realização da imobilização. (Gonçalves, 2008)

A enzima urease, está presente na maioria dos sistemas biológicos, desempenhando um papel muito importante, catalisando a reacção de decomposição da ureia, na equação está descrita a reacção química. (Gonçalves, 2008)



Este reacção provoca uma alteração do pH, mas para conseguir manter a enzima em estado activo, é necessário o uso de um tampão, de forma a manter o pH do meio. (Gonçalves, 2008)

### 3.6.3. Peroxidase

Este método foi desenvolvido para o mercúrio, devido ao efeito inibitório apresentado sobre a actividade catalítica da horse radish peroxidase imobilizada em quitosano. A oxidação de o-dianisidina, o-fenilenodiamina e de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) foi utilizada como indicador. A tioureia também inibiu a enzima e aumentou o efeito inibitório do mercúrio (II), e esteve presente em todas as reacções dos indicadores. Neste método foi utilizada a enzima imobilizada em placas de poliestireno e papel cromatografico. As mesmas reacções podem ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de inibição enzimática para determinação de compostos de mercúrio. A feniltioureia e a dietilditiocarbamato aumentam o efeito dos compostos de mercúrio. (Shekhovtsova, Muginova, & Bagirova, 1997)

A reacção que ocorre na superfície do transdutor que é inibida é dada por:

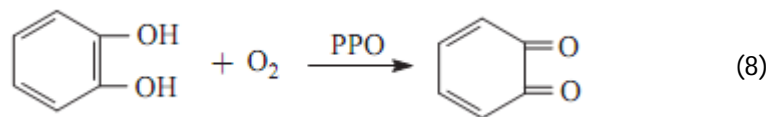


A enzima quando está no estado oxidado é conectada à superfície do transdutor, por um mediador livre ou então por difusão directa, libertando electrões e voltando ao estado reduzido. (Zhu, Yang, Zhai, & Tian, 2007)

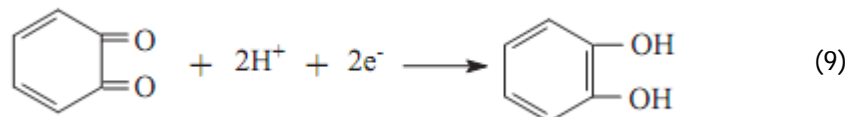
### 3.6.4. Polifenol oxidase

O biossensor de polifenol oxidase (PPO) tem sido considerado como um método promissor para a análise de fenóis devido à sua simplicidade e eficácia. (Tan, Kan, & Li, 2011)

A polifenol oxidase é uma metalo enzima com dois iões de cobre no centro activo. Na presença de oxigénio, há a reacção catalítica do catecol, que dá origem à o-quinone. Podemos ver a reacção na equação. (Tan, Kan, & Li, 2011)



A regeneração da o-quinona no catecol dá-se na superfície do eléctrodo e está descrito na equação. (Tan, Kan, & Li, 2011)



Na figura 5 podemos ver o processo de oxi-redução do catecol, assim, podemos inibir a polifenol oxidase e obter uma resposta ao metal, visto que esta enzima é uma metalo enzima, e vamos substituir o cobre do centro activo da enzima. (Akyilmaz, Kozgus, Türkmen, & Çetinkaya, 2010)

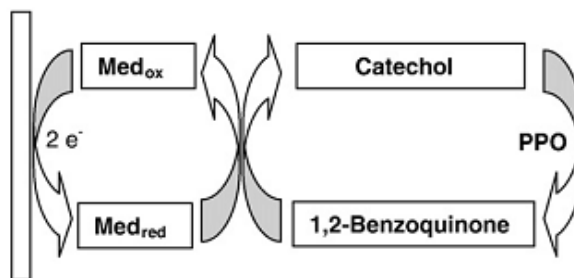


Figura 5 - Mecanismo de oxi-redução da polifenol oxidase. (Akyilmaz, Kozgus, Türkmen, & Çetinkaya, 2010)

## 4. Parte Experimental

### 4.1. Reagentes

Para a preparação foram utilizados os reagentes que constam na tabela 6, em que se apresenta o reagente, bem como a fórmula, a pureza e a marca.

Tabela 6 - Lista de reagentes utilizados, bem como a sua pureza e marca.

Nome	Fórmula	Pureza	Marca
Dodecilbenzeno sulfato de sódio	$C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na$		Sigma-Aldrich
Fosfato de Potássio monobásico	$H_2KPO_4$	≥99%	Sigma-Aldrich
Fosfato de Potássio dibásico	$HK_2PO_4$	≥98%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Mercúrio (II) P.A.	$HgCl_2$	99,5%	Absolve
Cloreto de Chumbo (II)	$PbCl_2$	≥99%	Merck
Polietileno glicol 1500			Fluka
Ureia	$CH_4N_2O$	≥98%	Sigma-Aldrich
Glutaraldeído 25% em $H_2O$		25%	Sigma-Aldrich
Albumina sérica Porcina		98%	Sigma
Pirrol	$C_4H_5N$	98%	Aldrich
Peróxido de Hidrogénio 30% (100V)	$H_2O_2$	30%	Panreac
Cloreto de Sódio	$NaCl$	99,5%	Panreac
Hidróxido de Sódio	$KOH$	puro	Pronalab
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	87,5%	Pronalab
Urease			Sigma-Aldrich
Maça Royal Gala			Produtor
Batata-doce			Continente
Mirtilo			Produtor

### 4.2. Aparelhos e Software

Para a pesagem foram utilizadas duas balanças, a Mettler PM480 DeltaRange®, figura 6, utilizada para a preparação de soluções tampão.



Figura 6 - Balança analítica de marca Mettler

Para a preparação de soluções padrão, e para a preparação da mistura de imobilização, utilizou-se a balança Mettler AE 260 DeltaRange®, figura 7.



Figura 7 - Balança de precisão marca Mettler

Para a obtenção de água purificada, utilizou-se um sistema de ultrafiltração, figura 8, para utilização na lavagem de material, a qual continha uma condutividade de  $3.2 \mu\text{S}/\text{cm}$ .



Figura 8 - Unidade de ultrafiltração.

Para a preparação das soluções foi utilizada água ultra pura, em que foi utilizada água já purificada, através do sistema de ultrafiltração e foi utilizado um aparelho de marca Millipore, um sistema Milli Q Plus 185, figura 9, cuja condutividade era de  $0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$ .



Figura 9 - Unidade de produção de água milli Q.

Para a medição e ajuste do pH, foi utilizado o aparelho de marca Vernier, modelo LabQuest, com um sensor de pH da mesma marca, figura 10.

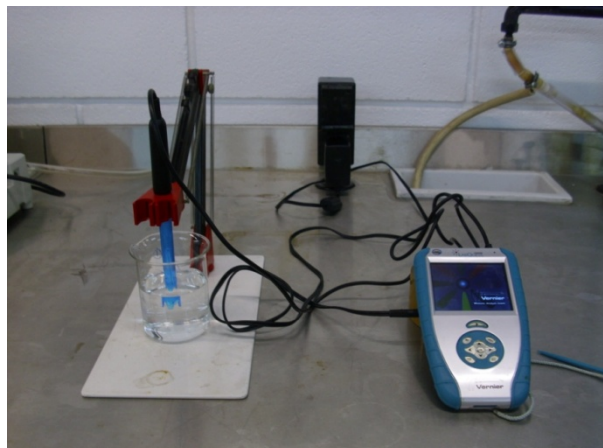


Figura 10 - Unidade de medição de pH, de marca Vernier.

Para a preparação do eléctrodo de trabalho, foi utilizado um combinado de Marca LG, figura 11, este equipamento também foi utilizado para a conservação das enzimas bem como dos reagentes.



Figura 11 - Frigorífico de Marca LG para conservação de reagentes e utilização no método de imobilização.

Para a preparação de eléctrodos e medidas electroquímicas, foi utilizado um potenciostato/Galvanostato tipo PJT 35-2 de marca Tacussel, figura 12.

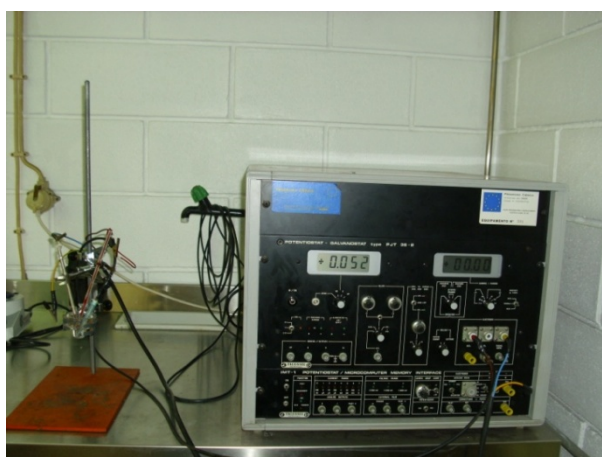


Figura 12 - Potenciostato/Galvanostato utilizado para medições electroquímicas e preparação de transdutores.

Para a aquisição de dados, utilizou-se o LabQuest Mini de marca Vernier, com dois sensores, o Amplificador de corrente e o sensor de diferença de potencial, figura 13.



Figura 13 - Unidade de registo de sinal proveniente do potenciostato.

Quando o potenciostato avariou, começou-se a utilizar outro potenciostato, o PGZ 301 da marca Voltalab®, figura 14.



Figura 14 - Potenciostato / Galvanostato mais avançado.

A análise de dados foi feita através do software STATGRAPHICS Centurion XV para o desenho de experiências, PROGRESS para as regressões e DETARCHI para o cálculo do limite de detecção (LOD)

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Aprisionamento com polipirrol

Na preparação do eléctrodo de trabalho, foi utilizado 10 mL de solução com Dodecilbenzeno sulfato de sódio (DBSS) e polietileno glicol (PEG) e adicionado Pirrol, e foi feita a deposição a um potencial fixo durante determinado tempo, após esta deposição foi feita outra deposição com a outra solução contendo os mesmos reagentes nas mesmas quantidades e adicionada a enzima. O DBSS é um detergente e tem como função promover a uniformização do polímero e o PEG é um polímero, que vai actuar como co-polímero de forma a aumentar a estabilidade do polipirrol. Foram testadas várias concentrações de DBSS e dois potenciais e diferentes tempos como apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Preparação de um eléctrodo de pirrol, diferentes condições e utilização de co-polímeros.

Eléctrodo / Camada	Volume	DBSS	PEG	Pirrol	Enzima	Potencial	Tempo
1/1	10 mL	0,1 g	0,05 g	50 µL	-	600 mV	1 h
2/1	10 mL	0,1 g	0,05 g	25 µL	-	600 mV	1 h e 45 minutos
3/1	10 mL	0,1 g	0,05 g	25 µL	-	600 mV	1 h
4/1	10 mL	0,1 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	1 h
4/2	10 mL	0,1 g	0,05 g	25 µL	20 µL	800 mV	1 h
5/1	10 mL	0,01 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	40 minutos
6/1	10 mL	0,005 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	30 minutos
7/1	10 mL	0,001 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	1 h
8/1	10 mL	0,004 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	15 minutos
8/2	10 mL	0,004 g	0,05 g	25 µL	100 µL	800 mV	15 minutos
9/1	10 mL	0,004 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	15 minutos
9/2	10 mL	0,004 g	0,05 g	25 µL	-	800 mV	15 minutos

#### Peroxidase

Para a extracção da peroxidase, foram utilizados um fruto e um tubérculo, a maçã da variedade Royal Gala e a Batata-doce. Para ambos procedeu-se à extracção de 10 g de

substrato com 10 mL de tampão fosfato (50 mM pH 5,0) a 4°C e homogeneizou-se num liquidificador e filtrou-se em tecido de algodão e centrifugaram-se a 17.000xg durante 20 minutos a 4°C. (VALDERRAMA, MARANGONI, & CLEMENTE, 2001)

O sobrenadante é a fonte da enzima livre, e é utilizado neste método geral em que se utiliza o polipirrol com determinada quantidade de enzima.

## Urease

A urease foi preparada utilizando todo o conteúdo do frasco em 10 mL de tampão fosfato (50 mM pH=7.0), armazenada a -15°C em várias tomas para várias reutilizações e foram imobilizada diferentes quantidades através do método de imobilização em que se utiliza o polipirrol.

### 4.3.2. Entrecruzamento com glutaraldeído

O eléctrodo de trabalho é preparado de acordo com a ilustração 1, em que se mistura 5 mg de Albumina Sérica Porcina com 1 mL de Tampão fosfato pH= 6,3, desta mistura retira-se 6,8 µL e junta-se com 20 µL de Enzima e 3,2 µL de Tampão fosfato pH= 6,3, desta mistura retira-se 5 µL e junta-se com 5 µL uma mistura de 100 µL de Glutaraldeído e 900 µL de Tampão fosfato pH= 6,3. Aplica-se apenas 5 µL da mistura final sobre a superfície do eléctrodo, foi testado o eléctrodo de grafite e o eléctrodo de carbono vítreo, mas tivemos de optar apenas pelo eléctrodo de carbono vítreo, pois a potenciais muito elevados, como foram testados com a urease, o eléctrodo de grafite começou a danificar-se. (Gonçalves, 2008)

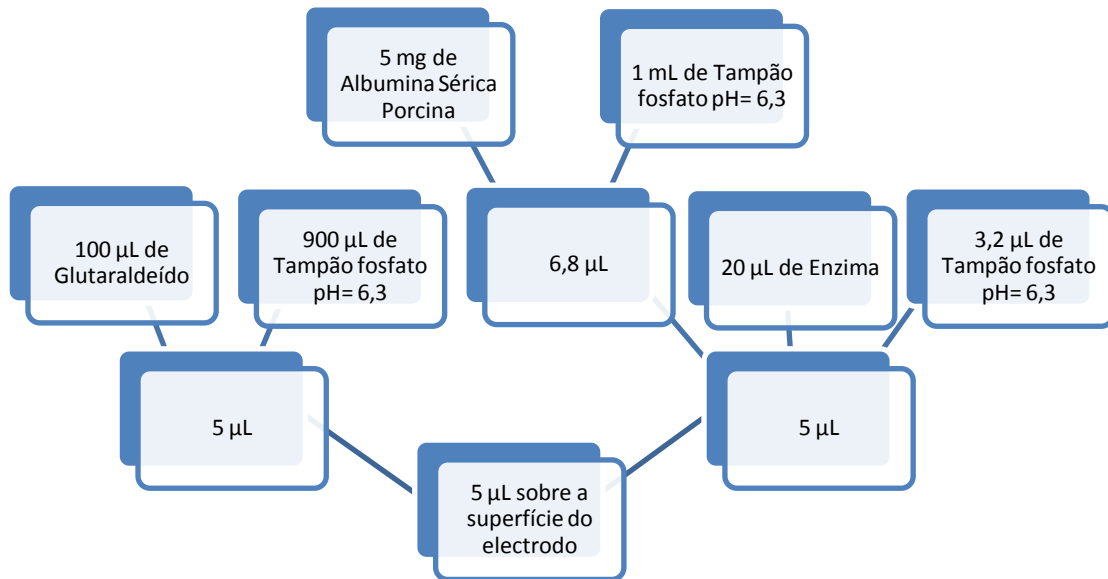


Ilustração 1 - Ilustração das quantidades e formas de mistura dos reagentes utilizados na preparação da imobilização no método do glutaraldeído.

Ficou em repouso no frigorífico durante 1h e 30 minutos, se não estivesse seco, deixava-se ao ar até ficar seco.

A extracção das enzimas do mirtilo foi feita de uma forma simples e rápida para preservar o máximo de actividade por parte das enzimas. Foram seleccionadas 3 a 4 bagas e adicionados 5 mL de tampão fosfato (50 mM pH=7). Homogeneizou-se com a ajuda de um pilão, foi filtrado a vácuo e utilizado o sumo resultante, que continha a enzima livre.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Aprisionamento com polipirrol

Neste método foram utilizadas várias concentrações de DBSS, e optou-se por diminuir a sua concentração, devido a estar relacionado com a corrente de fundo, ou seja, quanto maior a quantidade de DBSS maior era a corrente, mas também ao diminuir a concentração de DBSS a estabilidade do polímero diminuía drasticamente, podendo utilizar o mesmo eléctrodo uma única vez.

#### 5.1.1. Peroxidase

Com vista a poupar recursos optou-se por extrair enzimas a partir de produtos de baixo custo e de uso comum, como a fruta e os tubérculos apresentam a enzima peroxidase, procedeu-se a sua extracção e imobilização.

#### Maça Royal Gala

No início começou-se por fazer voltametria cíclica, para verificar a existência da enzima imobilizada e o potencial a que ocorria a oxi-redução do peróxido, no gráfico 1, apresenta-se o voltamograma que representa o potencial *versus* intensidade de corrente, neste caso apresenta-se a intensidade de corrente em mV pois utilizou-se um amplificador que registava o potencial, que está relacionada directamente com a intensidade.

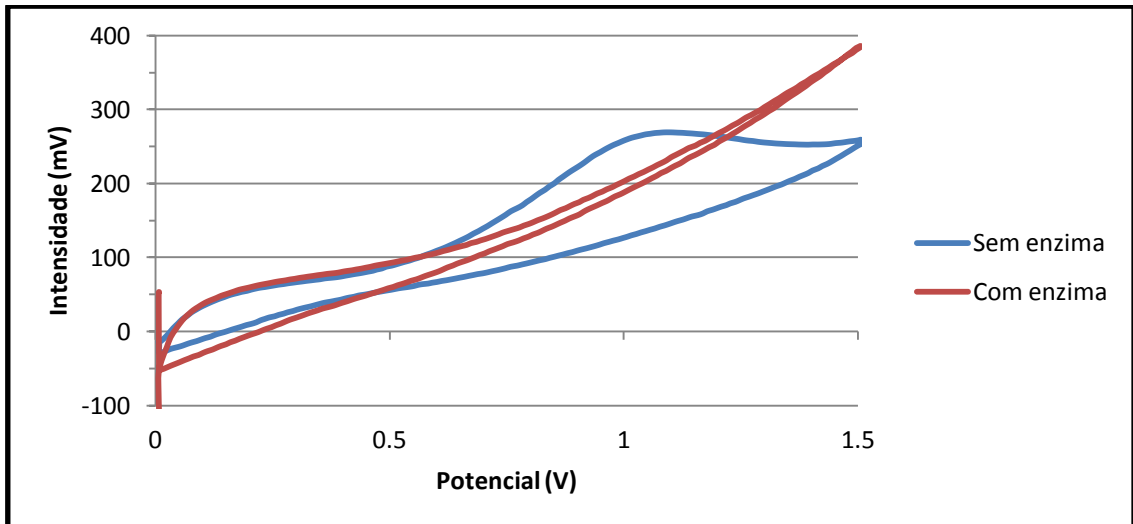


Gráfico 1 - Voltametria cíclica de um eléctrodo de platina com uma camada de polipirrol, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, em 1º electrodo sem enzima e depois electrodo com enzima.

Após a voltametria cíclica, foi preparado outro eléctrodo, foi realizada uma cronoamperometria em que foram testados dois potenciais aplicados, 400 mV e 600 mV, utilizando como eléctrodo de referência o eléctrodo de prata/cloreto de prata, foi adicionado à solução no decorrer do ensaio 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 Volumes, deixando estabilizar. Após a adição do peróxido de hidrogénio foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução contendo iões de mercúrio de estado de oxidação 2+, com uma concentração de  $2,65 \times 10^{-4}$  M. No cronoamperograma em que se utilizou um potencial de 400 mV apenas se notou o efeito da adição. Nos cronoamperogramas em que se utilizou um potencial de 600 mV havia um decréscimo na corrente, ou seja, havia a inibição da corrente provocada pela adição dos iões de mercúrio. Podemos ver os cronoamperogramas no gráfico 2.

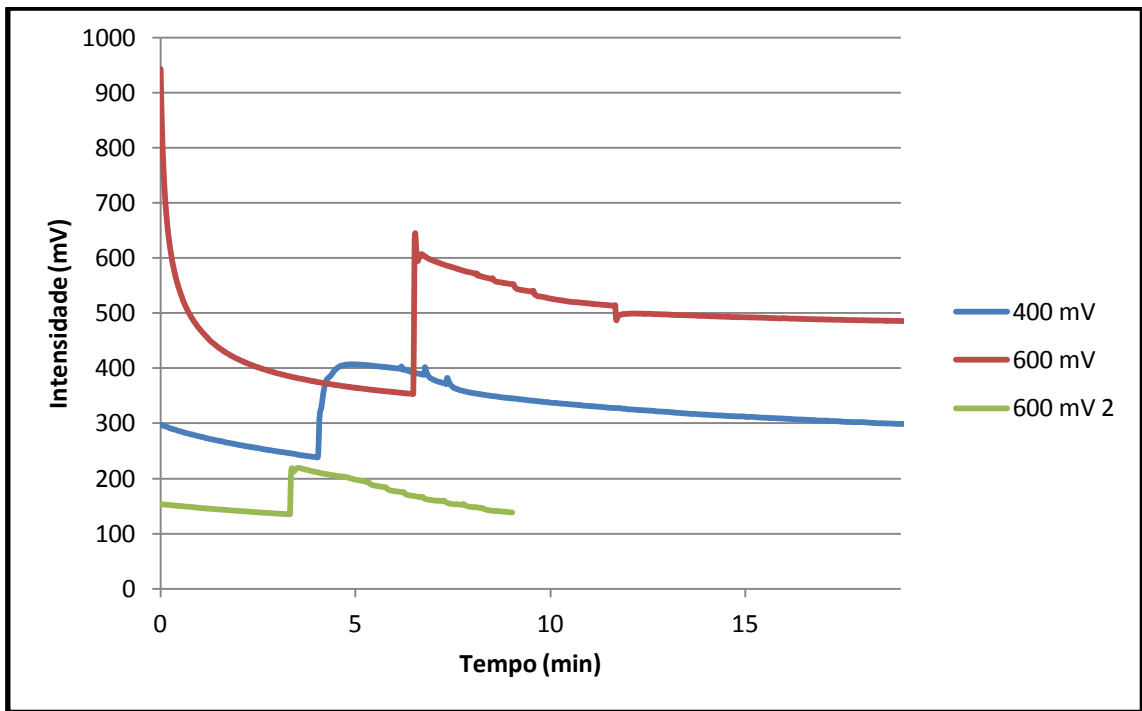


Gráfico 2 - Cronoamperograma a vários potenciais, com um eléctrodo de platina/polipirrol e adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 Volumes, e inibição com  $Hg^{2+}$ .

Podemos ver no gráfico 3 o cronoamperograma a um potencial de 600 mV e 9 adições de 100  $\mu L$  de  $Hg^{2+}$  a  $2.65E^{-4}M$  mais em pormenor.

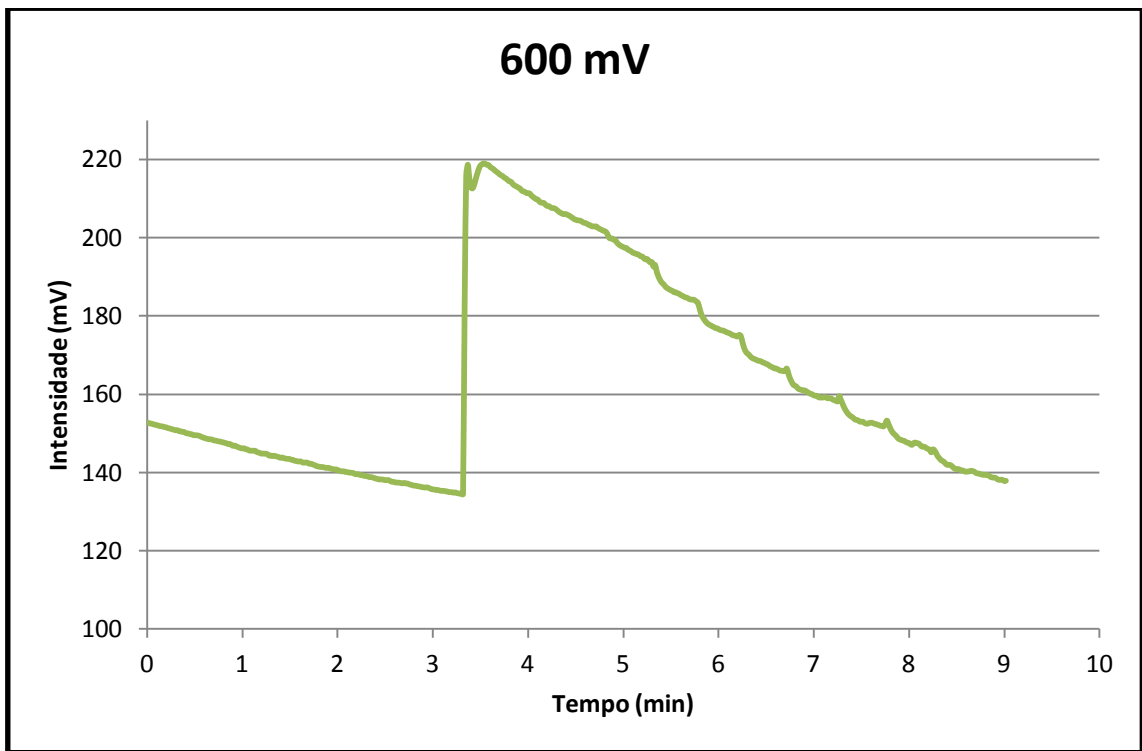


Gráfico 3 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e 9 adições de 100  $\mu L$  de mercúrio  $2.65 \times 10^{-4} M$

Deixámos de utilizar este método devido a vários factores, tem uma corrente de fundo elevada, ou seja, baixa resolução, e que este fruto é de produção própria, sem aplicação de produtos químicos, os frutos que foram adquiridos depois não apresentavam tanta actividade, e a resposta era quase nula.

### Batata-doce

Devido aos problemas encontrados com os frutos da maçã, resolveu optar-se pela batata-doce, que também contém a enzima peroxidase. Fizeram-se alguns cronoamperogramas a um potencial de 600 mV e foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 Volumes, após essa adição, deixou-se estabilizar e fizeram-se várias adições de 100 µL de mercúrio a  $2.65 \times 10^{-4}$  M, mas a resposta era quase nula, devido a má resolução. Podemos ver os cronoamperogramas no gráfico 4.

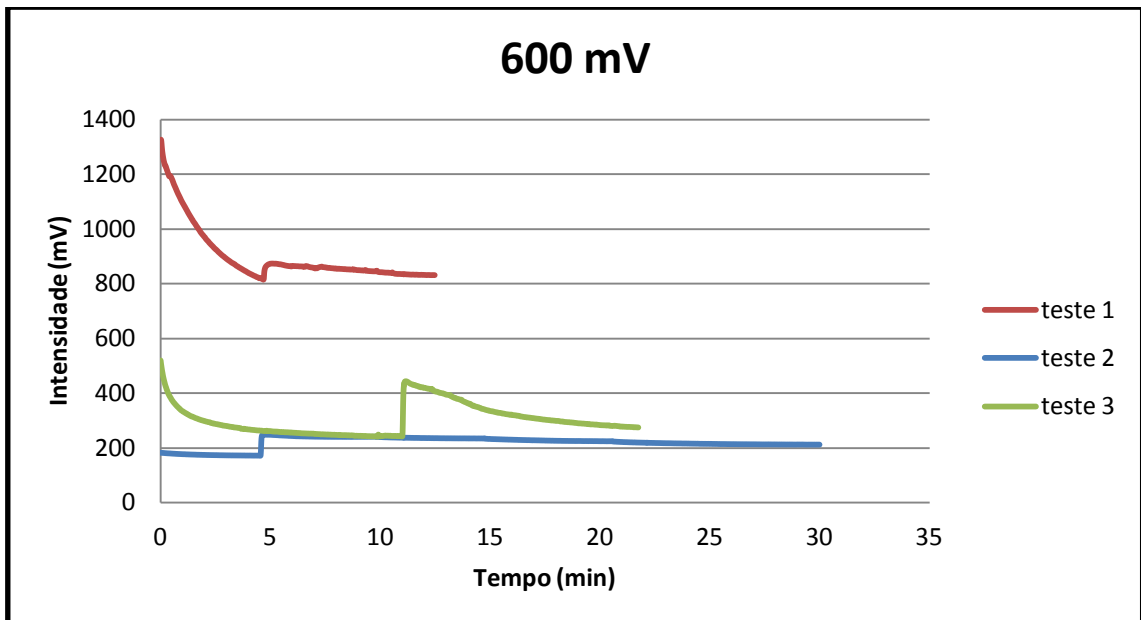


Gráfico 4 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e adições de 100 µL de mercúrio  $2.65 \times 10^{-4}$  M

Como podia ocorrer a oxidação da enzima a 600 mV, testamos um potencial mais baixo, 0 mV, em que não ocorre uma oxidação, mas sim uma redução do peróxido, podemos ver o cronoamperograma no gráfico 5.

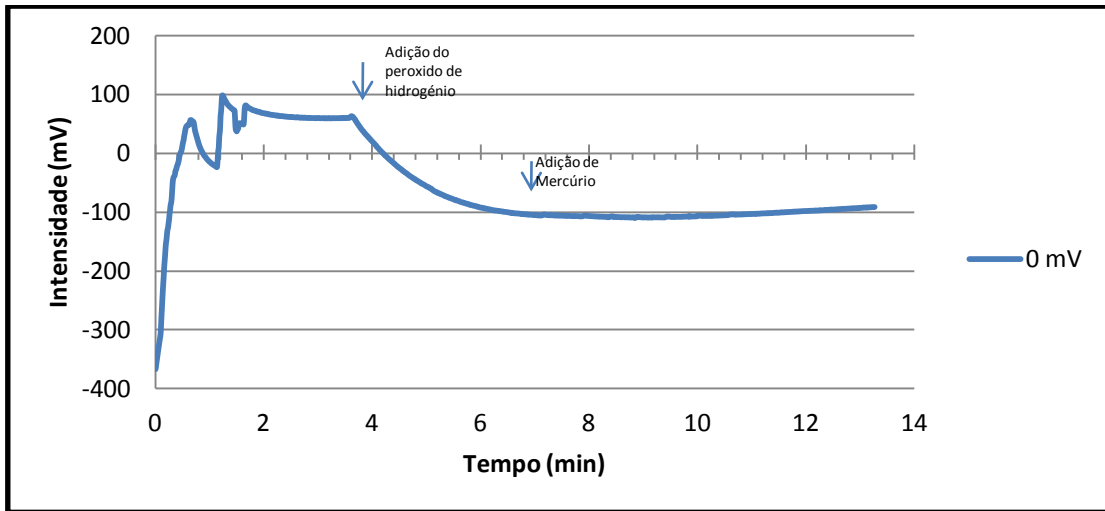


Gráfico 5 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol com peroxidase imobilizada, com adição de 1 mL de peróxido de hidrogénio a 10 volumes, e adições de 100  $\mu$ L de mercúrio  $2.65 \times 10^{-4}$  M

### 5.1.2. Urease

Devido aos problemas encontrados, decidiu-se utilizar uma enzima comercial, cuja concentração de enzima é sempre a mesma, e assim, procedeu-se a testes à urease, cujo mecanismo já é muito conhecido, e assim procedeu-se a vários testes cujo objectivo era encontrar o melhor potencial para realizar os cronoamperogramas, podemos ver os cronoamperogramas no gráfico 6.

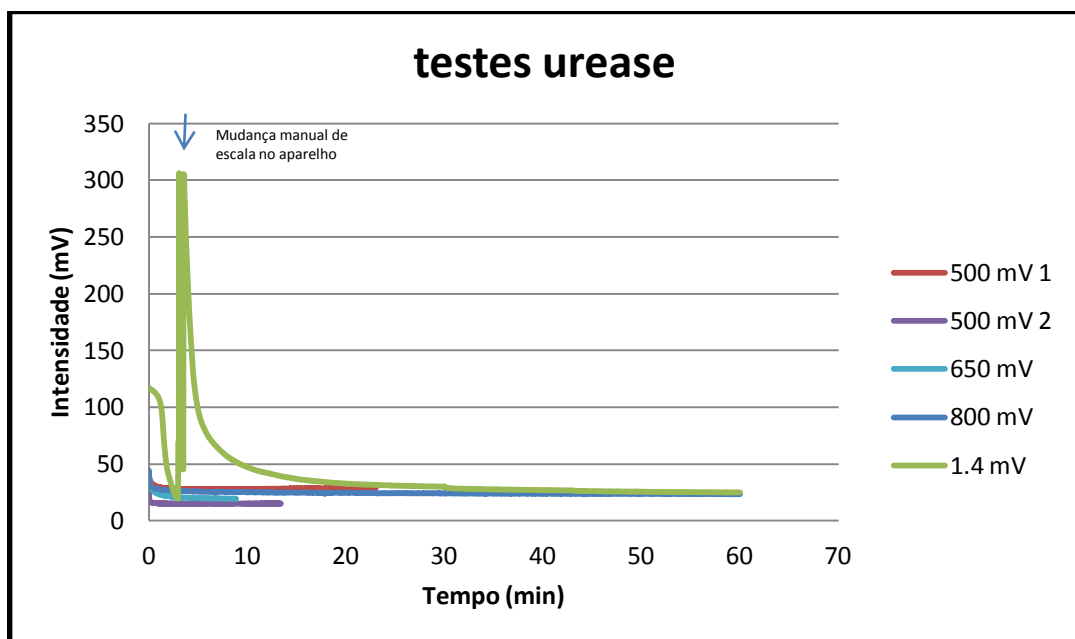


Gráfico 6 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, e adição de ureia.

No gráfico 7, podemos ver numa escala ampliada, em vemos as adições de ureia, e só a potenciais mais elevados é que há resposta da ureia. Mas a 1.4 V a resposta é de uma redução, que é provocada pela hidrólise da água a este potencial, e assim não se pode utilizar potenciais tão elevados.

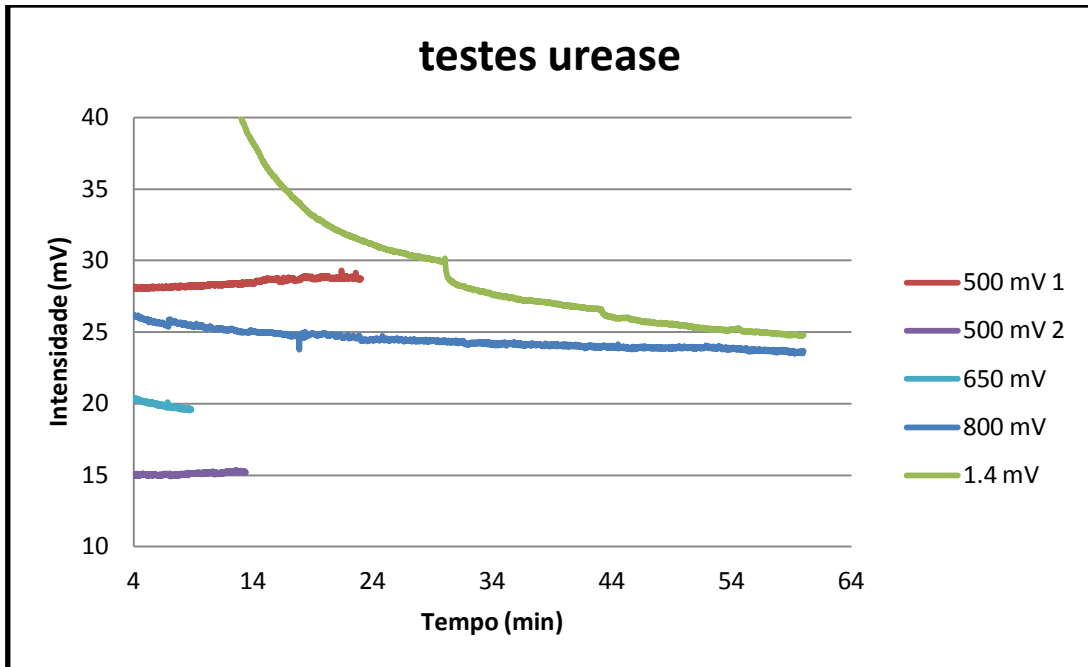


Gráfico 7 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, e adição de ureia. (escala ampliada)

Fizeram-se dois cronoamperogramas a 900 mV, e fez-se a adição de ureia, em que houve resposta à ureia, mas não houve resposta à adição de 100  $\mu\text{L}$  de mercúrio com uma concentração de  $2.65 \times 10^{-4} \text{M}$ , como se pode ver no gráfico 8.

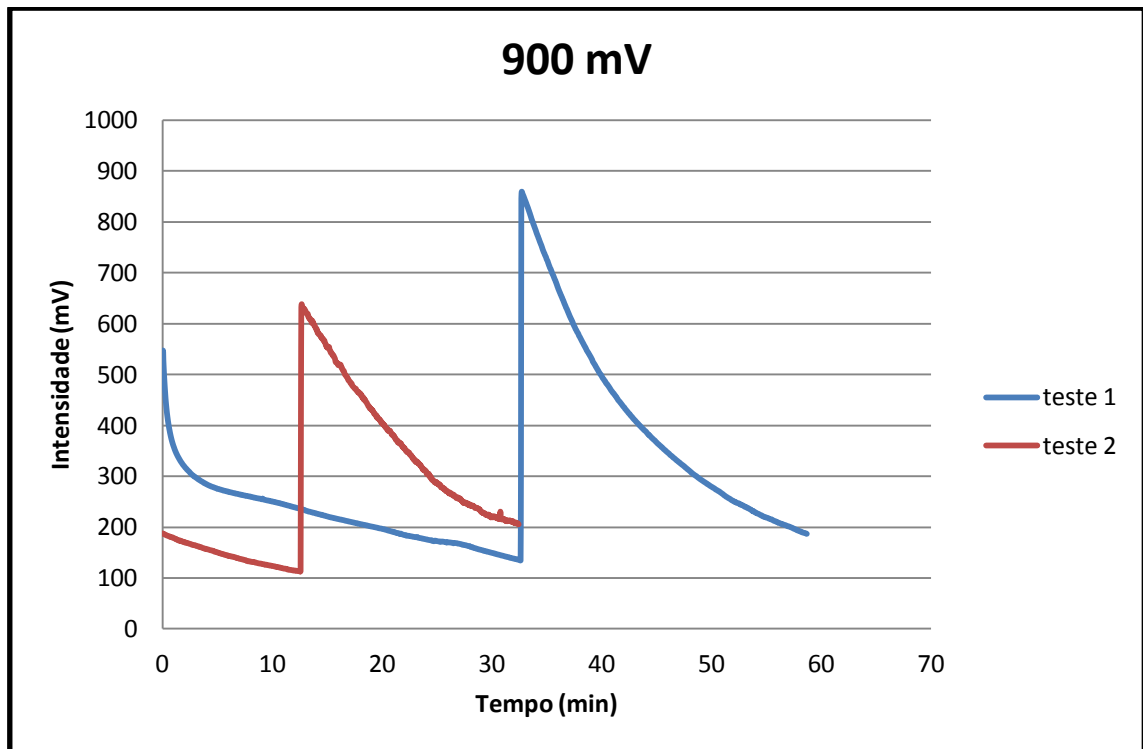


Gráfico 8 - Cronoamperograma com um eléctrodo de platina/polipirrol, com a enzima urease imobilizada, adição de ureia e 100  $\mu\text{L}$  adição de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $2.65 \times 10^{-4}\text{M}$

Como não houve resposta do metal, resolvemos mudar de método de imobilização. Para um método em que não fosse preciso submeter a enzima a uma oxidação durante a imobilização, em que se procedeu a polimerização do polipirrol.

## 5.2. Entrecruzamento com glutaraldeído

### 5.2.1. Urease

Foi feito um desenho experimental de forma a encontrar as melhores condições experimentais. As variáveis analisadas foram o potencial e o pH, variando o potencial entre 0 V e 1 V e o pH entre 4 e 8, obtivemos como resposta a intensidade de corrente quando adicionada a mesma quantidade de ureia. Podemos ver os intervalos analisados bem como a resposta obtida na tabela 8.

Tabela 8 - Valores do desenho experimental, em que foi testado o potencial e o pH, para um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada através do método do glutaraldeído.

Potencial (V)	pH	Intensidade (mV)
0	6	-26.7
0	6	-27
-1	4	0
-1	8	0
1	8	130
0	8	-32.9
0	6	-22
0	4	-35.3
1	4	200

Pela análise dos resultados obtidos, podemos concluir que quanto maior a intensidade, maior é a resposta. Podemos observar através do gráfico 9 essa variação, quanto ao pH, este não afecta muito a intensidade de corrente.

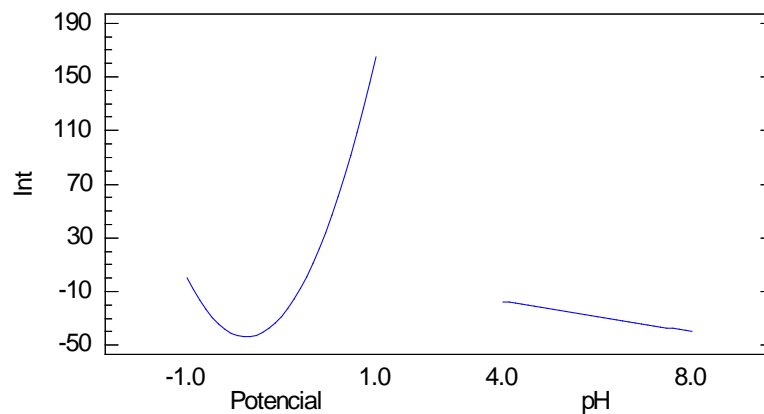


Gráfico 9 - Variação da resposta do desenho experimental ao Potencial e ao pH separadamente.

Para podermos ter uma noção melhor do que esperar para potenciais mais elevados, fizemos outro desenho experimental, de forma a analisar apenas potenciais positivos entre 0,7 V e 1,5 V e um pH perto da neutralidade. Podemos ver na tabela 9 os valores analisados e a resposta obtida.

Tabela 9 - Valores do desenho experimental, em que foi testado potenciais mais elevados e o pH mais próximo da neutralidade, para um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada através do método do glutaraldeído.

Potencial (V)	pH	Intensidade (mV)
1.5	6.5	113
1.5	7.5	269
1.1	7.7	23
0.5	7.0	-8.4
1.1	7.0	15.2
1.1	6.3	44
1.1	7.0	14
0.7	7.5	-12.5
1.7	7.0	467
0.7	6.5	-6.3

Pela análise dos resultados obtidos, podemos concluir que quanto maior a intensidade, maior é a resposta. Podemos observar através do gráfico 10 essa variação.

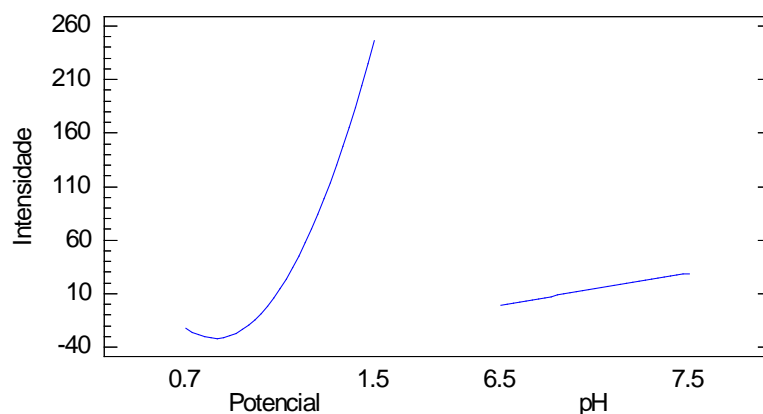


Gráfico 10 - Variação da resposta do desenho experimental ao Potencial e ao pH separadamente.

Após estes resultados, optou-se por fixar um potencial de 1,1V devido a que a potenciais mais elevados começa a ocorrer hidrólise da água e o pH utilizado foi de 7. Utilizando as condições fixadas, procedeu-se a uma cronoamperometria em que foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e após uns minutos, começaram-se a fazer adições de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  com uma concentração de  $2.65 \times 10^{-4}$  M.

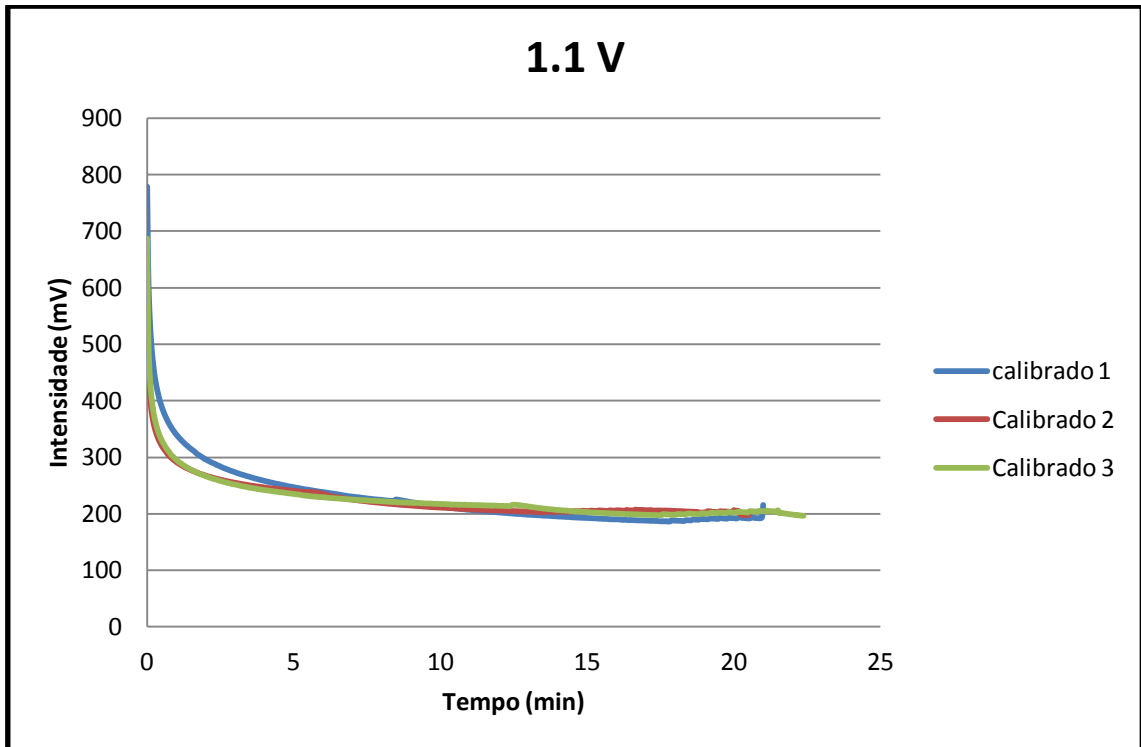


Gráfico 11 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada com glutaraldeído e testado um potencial de 1.1V e um pH de 7, a solução tampão já continha uma concentração de ureia de 1M.

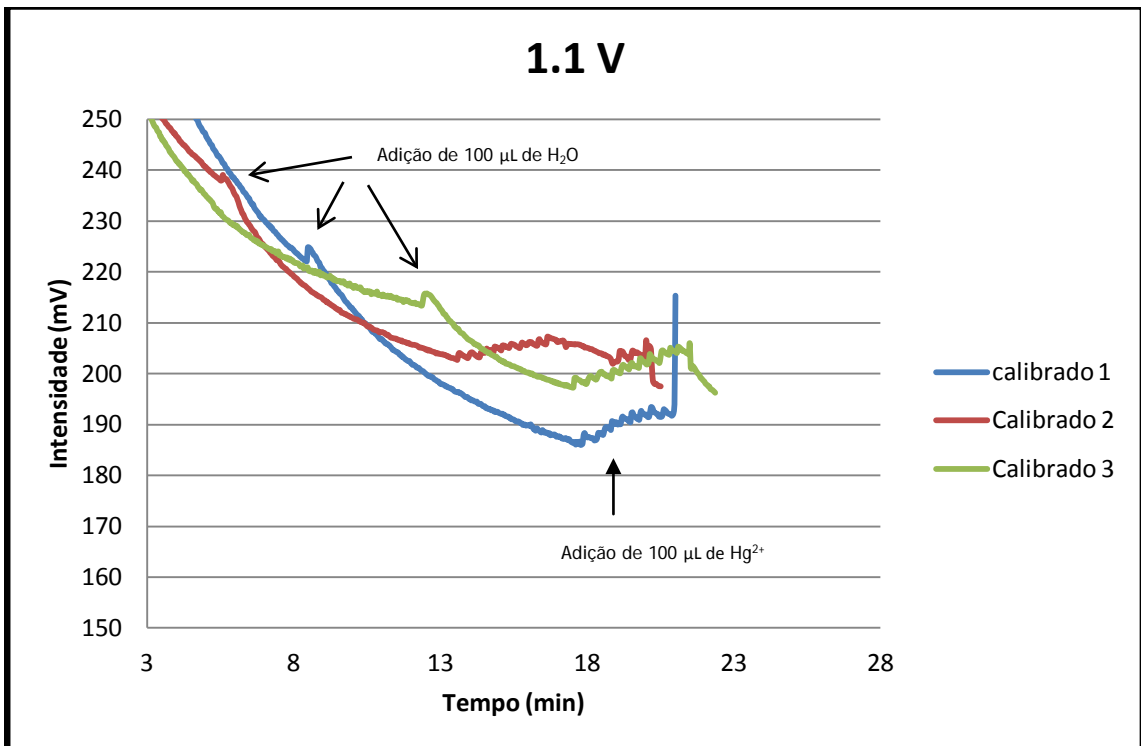


Gráfico 12 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com urease imobilizada com glutaraldeído e testado um potencial de 1.1V e um pH de 7, a solução tampão já continha uma concentração de ureia de 1M (escala ampliada).

Após a análise dos gráficos 11 e 12, podemos concluir que há uma resposta por parte do metal, mas não pudemos continuar o estudo devido a perda total da actividade por parte da enzima, e devido a problemas orçamentais, não pudemos obter um novo lote de enzima purificada.

### 5.2.2. Polifenol oxidase

Para verificar o potencial de oxi-redução do catecol, imobilizou-se um extracto de mirtilo na superfície do eléctrodo de carbono vítreo e fez-se voltametria cíclica em que se fez o branco, adicionou-se catecol e tentou-se fazer a sua inibição, mas o que se passou na superfície do eléctrodo não foi uma inibição mas sim a polimerização do catecol. Se se efectua-se uma voltametria cíclica sem adição de mercúrio, na presença de apenas catecol, ia ocorrer a mesma coisa, ia haver uma diminuição da corrente. Podemos verificar isso através do gráfico 13.

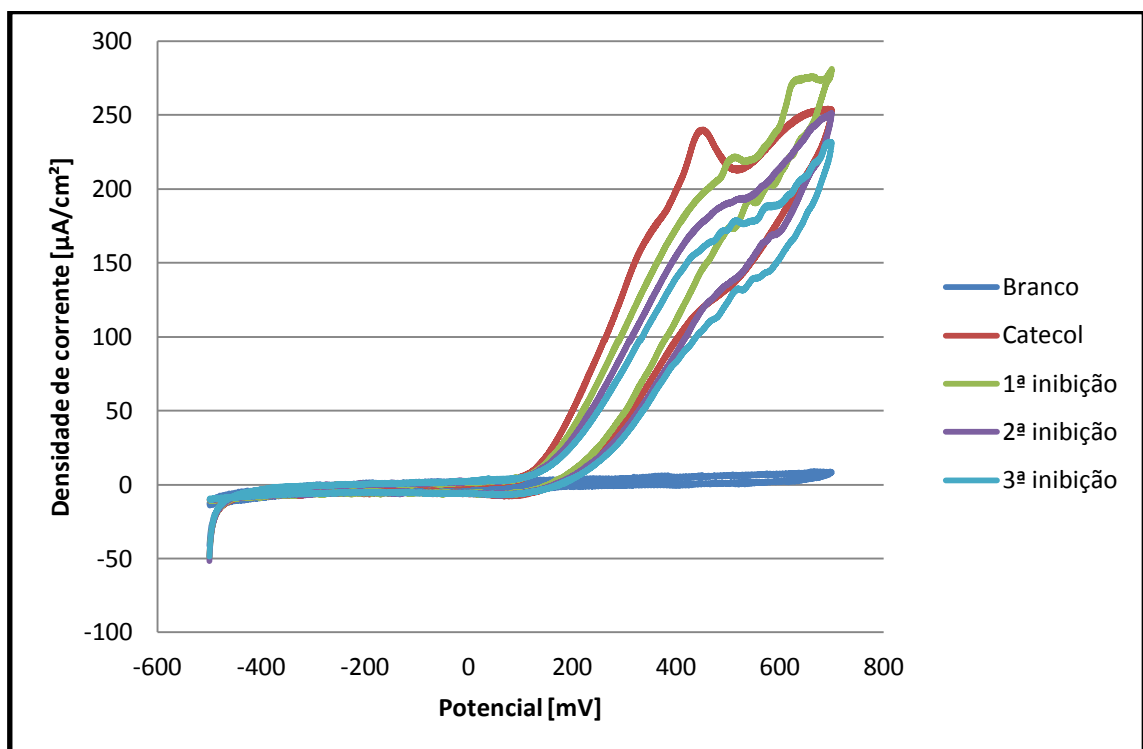


Gráfico 13 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase imobilizada proveniente de um extracto de mirtilo.

No gráfico 14 podemos ver que quanto maior a quantidade de catecol maior é a resposta.

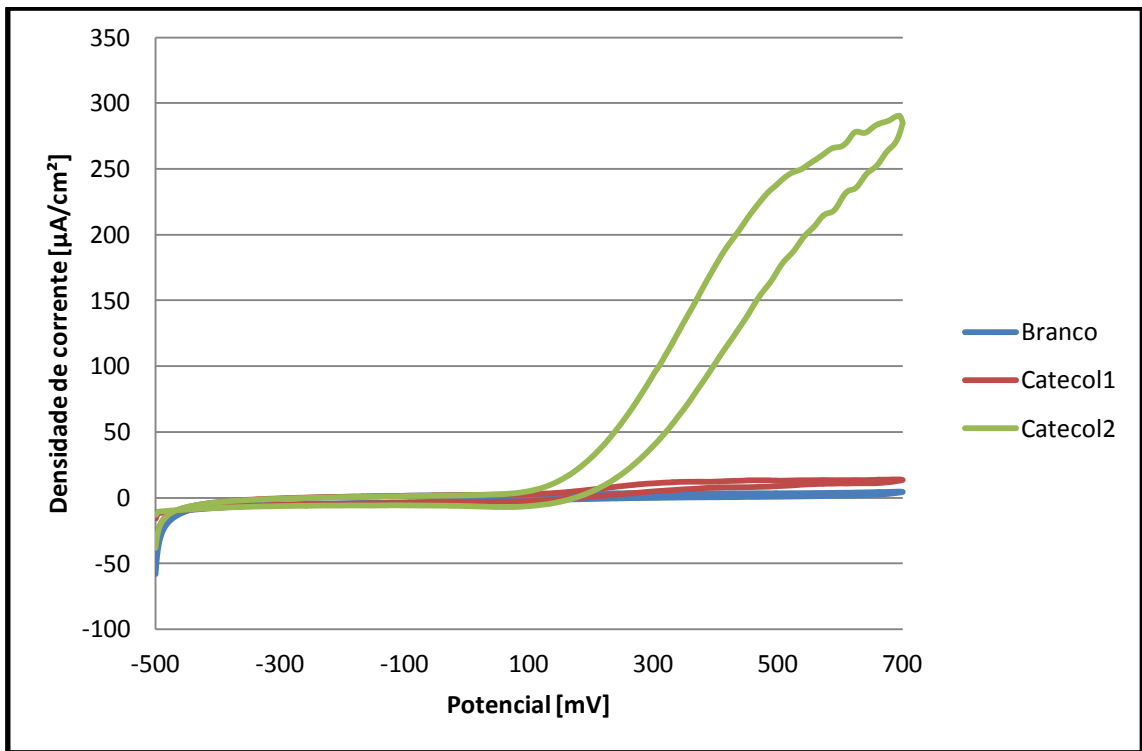


Gráfico 14 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase imobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, várias concentrações de catecol.

No gráfico 15 podemos ver um cronoamperograma efectuado a um potencial de 100 mV e a um pH de 7, e quando ocorre a adição de 200 µL de catecol a 0.1M há uma diminuição da corrente. Foi repetido este ensaio várias vezes, mas não era reprodutível.

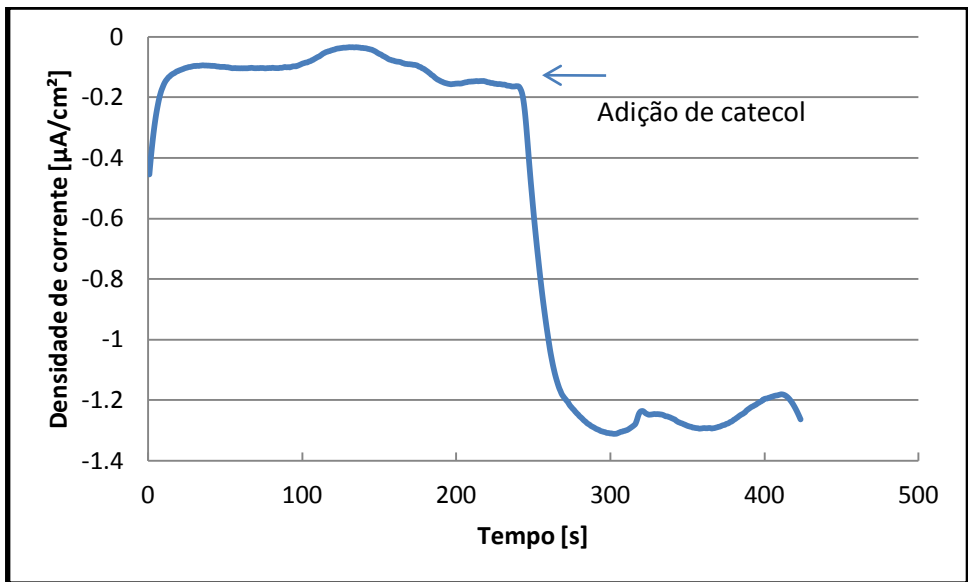


Gráfico 15 - Cronoamperograma com um eléctrodo de carbono vítreo com polifenol oxidase imobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, com adição de catecol.

### 5.2.3. Peroxidase

Foi testada também a enzima peroxidase, presente em muitas plantas, e através deste método conseguimos imobilizar esta enzima mantendo assim a sua actividade.

O fruto que foi utilizado na extracção da enzima foi o mirtilo, que é uma baga que contém uma grande quantidade da enzima peroxidase e da enzima polifenol oxidase, normalmente estas duas enzimas encontram-se sempre nos mesmos frutos.

Para verificar a oxi-redução do peróxido fez-se uma voltametria cíclica e verificou-se que entre os -100 mV e os 50 mV não há oxidação nem redução, o que leva a optar por um potencial intermédio, garantindo que não há oxi-redução do peróxido de hidrogénio nem do catecol, podemos verificar isso através do gráfico 16.

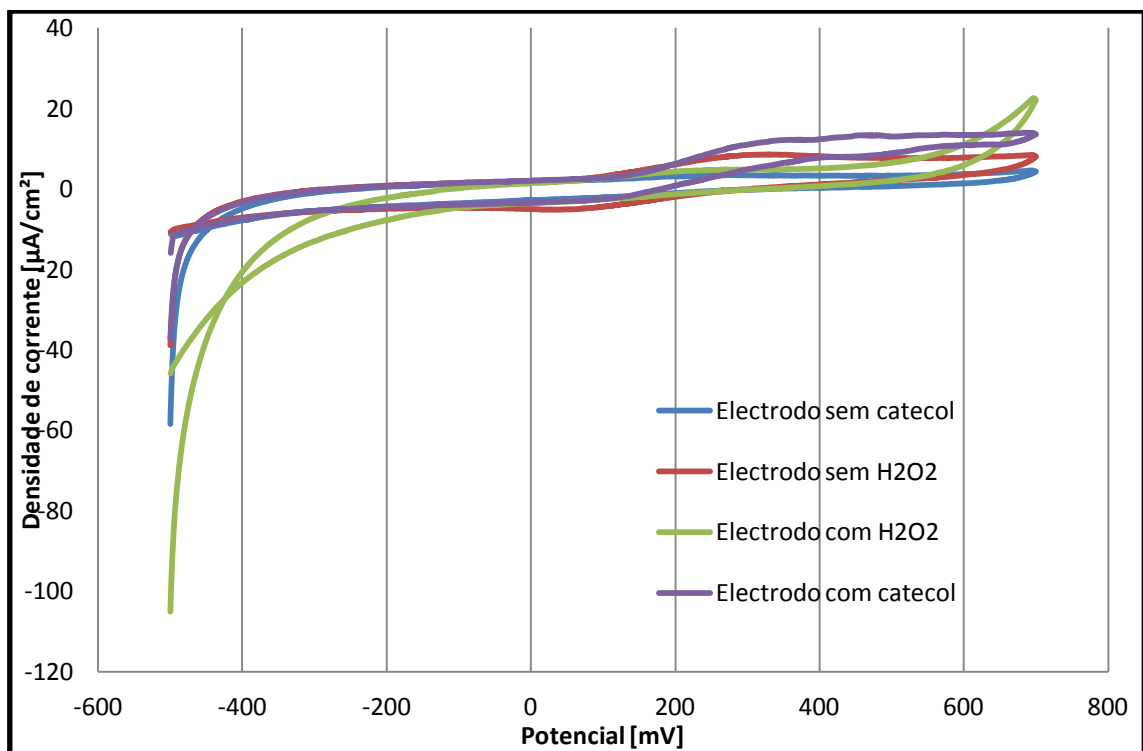


Gráfico 16 - Voltametria cíclica com um eléctrodo de carbono vítreo com peroxidase e polifenol oxidase imobilizada proveniente de um extracto de mirtilo.

Após a voltametria cíclica, optou-se por fazer uma cronoamperometria a 0 mV, de forma a garantir que não ocorria degradação da enzima na superfície do eléctrodo, durante a cronoamperometria foi adicionado peróxido de hidrogénio, e testou-se a sua inibição, e essa resposta pode ser observada através do gráfico 17. A inibição foi feita adicionando chumbo, e conseguimos obter uma inibição.

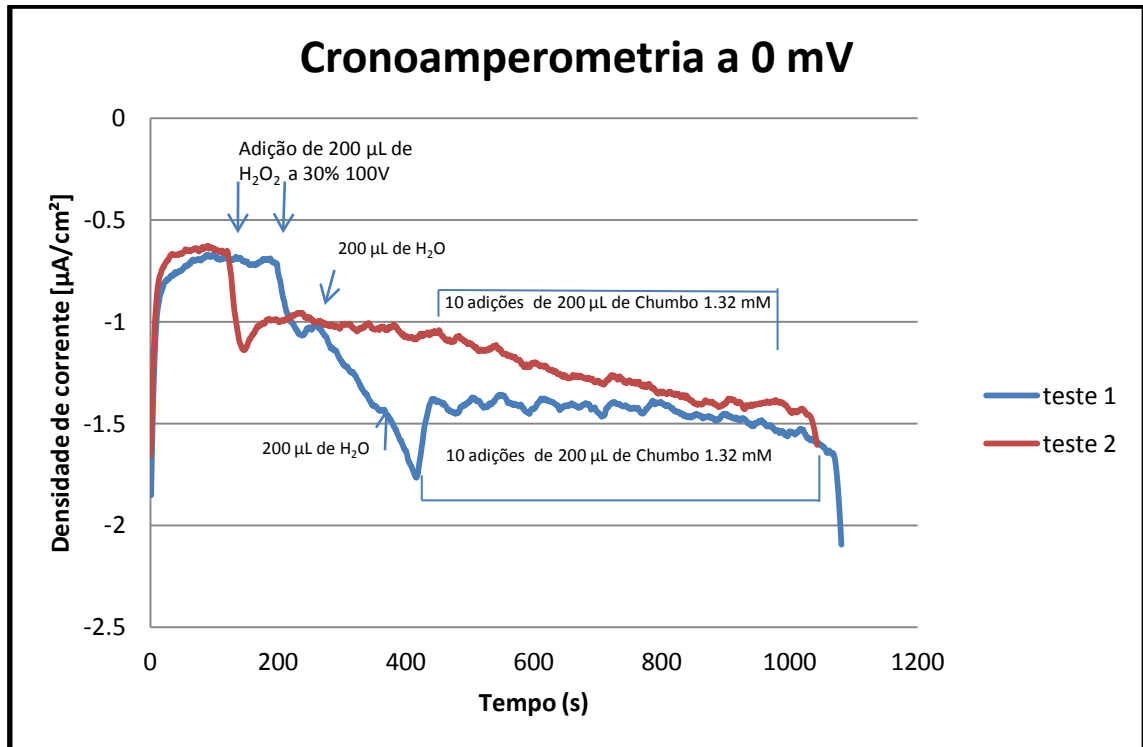


Gráfico 17 - Cronoamperometria com um eléctrodo de carbono vítreo com peroxidase e polifenol oxidase imobilizada proveniente de um extracto de mirtilo, adição de peróxido de hidrogénio, água e chumbo.

Depois de várias tentativas, o sinal não era reprodutível, e quando adicionávamos o peróxido de hidrogénio, o sinal começava a decrescer e nunca mais parava, para não danificar o eléctrodo, tínhamos que parar o teste. Não conseguimos encontrar o problema e por falta de tempo não conseguimos continuar o projecto.

## 6. Conclusão

A partir deste trabalho podemos concluir que existem diferentes formas de detectar e quantificar metais pesados.

Os biossensores são uma alternativa simples e de baixo custo, e futuramente vão-se desenvolver formas de produzir ainda com custos mais reduzidos e de fácil utilização.

Os biossensores enzimáticos são aqueles que são mais fáceis de utilizar, apesar de ter alguns cuidados para não perderem a actividade. O método de imobilização é um factor muito importante na construção do biossensor, no caso estudado, a ligação cruzada é o que apresenta melhores resultados.

Dos biossensores utilizados, a urease foi aquela que apresentou melhores resultados.

Apesar de não ser reprodutível, a polifenol oxidase e a peroxidase extraídas apresentaram bons resultados.

Como trabalho futuro, sugeriria a utilização de polifenol oxidase ou peroxidase purificadas, e comparar com a urease, utilizando como método de imobilização a ligação cruzada. Também se podia modificar a superfície do eléctrodo com nanotubos de carbono ou nanopartículas, que aumentam a superfície do eléctrodo, e assim promovem uma melhor transferência de electrões.

## 7. Bibliografia

- Akyilmaz, E., Kozgus, O., Türkmen, H., & Çetinkaya, B. (2010). A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene. *Bioelectrochemistry*, 78, pp. 135-140.
- Bagal-kestwal, D., Karve, M. S., kakade, B., & Pillai, V. K. (2008). Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 657-664.
- Bertocchi, P., Ciranni, E., Compagnone, D., Magearu, V., Palleschi, G., Pirvutoiu, S., et al. (1999). Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection. 20, pp. 263-269.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., & Eaton, A. D. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (19ª Edição ed.).
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., & Eaton, A. D. (1999). Standard Methods for Examination of Water and wastewater.
- Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., Ferreira-Gonçalves, L., & Arcos-Martínez, M. J. (2009). Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg (II). *Talanta*, 79, pp. 1306-1310.
- Gonçalves, L. F. (2008). *Amperometric determination of mercury ions using gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes*. Dissertação de Licenciatura em Bioquímica.
- Guascito, M. R., & Malitesta, C. (2005). Heavy metal determination by biosensors based on enzyme immobilised by electropolymerisation. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 1643-1647.
- Guascito, M. R., Malitesta, C., Mazzotta, E., & Turco, A. (2008). Inhibitive determination of metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor - Study of effect of hydrogen peroxide decomposition. *Sensors and Actuators B*, pp. 394-402.
- Jian-xian, L., Xiang-min, X., Lin, T., & Guang-ming, Z. (2009). Determination of trace mercury in compost extract by inhibition based glucose oxidase biosensor. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, pp. 235-240.
- Krawczyk, T. K., Moszczyńska, M., & Trojanowicz, M. (2000). Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, pp. 681-691.
- Mohammadi, H., Amine, A., Cosnier, S., & Mousty, C. (2005). Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix. *Analytica Chimica Acta*, pp. 143-149.

- Ristic, L. (1994). *Sensor technology and devices*. Norwood: I. Artech House.
- Ruiz, J. G. (2006). *Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria*. tese doutoramento, Barcelona.
- Shekhovtsova, T. N., Muginova, S. V., & Bagirova, N. A. (1997). Determination of organomercury compounds using immobilized peroxidase. *Analytica Chimica Acta* , pp. 145-151.
- Tan, Y., Kan, J., & Li, S. (2011). Amperometric biosensor for catechol using electrochemical template process. *Sensors and Actuators B* , 152, pp. 285-291.
- VALDERRAMA, P., MARANGONI, F., & CLEMENTE, E. (2001). EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A ATIVIDADE DE PEROXIDASE (POD) E POLIFENOLOXIDASE (PPO) EM MAÇÃ (*Mallus comunis*). *Ciência e Tecnologia Alimentar* , 21, pp. 321-325.
- Yang, Y., Wang, Z., Yang, M., Guo, M., Wu, Z., Shen, G., et al. (2006). Inhibitive determination of mercury ion using a renewable urea biosensor based on self-assembled gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B* , 114, pp. 1-8.
- Zhu, L., Yang, R., Zhai, J., & Tian, C. (2007). Bienzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. *Biosensors and Bioelectronics* , 23, pp. 528-535.