



**INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO
DO *Canavalia ensiformis* PARA FUTURA
APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR DE UREIA NA
PRESENÇA DO HERBICIDA ATRAZINA**

Mariana Maggesissi dos Reis

Marliani Barreto Castricini

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Prof.^a Andrea Medeiros Salgado, D.Sc.

Eng. Lívia Maria da Costa Silva, D.Sc.

Novembro de 2013

INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DO *Canavalia ensiformis* PARA FUTURA APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR DE UREIA NA PRESENÇA DO HERBICIDA ATRAZINA

Mariana Maggesissi dos Reis

Marliani Barreto Castricini

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Prof.º Rodrigo Nascimento, D.Sc.

Vânia Paula Salviano dos Santos, M.Sc.

Alexandre Guilherme Silva Tavares, Eng.

Orientado por:

Prof.^a Andrea Medeiros Salgado, D.Sc.

Eng. Lívia Maria da Costa Silva, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Novembro de 2013

DOS REIS, Mariana Maggesissi. CASTRICINI, Marliani Barreto.

Aplicação de um biossensor potenciométrico de ureia em soluções de agrotóxico comercial. Mariana Maggesissi dos Reis. Marliani Barreto Castricini. Rio de Janeiro: UFRJ / EQ, 2013.

xiii, 73p; il.

(Projeto Final)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de química, 2013.

Orientadores: Professora Andrea Medeiros Salgado e Doutora Livia Maria da Costa Silva.

1. Urease. 2. Inibição enzimática. 3. Atrazina. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ).
5. Prof.^a Andrea Medeiros Salgado e D.Sc. Livia Maria da Costa Silva. I. Título.

Dedicamos este trabalho aos nossos pais Aírton, Crístina, Antônio e Marli; aos nossos companheiros Alexandre e Netinho; aos nossos irmãos Alana, Duílio e Aílton; aos filhos queridos Erik Antônio e Maria Rosa pelo apoio e paciência.

*“Te mostro um trecho, uma passagem de um livro antigo
Pra te provar e mostrar que a vida é linda
Dura, sofrida, carente em qualquer continente
Mas boa de se viver em qualquer lugar...”*

O Rappa

AGRADECIMENTOS- MARIANA

A Deus por me dar forças para sempre seguir em frente mesmo com as inúmeras dificuldades, mostrando que sou forte e capaz.

Aos meus pais Airton e Cristina, que em todos os momentos de vitórias e falhas, estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e mostrando o melhor caminho a seguir.

Ao meu namorado Alexandre, que mostrou que há esperança no fim do túnel, sempre com paciência, palavras duras e fortes, mas de incentivo e apoio, mostrando que eu era capaz de tudo e um pouco mais, um exemplo de ser humano forte e focado.

À minha irmã Alana, que me mostrou que ter a oportunidade de estudar é uma dádiva e que “são só para os fortes”.

Aos meus filhos Brigitte, Pipoca e Nino que sempre davam um jeito de me fazer sorrir, me surpreendendo com coisas altamente engraçadas, aliviando e suavizando o momento de estresse.

Aos meus amigos, Ana Carina, Alisson, Josi, Rafael P., Rafael S. e Rafaela, pelos constantes risos, brincadeiras, paciência e incentivo para que continuasse a seguir em frente.

À minha amiga Marliani, onde juntas enfrentamos todos os leões na cova de Daniel, tiramos todas as pedras do caminho e seguimos do jeito que Deus permitiu.

Às minhas amigas e doutorandas do Laboratório de Sensores Biológicos, Paula, Gisele e Francisca, pelo constante carinho e por sempre estarem dispostas a me ajudar a qualquer hora, sempre dando ideias e incentivando.

Aos meus amigos do CENPES, Sílvio, Michelle, Livia, Wallace e Marcos, pela solidariedade e compreensão pois estiveram presentes nos momentos finais desse processo, sempre me motivando com pensamentos positivos.

Às minhas orientadoras Prof.^a Andrea e Livia, que me proporcionaram a oportunidade de trabalhar com pessoas maravilhosas e com coisas que eu mais me identificava.

Aos membros da banca examinadora, Prof.^o Rodrigo, Paula e Alexandre, por participarem da avaliação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS- MARLIANI

A DEUS, pela determinação, força e fé que se renova em mim a cada dia.

A meus filhos Erik Antônio e Maria Rosa, pelo amor incondicional, alegrias, abraços, beijos e pelos momentos maravilhosos que vocês me proporcionam. Vocês alimentam minha alma de amor. Amo vocês!!!

Ao meu marido Netinho, pelo companheirismo, paciência, cumplicidade, apoio e amor.

Aos meus pais Antônio e Marli, por me ensinarem a ter disciplina, caráter, responsabilidade e acima de tudo FÉ em DEUS. Mãe obrigada pela extrema ajuda e amor e pai obrigada, pelo tempo que passamos juntos, foi pouco, mas foi muito importante e valioso, te amo.

Aos meus irmãos Duílio, Aílton e Ariane, pelo apoio, amizade e carinho.

À minha sogra D. Rosa e meu sogro Sr. Erik por tudo que fazem, por mim, e pelos meus filhos, sem exigirem nada em troca.

À Monique, pela grande ajuda, sem você a minha caminhada até aqui, teria sido muito mais difícil.

À Mariana, pela amizade, ajuda e carinho. Obrigada Mari, por dividir momentos de alegria, angústias e tristezas, com essa divisão e sua iluminada companhia tornou tudo mais leve e feliz.

Ao pessoal do laboratório, que me acolheu tão bem e nos ajudou no que podiam.

Às nossas orientadoras, Professora Andréa e Livia, pela oportunidade de estarmos concluindo mais essa etapa, tão importante, na nossa vida acadêmica.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Engenheiro Químico.

INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DO *Canavalia ensiformis* PARA FUTURA APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR DE UREIA NA PRESENÇA DO HERBICIDA ATRAZINA

Mariana Maggesissi dos Reis

Marliani Barreto Castricini

Novembro, 2013

Orientadores: Prof.^ª Andrea Medeiros Salgado, D.Sc.

Eng. Lívia Maria da Costa Silva, D.Sc.

Com a fabricação e uso indiscriminado de agrotóxicos de todas as classes, fazem-se necessários um monitoramento e um controle mais rígidos para garantir que os alimentos disponibilizados a população e o meio ambiente sejam preservados e controlados. A atrazina é um herbicida do tipo triazina amplamente utilizado em plantações para controle de crescimento de ervas daninhas. O seu uso é controverso, pois promove a contaminação generalizada do solo e, por consequência, dos lençóis freáticos, além de causar defeitos congênitos em animais e seres humanos. Na busca por um método capaz de monitorar a presença deste agrotóxico, foi feita uma investigação das condições de reação do *Canavalia ensiformis*, por inibição enzimática, para futura aplicação do biossensor potenciométrico de ureia. Durante o desenvolvimento do trabalho, foram analisados o tempo da adição da atrazina ao conjunto solução de ureia (10ppm) e biocomponente com tempos selecionados de 1, 5 e 10 minutos; o tempo reacional, analisando-se 5, 10 e 20 minutos; a interferência do tipo de agitação, manual e magnética, nas análises, e a possibilidade de reutilização do biocomponente. Os melhores resultados foram obtidos quando realizada a agitação magnética durante as análises, com tempo de adição de atrazina de 5 minutos, tempo de contato de mais 5 minutos, totalizando 10 minutos de reação e sem reutilização do componente biológico imobilizado.

SUMÁRIO

Capítulo I: Introdução	1
I.1- Considerações gerais.....	1
Capítulo II: Objetivos.....	3
II.1-Objetivo principal.....	3
II.2 Objetivos específicos	3
Capítulo III: Revisão bibliográfica.....	4
III.1- Agrotóxicos	4
III.2- Atrazina.....	8
III.2.1- Aspectos toxicológicos	9
III.2.2- Atrazina versus meio ambiente	10
III.2.3- Legislação Brasileira	12
III.2.4- Métodos de determinação de atrazina no solo e na água.....	12
III.3- Ureia	13
III.4- Enzima Urease	14
III.4.1- Características gerais.....	14
III.4.2- A enzima urease presente em <i>Canavalia ensiformis</i> (feijão de porco)	15
III.4.3- Outras fontes da enzima urease	16
III.4.4- Principal função da urease na agricultura	17
III.4.5- Inibidores da atividade da enzima urease.....	18
III.5- Eletrodo íon-seletivo a amônio.....	21
III.6- Biossensores	22
III.6.1- Considerações Gerais	22
III.6.2- Aplicações dos biossensores.....	23
III.6.3- Biossensores baseados na inibição enzimática	24
Fonte: DOS SANTOS, 2012.....	26
III.6.4-Biossensor para detecção de atrazina	27
III.6.5- Biossensores comerciais disponíveis no mercado	28
Capítulo IV: Material e Métodos	30
IV.1- Preparo do biocomponente	30
IV.1.1- Moagem e Peneiramento do feijão de porco	30

IV.2- Calibração e Curva padrão do eletrodo íon seletivo a amônio	33
IV.3- Estudo da estabilidade da enzima urease presente no tecido vegetal imobilizado	35
IV.4.1- Estudo do tempo de adição do herbicida atrazina	37
IV.4.2- Estudo do tempo reacional da urease com a atrazina	38
IV.4.3- Estudo da interferência da agitação (mecânica e magnética)	38
IV.4.4- Estudo da reutilização do componente biológico	38
IV.4.5- Análise das respostas dos ensaios de inibição da urease	39
Capítulo V: Resultados e Discussões	40
V.1- Influência da interferência da agitação (mecânica e magnética)	40
V.2- Influência do tempo de adição do herbicida	41
V.3- Influência do tempo reacional do herbicida com a urease	45
V.4- Influência da reutilização do componente biológico	49
Capítulo VI: Análise preliminar de viabilidade econômica do biossensor de ureia para atrazina por inibição enzimática	51
Capítulo VII: Conclusões	55
Capítulo VIII: Sugestões para ensaios futuros	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura I- Fórmula molecular da atrazina (AQUINO <i>et al.</i> , 2013)	8
Figura II- Obtenção sintética da ureia (UBESCO & SALVADOR, 2002).	13
Figura III- Esquema das reações catalisadas pela enzima urease (ESTIU, 2006).	14
Figura IV- Esquema de lixiviação e volatilização da ureia hidrolisada pela urease (BARTH, 2009).	17
Figura V- Mecanismo de inibição reversível competitiva (MARQUES & YAMANAKA, 2008).	18
Figura VI- Mecanismo de inibição não competitivo (MARQUES & YAMANAKA, 2008).	18
Figura VII- Mecanismo de inibição incompetitiva (MARQUES & YAMANAKA, 2008).	19
Figura VIII- Mecanismo de inibição irreversível (MARQUES & YAMANAKA, 2008).	19
Figura IX- Esquema geral de funcionamento do biossensor. Fonte: DOS SANTOS, 2012.	22
Figura X- Reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase (KUSWANDI <i>et al.</i> , 2008). .	25
Figura XI- Reação catalisada pela enzima tirosinase (SASSOLAS, 2012).	25
Figura XII- Medidor de glicose da marca OneTouch [®] (ONE TOUCH LA, 2013).	28
Figura XIII- Biossensor OptiEnz Sensors, LLC (REARDON, 2010).	29
Figura XIV- Biossensor detector de metamidofós ("Detector de agrotóxico — CH," [S.d.]).	30
Figura XV- Esquema do "pré-tratamento" do feijão de porco. Passo 1: feijão <i>in natura</i> (esquerda) e feijão descascado (direita); Passo 2: Feijão descascado é levado para um triturador elétrico; Passo 3: Feijão triturado é peneirado ; Passo 4: o pó selecionado é armazenado em recipiente vedado.	31
Figura XVI- Etapas da imobilização do biocomponente.	32
Figura XVII- Representação da ligação covalente do biocomponente com o suporte (tela de nylon) (SOUTHGATE, 2011).	33
Figura XVIII- Exemplo de uma curva padrão do eletrodo íon-seletivo de amônio.	34
Figura XIX- Exemplo de estabilização da resposta do eletrodo íon-seletivo de amônio para ureia 10ppm.	35
Figura XX- Esquema do aparato experimental usado nos experimentos realizados.	36
Figura XXI- Ensaio feito com agitação mecânica por 10 segundos, no tempo de adição artificial de atrazina de 10 minutos.	40
Figura XXII- Ensaio feito com agitação magnética por 10 segundos, no tempo de adição artificial de atrazina de 5 minutos	41
Figura XXIII- Ensaio de adição artificial de atrazina em 10 minutos com agitação manual.	42
Figura XXIV- Ensaio de adição artificial de atrazina em 5 minutos com agitação magnética.	43
Figura XXV- Ensaio de adição artificial de atrazina em 1 minuto com agitação magnética.	44
Figura XXVI- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 10 minutos) com a urease.	45
Figura XXVII- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 10 minutos) e da urease.	46
Figura XXVIII- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 5 minutos) com a urease.	46
Figura XXIX- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 5 minutos) e da urease.	47
Figura XXX- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 1 minuto) com a urease.	48
Figura XXXI- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 1 minuto) e da urease.	48

Figura XXXII- Biocomponente utilizado pela primeira vez, com tempo de adição de atrazina em 10 minutos e agitação manual.	49
Figura XXXIII- Biocomponente reutilizado, com tempo de adição de atrazina em 10 minutos e agitação manual.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Concentrações finais de atrazina no sistema.	37
Tabela II- Módulo da variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 10 minutos.	42
Tabela III- Módulo da variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 5 minutos.	43
Tabela IV- Variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 1 minuto.	44
Tabela V- Equipamentos fixos.	51
Tabela VI- Reagentes utilizados.	52
Tabela VII- Material suporte.	52
Tabela VIII- Custo do preparo das soluções da curva de calibração.	53
Tabela IX- Custo do preparo do sistema para oito análises por dia.	53
Tabela X- Custo de uma análise por dia.	53
Tabela XI- Comparação de custo do método analítico e do biossensor.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro I- Outras fontes de urease encontradas na natureza.....	16
Quadro II- Vantagens e desvantagens do uso de biossensores.	23
Quadro III- Algumas enzimas usadas na construção de biossensores no processo de inibição.	26

Capítulo I: Introdução

I.1- Considerações gerais

Na agricultura, o uso indiscriminado de defensivos agrícolas, nas últimas décadas, tem causado grandes problemas ao meio ambiente. O fator de risco se concentra em áreas de plantio poluindo o solo e a água. Os agrotóxicos da classe dos herbicidas são os mais utilizados no mundo. Através dos processos de adsorção, volatilização e lixiviação, a determinação da intensidade de contaminação no solo é realizada (“Boletim Agrotóxicos | FEAB on WordPress.com,” [S.d.]).

A atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida, com classificação toxicológica de classe II - muito perigoso ao meio ambiente. É o herbicida mais utilizado no mundo para controle do crescimento de ervas daninhas sendo aplicado em vários cultivos como milho, cana-de açúcar, soja, dentre outros ¹⁴. Por conta de sua alta toxicidade, permite-se que para água doce, o nível de atrazina deve ser menor ou igual a 2ppb e para água industrial menor ou igual a 50ppb (“RESOLUÇÃO CONAMA no 396,” 2008).

Atualmente, os métodos analíticos, como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, são empregados e seu uso é complexo possuindo alto custo das análises e sendo ainda, não aplicáveis para trabalho em campo. Por esses motivos, os biossensores são considerados ferramentas analíticas inovadoras, pois são dispositivos que fazem uso de biorreconhecimento combinado a um alto poder de processamento de transdutores resultando em um controle efetivo, de baixo custo e gerando análises em tempo real. Em especial, biossensores baseados em inibição enzimática são considerados ideais para a determinação de herbicidas, pois combinam alta sensibilidade e especificidade com a simplicidade de operação (DOS SANTOS, 2012).

Nesse trabalho, foram investigadas as condições de reação do *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), buscando sinais de inibição enzimática, para futura aplicação do biossensor potenciométrico de ureia (SILVA, 2011). Os seguintes testes foram realizados: tempo de adição artificial do herbicida, tempo de contato do mesmo com a enzima (tempo reacional), interferência do tipo de método de agitação (manual e magnética) e reutilização do biocomponente imobilizado. Além disso, uma análise de

viabilidade preliminar do biossensor de ureia aplicado a atrazina foi elaborada e comparada ao método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GS-MS) que é o método analítico mais utilizado no mercado para análise do analito desejado.

Capítulo II: Objetivos

II.1-Objetivo principal

O objetivo do presente trabalho foi investigar as condições de reação da enzima urease presente no tecido vegetal de *Canavalia ensiformis*, pela ação inibitória da atrazina, para futura aplicação do biossensor potenciométrico de ureia desenvolvido por SILVA (2011).

II.2 Objetivos específicos

Visando alcançar o objetivo principal do trabalho, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- a) Determinar o tempo de adição artificial da atrazina no sistema biocomponente, transdutor e substrato (ureia), com objetivo de determinar o tempo de resposta do método e tempo reacional da atrazina com a urease,
- b) Determinar a influência do tipo de agitação (manual e magnética) do sistema após a adição de atrazina durante as análises com o biocomponente ,
- c) Estudar a possibilidade de reutilização do biocomponente imobilizado.
- d) Avaliar preliminarmente a viabilidade econômica do biossensor de ureia para detecção de atrazina por inibição enzimática

Capítulo III: Revisão bibliográfica

III.1- Agrotóxicos

Existem relatos históricos, que desde os primórdios da humanidade, há existência de pragas em lavouras, causando danos ao homem, seja diminuindo a quantidade de alimentos a serem colhidos ou transmitindo doenças a pessoas ou animais que as cercam (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Então ao longo dos séculos, o homem sempre buscou meios de combater essas adversidades naturais, sendo que, muitas vezes, eram feitos rituais religiosos ou magias para combater as pragas. Os gregos e os romanos tinham deuses específicos para prevenir ou exterminar pragas (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Apesar do pouco conhecimento a respeito da natureza e das pragas que atacavam a agricultura, existem relatos sobre métodos de controle de pragas durante o período clássico. Entretanto, na Idade Média, pouca evolução ocorreu em termos de progresso científico (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Com o passar do tempo e por meio de observações e experimentos baseados no método de tentativa e erro, foram identificados vários compostos químicos eficazes no combate a insetos e fungos. As fórmulas e a composição dos compostos químicos utilizados ainda não eram conhecidas (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Já em 2500 a.C., os sumérios utilizavam o enxofre no combate a insetos. No século XIV, os chineses começaram a utilizar compostos de arsênio para controlar insetos. Eles também desenvolveram outros métodos de controle de pragas, incluindo o uso de ervas, óleos e cinzas, para tratar sementes e grãos armazenados, bem como compostos à base de mercúrio e arsênio para combater piolhos e outras pragas (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Com o desenvolvimento da agricultura no século XVIII, novas práticas agrícolas foram introduzidas como, por exemplo, a utilização de fertilizantes em larga escala e de máquinas para plantar sementes, para colheita e processamento de alimentos. Em decorrência dessas mudanças, os problemas com as pragas se agravaram já na metade do século XIX, surgindo os primeiros estudos científicos sistemáticos sobre o uso de compostos químicos (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Com a justificativa de melhorar a produção agrícola, as indústrias químicas passaram a desenvolver os chamados pesticidas, também denominados agrotóxicos, agroquímicos, biocidas, praguicidas e defensivos agrícolas. Os pesticidas são substâncias químicas especificamente desenvolvidas e produzidas para o uso no controle de pragas na agricultura e na saúde pública, para aumentar a produção de alimentos e facilitar o uso dos métodos agrícolas modernos (STENERSEN, 2004).

Segundo VELASCO & CAPANEMA (2006) podem ser classificados da seguinte forma: como inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), rodenticidas ou raticidas (controle de roedores/ratos), nematicidas (controle de nematóides) e acaricidas (controle de ácaros).

A Segunda Guerra Mundial foi um ponto crucial para o avanço técnico-científico na formulação de substâncias organossintéticas com características de pesticidas, para defesa das tropas contra piolhos e outras pragas transmissoras de doenças (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

De acordo com BRAIBANTE & ZAPPE (2012), por volta da década de 40, apareceu a primeira linha de produtos sintéticos conhecidos como organoclorados. Dentro desse grupo estava inserido o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) que inicialmente foi desenvolvido para fins bélicos, porém com a descoberta feita pelo químico suíço Paul Müller de que o DDT possuía forte ação pesticida, este foi rapidamente adotado no setor agrícola para o controle de pragas devido a sua alta eficiência em curto prazo. Com eficácia dessas substâncias no combate a espécies nocivas à agricultura, o uso de agroquímicos sofreu enorme disseminação e, assim, ocasionaram uma profunda mudança nos métodos de controle de pragas aplicados na agricultura.

A partir de 1950, países da Europa e os Estados Unidos intensificaram o uso de agroquímicos na agricultura com o propósito de aumentar os níveis de produtividade buscando atender a necessidade apresentada no cenário Pós-2ª Guerra (RODRIGUES, 2012).

Inicialmente, os agrotóxicos foram utilizados no Brasil em programas de saúde pública e, em 1975, o país iniciou uma política de abertura ao comércio de agrotóxico

com o Plano Nacional de Desenvolvimento. Essa política de incentivo e a repercussão da ação dos agrotóxicos no combate às pragas provocaram a expansão do uso dessas substâncias no Brasil (RODRIGUES, 2012).

Atualmente, empresas químicas que atuam no setor agropecuário, tem um grande faturamento chegando a movimentar no mercado, US\$ 48 bilhões por ano no mundo (“Boletim Agrotóxicos | FEAB on WordPress.com,” [S.d.]).

De acordo com a Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC), anualmente são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas cerca de 130 mil toneladas/ano no país, representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (“Boletim Agrotóxicos | FEAB on WordPress.com,” [S.d.]).

Apesar dos benefícios à produção agrícola, o uso intenso de agrotóxicos pode proporcionar danos tanto ao meio ambiente quanto ao próprio homem. De acordo com CANELA & PEDLOWSKI (2012), outro problema de saúde pública é a presença de resíduos de agrotóxicos nas cascas e no interior de alimentos.

Segundo RECENA & CALDAS (2008), a exposição humana à agrotóxicos constitui um problema de saúde pública em todo o mundo e os danos causados, por consequência de seu uso, são as principais prioridades de estudo no meio científico mundial.

No meio ambiente, as propriedades físico-químicas, a quantidade e a frequência do uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do ambiente e as condições meteorológicas determinarão qual será o destino dos pesticidas no ambiente (KLINGMAN, 1982). Essas condições variam de acordo com o produto e com os fatores relacionados à sua aplicação, por isso não podemos prever um modelo para o comportamento destes pesticidas, nem sua interação com o ambiente (RIBAS, 1970).

Por essas razões, tem sido enfatizada a necessidade de serem estabelecidos métodos de detecção de pequenas quantidades dessas substâncias, seus metabólitos e produtos de degradação nas diversas matrizes ambientais.

Métodos analíticos tradicionais ou clássicos capaz de avaliar agrotóxicos são normalmente por cromatografia gasosa em camada fina(TLC), em camada fina de(HPTLC), gasosa(GC) líquida de alta performance(HPLC) ou por espectrometria de massa (CG-MS) (Lacorte & Barceló,1995; Yun-Suk et al., 1997). Diante dos problemas causados pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos, é de extrema relevância que a monitorização ambiental seja feita de maneira constante, o que permitiria avaliar se as medidas de segurança estão adequadas e, principalmente, se a água, solo, ar ou produto consumido não oferecem perigo.

Infelizmente, os métodos clássicos de monitoramento de agrotóxicos baseados em técnicas analíticas cromatográficas citadas anteriormente exigem mão-de-obra especializada e apresentam um alto custo operacional. Dessa forma, o seu emprego em larga escala em pequenos laboratórios e/ou para instalações laboratoriais de campo torna-se inacessível.

Em função dos problemas relacionados ao uso de agrotóxicos, sistemas eficientes de detecção são cada vez mais requeridos para proteção de organismos expostos a estes compostos pela contaminação da água e/ou alimentos. Devido ao crescimento da demanda, há a necessidade de aumentar a capacidade analítica. Métodos simples, de baixo custo e de resposta rápida, adequados ao uso no campo, são altamente desejáveis (ELLIS, 1989). Como exemplo de métodos simples são os biossensores, que são objetos de estudo do presente trabalho.

III.2- Atrazina

De nome químico, segundo *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina, peso molecular 215,69 g/mol, tem sua fórmula estrutural mostrada na Figura I.

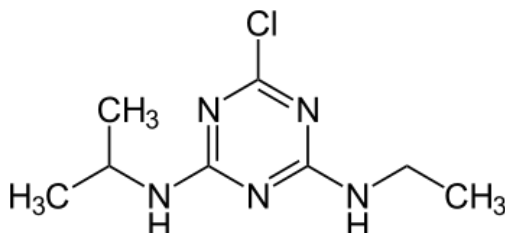


Figura I- Fórmula molecular da atrazina (AQUINO *et al.*, 2013) .

É solúvel em alguns solventes orgânicos como éter, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila, é ainda um composto polar, fracamente básico e sua estabilidade se deve a configuração eletrônica de seu anel heterocíclico. Sua solubilidade em água é praticamente independente do pH da solução, entretanto, aumenta bastante em soluções cujo pH é menor que 2,0 (AQUINO *et al.*, 2013).

A hidrólise ácida ou alcalina da atrazina produz a hidroxiatrazina, um dos seus mais abundantes produtos de degradação (AQUINO *et al.*, 2013).

A atrazina é um herbicida utilizado há pelo menos 5 décadas. Nos Estados Unidos, por volta de 1950, tornou-se popular entre os fazendeiros em razão de ser um herbicida efetivo, econômico e seletivo no controle de ervas daninhas (AQUINO *et al.*, 2013).

Este herbicida tem sido largamente usado no mundo principalmente nas plantações de milho. No Brasil, é utilizado em várias culturas: abacaxi, cana-de-açúcar, soja, milho, pinus, seringueira e sisal. Embora este herbicida seja proibido em alguns países do mundo, é usado em larga escala no Brasil (VAZ *et al.*, 1996).

III.2.1- Aspectos toxicológicos

Toxicidade é a capacidade de uma substância química provocar efeito negativo sobre um organismo (“Bibliomed – Central de Toxicologia – fichários de venenos - Central de Toxicologia - Atrazina,” [S.d.]).

De modo geral, os agrotóxicos são classificados com base no padrão de uso, no caso da toxicidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza DL₅₀ oral ou dérmica em ratos como classe toxicológica (dose necessária para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos ao protocolo experimental). No entanto, sob o ponto de vista toxicológico, a classificação mais importante é feita com base no mecanismo de ação do agrotóxico, ou seja, anticolinesterásicos, anticoagulantes, etc (“Bibliomed – Central de Toxicologia – fichários de venenos - Central de Toxicologia - Atrazina,” [S.d.]).

A principal questão envolvendo a classificação toxicológica é que ela reflete basicamente a toxicidade aguda e não indica os riscos de doenças de evolução prolongada (crônicas) como, por exemplo, câncer, neuropatias, hepatopatias, problemas respiratórios crônicos e outros. Existem classificações internacionais sobre riscos de doenças crônicas, mas na prática, a classificação toxicológica é a única informação utilizada pelos trabalhadores rurais e pela maioria dos profissionais (“Bibliomed – Central de Toxicologia – fichários de venenos - Central de Toxicologia - Atrazina,” [S.d.]).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006), órgão de controle do Ministério da Saúde, os agrotóxicos são classificados quanto à toxicidade, em quatro classes: classe I (extremamente tóxico), classe II (altamente tóxico), classe III (medianamente tóxico) e classe IV (pouco tóxico).

De acordo com a bula da atrazina Nortox (500 g/l) (“NORTOX,” [S.d.]):

- A classificação toxicológica (ANVISA, 2006) é de classe II, ou seja, muito perigoso ao meio ambiente.

- Efeito agudo ou crônico: ingestão igual ou acima de 10g.

De acordo, com a Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD):

- DL₅₀ da atrazina em peixes pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é de 26,46 mg/l.

- DL₅₀ em ratos por via dérmica é 3000 mg/Kg e DL₅₀ via oral varia de 1000 a 2000mg/Kg (“Bibliomed – Central de Toxicologia – fichários de venenos - Central de Toxicologia - Atrazina,” [S.d.]).

Devido à ampla utilização de agrotóxicos em todo o mundo e sua toxicidade, estes estão entre os compostos mais investigados nos produtos agrícolas. A busca por novas formulações e a preocupação em controlar os níveis de resíduos em alimentos e no meio ambiente têm despertado o interesse de pesquisadores em analisar as características dessas substâncias através da caracterização da estrutura química e física, e também o desenvolvimento de técnicas de detecção desses compostos (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

III.2.2- Atrazina versus meio ambiente

A atrazina é o defensivo agrícola mais encontrado em rios e lagos de diversas partes do mundo, como os rios da Eslovênia, Suíça, no lago Greifensee, Região dos Grandes Lagos, EUA, no Rio Yang, na China (AQUINO *et al.*, 2013).

No Brasil, de acordo com pesquisas da UNICAMP e UFPB (2012), a atrazina já foi encontrada em águas fornecidas de 16 capitais, e os resultados de inúmeros trabalhos mostram que ao longo dos anos, há a presença de atrazina em solos, lençóis freáticos, rios e lagos brasileiros (UETA *et al.*, 1989).

Segundo a União Européia e a Agência de proteção ambiental americana EPA, a atrazina esta na lista de poluentes prioritários devido a sua persistência ambiental e toxicidade (OLIVEIRA, 2008).

A permanência dos agrotóxicos nos diversos compartimentos como água, ar, solo, depende diretamente de variáveis oriundas do próprio composto ou da mistura de compostos, como estrutura, tamanho e forma molecular, além da presença/ausência de grupos funcionais. Assim, é de suma importância o levantamento das informações referentes às propriedades físico-químicas dos contaminantes em questão, no sentido de entender ou prever o que provavelmente pode estar acontecendo no meio ambiente e, conseqüentemente, direcionar, de forma mais efetiva, a estratégia de monitorização (MANAHAN, 1994).

Além disso, a mobilidade desses compostos incluindo a atrazina, pode ser influenciada pelas condições climáticas como índice pluviométrico e temperatura (CANUTO et al., 2010).

A atrazina possui uma baixa pressão de vapor e moderada solubilidade em água. Segundo DORES & DE-LAMONICA-FREIRE (2001) e SILVA & AZEVEDO (2008) em um sistema água-solo esse herbicida apresenta uma moderada adsorção à matéria orgânica e argila, elevada persistência em solos, hidrólise lenta e um alto potencial de escoamento superficial. Devido a este comportamento, seus resíduos podem contaminar os solos, águas subterrâneas e pequenos córregos.

A meia-vida da atrazina é variável em função do tipo de solo e da condição climática (QUEIROZ & MONTEIRO, 2000). Considerando somente os valores tabelados, esse herbicida possui alto potencial de lixiviação caracterizando a sua capacidade de contaminação das águas subterrâneas e superficiais.

A biodegradação da atrazina pode variar de acordo com o tipo de solo, microbiota presente e disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio (HUNTER & SHANER, 2010).

Em relação à contaminação humana, existem poucos dados decorrentes da exposição crônica sobre a saúde. THOMAS (1995), alertou para o fato de crianças expostas cronicamente, por diferentes vias, a agrotóxicos estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de carcinogênese. Além do câncer, outros efeitos crônicos tem sido associados ao uso desses contaminantes, os danos ao sistema reprodutivo tem sido os mais evidentes.

A EPA (*Environmental Protection Agency*), agência ambiental norte-americana, depois de pesquisas na década de 80, que diziam que a atrazina era cancerígena, revalidou seu emprego em 2003 onde relatou que os testes realizados não podiam comprovar ação cancerígena. No entanto, no ano de 2013, planeja reiniciar nova avaliação.

De acordo com pesquisador da Universidade da Califórnia, Tyrone Hayes, a atrazina age como um desregulador endócrino, significando que ela pode bloquear ou mimetizar hormônios, as pesquisas geraram sapos hermafroditas (“Nosso Futuro Roubado,” [S.d.]).

Um estudo da Universidade da Indiana detectou que as mulheres que vivem em áreas com alta presença de atrazina na água, têm gerado crianças com altas taxas de defeitos genitais congênitos (“Nosso Futuro Roubado,” [S.d.]).

III.2.3- Legislação Brasileira

De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (2008), o limite máximo de despejo da atrazina em água subterrânea é de 2,0 µg/L ¹⁶. (“RESOLUÇÃO CONAMA no 396,” 2008)

A atrazina está englobada dentro da Legislação Brasileira para agrotóxico. De uma forma geral, a legislação trata do controle de qualidade, disposição final das embalagens e resíduos, armazenamento e transporte, rotulagem, receituário e principalmente da fiscalização e inspeção de todos os itens acima (“Agrotóxicos - MAPA,” [S.d.]).

De acordo com a legislação brasileira, lei 7802, do dia 11 de julho de 1989 para agrotóxicos, o capítulo III, seção I, que trata do registro do produto, houve uma mudança que vale a pena ser ressaltada, em 1993, no artigo 9, onde o registro de agrotóxicos tinha validade de cinco anos, renovável a pedido do interessado. Com a mudança da lei, não há mais validade do registro, ou seja, se os agrotóxicos ou afins oferecerem risco ao ambiente ou a saúde humana, poderão ser reavaliados a qualquer tempo e ter seus registros alterados, suspensos ou cancelados.

III.2.4- Métodos de determinação de atrazina no solo e na água

Atualmente, as opções de determinação da atrazina se concentram em métodos analíticos como: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) e Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) é uma técnica instrumental que separa os componentes de uma mistura, identifica e quantifica cada um deles à alta pressão (50-350 bar). Esse

método é utilizado para amostras líquidas que contém atrazina. Um líquido previamente pressurizado (mistura de solventes) e a amostra passam por uma coluna cheia de material adsorvente (sílica, polímeros, entre outros) promovendo então a separação dos componentes da amostra. Esse instrumento possui um misturador de amostras e a fase móvel, bombas que fornecem o fluxo desejado, um detector que gera um sinal proporcional à quantidade de componente na amostra e um processador de dados (ZADAKA *et al.*, 2009).

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) é uma técnica que identifica diferentes substâncias na amostra pela combinação da cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa. Também é utilizado para análise de amostras líquidas. Esse método identifica especificadamente a presença da substância na amostra (ZADAKA *et al.*, 2009).

Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) é uma técnica que usa a luz nas faixas visíveis onde a absorção ou reflexão dessa luz provoca mudança de cor na amostra analisada. É utilizada com amostras de solo que contém a atrazina (ZADAKA *et al.*, 2009).

III.3- Ureia

A ureia, na sua forma natural, é um composto orgânico e foi separado da urina no século XVIII. Em 1828, a ureia foi a primeira molécula a ser sintetizada por Friedrich Wöhler e é chamada de *carbamida*, e é incluída entre os adubos minerais. É obtida pela reação da amônia e gás carbônico sob alta pressão, na presença de catalisador. A reação é mais complexa e requer controle, pois forma uma série de produtos intermediários não desejados (UBESCO & SALVADOR, 2002). A reação simplificada é mostrada na Figura II.

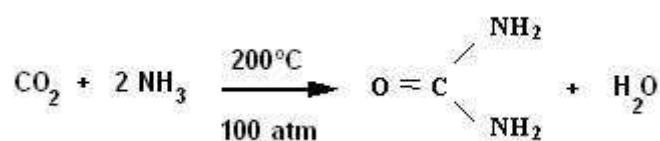


Figura II- Obtenção sintética da ureia (UBESCO & SALVADOR, 2002).

A ureia é o substrato utilizado no presente trabalho e é um dos principais produtos usados como fonte de nitrogênio na agricultura. É rapidamente metabolizada pelos micro-organismos por isso tem curta duração no ambiente (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Dentre as suas diversas aplicações, duas são comumente utilizadas: ureia fertilizante e ureia industrial. A primeira se apresenta na forma de grânulos brancos e seu teor de nitrogênio é de 45%, isso faz com que haja a redução dos custos de adubação, transporte, armazenamento e principalmente a aplicação (FERTILIZANTE; FISHER, [S.d.]). Já a ureia industrial é um produto sólido na forma de grânulos contendo 46% de nitrogênio. É higroscópico, solúvel em água e álcool e é usada na fabricação de resinas sintéticas, plásticos, além de ser de grande importância na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (AMBIENTE; APLICA, [S.d.]).

III.4- Enzima Urease

III.4.1- Características gerais

A urease (EC 3.5.1.5, ureia amidohidrolase) é uma metaloenzima níquel dependente, que catalisa a hidrólise da ureia formando duas moléculas de amônia e uma molécula de dióxido de carbono (DIXON *et al.*, 1980). O mecanismo da reação não está definido pois ocorre a formação de um intermediário como ácido carbâmico, cianeto ou quando há decomposição direta (ESTIU, 2006).

Estudos anteriores comprovam que a reação não catalisada ocorre por via de eliminação (ESTIU, 2006). A reação simplificada é mostrada na Figura III.

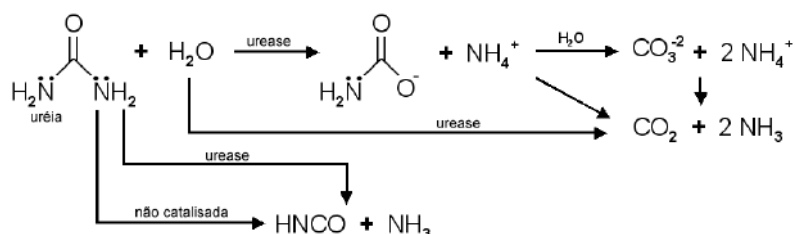


Figura III- Esquema das reações catalisadas pela enzima urease (ESTIU, 2006).

Vários métodos podem ser usados para detecção da amônia produzida. Dentre eles, reação com fenol-hipoclorito ou reagente de Nesler, corantes sensíveis a mudanças de pH, espectrofotômetro que utiliza um sistema de glutamato dependente de NADH desidrogenase e o uso do eletrodo íon- seletivo a amônio que é a principal e mais usada forma de detecção (SIRKO & BRODZIK, 2000). O dióxido de carbono que é o produto secundário da reação pode ser detectado e monitorado por métodos radiológicos (ARNDTSEN *et al.*, 1995).

III.4.2- A enzima urease presente em Canavalia ensiformis (feijão de porco)

Em 1926, James B. Sumner purificou e cristalizou a urease proveniente do feijão de porco (*jack bean*), seu nome científico é *Canavalia ensiformis* e essa descoberta proporcionou um maior conhecimento da estrutura e do funcionamento das proteínas (DIXON *et al.*, 1980). A urease de *Canavalia ensiformis* tem sua sequência primária com 840 aminoácidos (TSUBOI *et al.*, 1991) e massa molecular de 90,770 kDa (RIDDLES *et al.*, 1991) e por convenção é chamada de JBU (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Atualmente, a purificação e cristalização dessa enzima permitiram o desenvolvimento e a criação de substâncias interferentes na ação enzimática como, por exemplo, medicamentos que inibem a ação das enzimas de HIV (AINSWORTH, 2008).

Porém esses processos são complexos e caros, promovendo então a busca por métodos e materiais mais baratos como é o caso do desenvolvimento de biossensores que usam enzimas provenientes de tecido vegetal. Sua eficaz biodisponibilidade se dá com o uso de enzimas imobilizadas, o que permite a manutenção de suas propriedades catalíticas no decorrer do tempo, podendo ser reutilizadas em um número maior de análises. Quanto maior a estabilidade do biocomponente imobilizado, maior o seu tempo de uso fazendo com que as análises se tornem mais simples e viáveis economicamente (SILVA, 2011).

A partir de estudos realizados por SILVA (2006), os parâmetros cinéticos foram determinados em função da massa do feijão utilizada no processo de imobilização. O

Km é uma medida aproximada da afinidade do substrato com a enzima, e sabe-se que quanto menor o seu valor, maior afinidade terá (MARIOTTO, 2006).

VERMA & SINGH (2002) encontraram valores de Km na faixa de 2.08Mm para *Bacillus sp.* a 100mM para *Bacillus pasteurii*. O valor obtido para a urease presente no tecido vegetal foi de 58,38mM, o que confere grande afinidade do componente biológico com o substrato. A velocidade máxima também foi estudada e foi encontrado o valor de 5,23mM/min (SILVA *et al.*, 2006).

III.4.3- Outras fontes da enzima urease

A enzima urease é encontrada em uma enorme variedade de organismos incluindo bactérias, plantas, fungos e invertebrados (FOLLMER, 2008). Em tecido vegetal, a urease é um hexâmero (seis cadeias idênticas) e localiza-se no citoplasma. Nas bactérias e fungos, é constituída por duas ou três subunidades diferentes e só é ativada quando dois íons níquel são ligados à subunidade (AINSWORTH, 2008). O Quadro I a seguir lista outras fontes de urease encontradas na natureza.

Quadro I- Outras fontes de urease encontradas na natureza.

Fontes de urease	Nome científico	Referências
Folhas de amoreira	<i>Morus alba</i>	HIRAYAMA <i>et al.</i> ,2000
Plantas de soja	<i>Glycine max</i>	Polacco & Holland , 1993 , 1994 Meyer- Bothling & Polacco , 1987; Torisky <i>et al.</i> , 1994
Feijão	<i>Arabidopsis</i>	ZONIA <i>et al.</i> , 1995
Bactérias	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus saprophiticus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Ureaplasma urealiticum</i>	MOBLEY <i>et al.</i> , 1995
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	MULROONEY <i>et al.</i> , 1989
Bactérias patogênicas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KAYSNER <i>et al.</i> ,1994
	<i>Helicobacter pylori</i>	EATON <i>et al.</i> , 1991
	<i>K. aerogenes</i>	JABRI <i>et al.</i> , 1995
Fungos patogênicos	<i>Coccidioides immitis</i>	YU <i>et al.</i> , 1997
	<i>Schizosaccharomyces</i>	TANGE & NIWA, 1997

	<i>Pombe</i>	
Invertebrados	<i>Aplysia californica</i>	PEDROZO <i>et al.</i> , 1996
Melancia	<i>Citrullus vulgaris</i>	OM, SRILAKSHMI & LATA, 2007

Elaborado a partir de SIRKO & BRODZIK, 2000.

III.4.4- Principal função da urease na agricultura

O principal fertilizante usado na agricultura é a ureia pelo alto teor de nitrogênio (por volta de 46%) e baixo custo. Quando hidrolisada pela urease, libera nitrogênio para o solo promovendo perdas significativas do mesmo por lixiviação e volatilização (BARTH, 2009).

O nitrogênio é o principal nutriente, pois promove aumento da qualidade e produtividade. A volatilização de NH_3 é a maior preocupação enfrentada, para tentar minimizar esse problema, são aplicados aditivos à ureia. Outro fator de perda de nitrogênio é a lixiviação na forma de nitrato (NO_3^-) no solo (BARTH, 2009). A Figura IV mostra o esquema de lixiviação e volatilização.

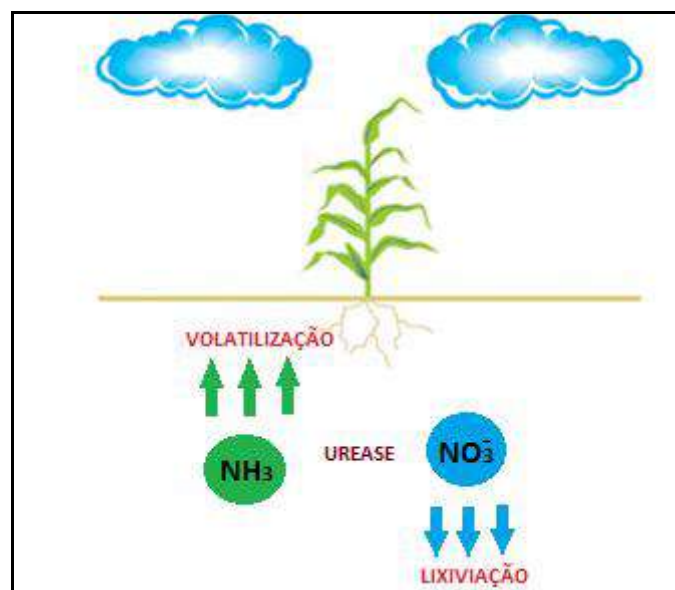


Figura IV- Esquema de lixiviação e volatilização da ureia hidrolisada pela urease (BARTH, 2009).

III.4.5- Inibidores da atividade da enzima urease

Os inibidores, de um modo geral, são moléculas orgânicas de simples ou complexa estrutura molecular. Sua especificidade depende da forma, do tamanho e das forças que interagem com a enzima (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

O mecanismo de inibição é baseado na ligação do substrato e da enzima podendo ser classificado como: reversíveis ou irreversíveis. Dentro da classe dos inibidores reversíveis têm-se os competitivos, os não competitivos, os incompetivos e os mistos (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Quando o inibidor não permite que o substrato (S) ocupe o sítio ativo da enzima (E), é denominado competitivo (Figura V) podendo então diminuir a atividade da mesma. Forma um complexo inativo enzima/inibidor (EI). De modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES), a adição de mais substrato é feita (DOS SANTOS, 2012).

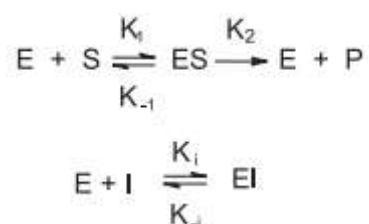


Figura V- Mecanismo de inibição reversível competitiva (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Os inibidores não competitivos (Figura VI) se ligam a enzima em um sítio próprio de ligação ao mesmo tempo em que o substrato está ligado ao sítio ativo da mesma. Há formação de um complexo entre a enzima/ inibidor (EI) e entre a enzima / substrato / inibidor (ESI) (DOS SANTOS, 2012).

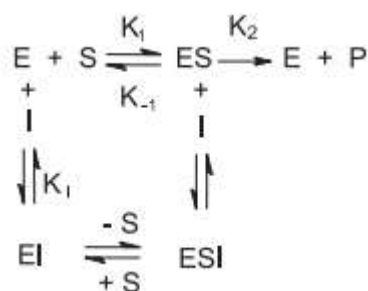


Figura VI- Mecanismo de inibição não competitivo (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

acetohidroxâmico (AHA) é o melhor inibidor entre todos os derivados naturais e sintéticos, pois se liga a urease do feijão de porco causando uma perturbação no UV-visível quando analisado.

O fluoreto induz a inibição competitiva na urease do feijão de porco em pH neutro. Para urease proveniente de outras fontes, fluoreto pode se comportar de forma não competitiva, dependendo do tempo e do pH em que são expostos. TODD & HAUSINGER (2000) propuseram que a inibição envolve a troca da água, que está ligada ao sítio catalítico, pelo íon fluoreto.

Os compostos de fosforamidas são classificados como potentes inibidores e atuam de forma reversível com urease proveniente do feijão de porco. É encontrada na forma de fosforoamidato, diaminofosfato e n-acil fosfórico triamida. Um mecanismo foi proposto, onde diaminofosfato atua, como inibidor da urease, se ligando a um íon níquel e ocupando o sítio ativo da enzima (ANDREWS *et. al.*, 1986).

III.5- Eletrodo íon-seletivo a amônio

O eletrodo íon-seletivo a amônio é composto por uma membrana que responde com seletividade ao íon de interesse mesmo na presença de outros íons em solução. É composto por uma membrana, uma sonda na qual é exclusiva para o analito usado, solução interna que serve como ligação entre o eletrodo interno e a membrana, um medidor capaz de proporcionar uma leitura do potencial em milivoltagem (mV) e vários outros elementos que conferem a estrutura do mesmo (SILVA, 2011).

Esse potencial (mV) é medido à corrente zero do eletrodo de referência que está em contato com a solução. É proporcional à função logarítmica da concentração de analito e a condutividade se relaciona à concentração do íon específico permitindo uma medição analítica do mesmo (SILVA, 2011).

No presente trabalho, o eletrodo íon- seletivo a amônio foi utilizado como o sensor que converteu a atividade do íon amônio dissolvido na solução em potencial elétrico podendo então ser medido por um voltímetro (SILVA, 2011).

A voltagem é dependente em logaritmo da atividade iônica de acordo com a equação de Nerst mostrada na Equação I.

$$E = E_0 - S \cdot \log[OH^-] \quad (I)$$

Onde:

E = medida do potencial do eletrodo;

E_0 = potencial de referência;

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

S = variação do eletrodo.

III.6- Biossensores

III.6.1- Considerações Gerais

Biossensor é um dispositivo analítico capaz de interpretar as mudanças (geração de íons, alteração de cor, crescimento de biomassa, elétrons, gases, luz, precipitação de sólidos) produzidas quando na presença de um componente biológico de interesse. É composto por três partes: um elemento biológico, um transdutor e processador de dados (AZEVEDO, 2010).

A definição clássica é dada por: “Biossensor é um sistema autônomo integrado, composto de um elemento biológico receptor em contato direto com um elemento conversor, o qual é capaz de converter a reação entre o elemento biológico e o analito de interesse em um sinal mensurável” (RODRIGUEZ et. al., 2005). A Figura IX mostra o esquema geral do funcionamento de um biossensor.

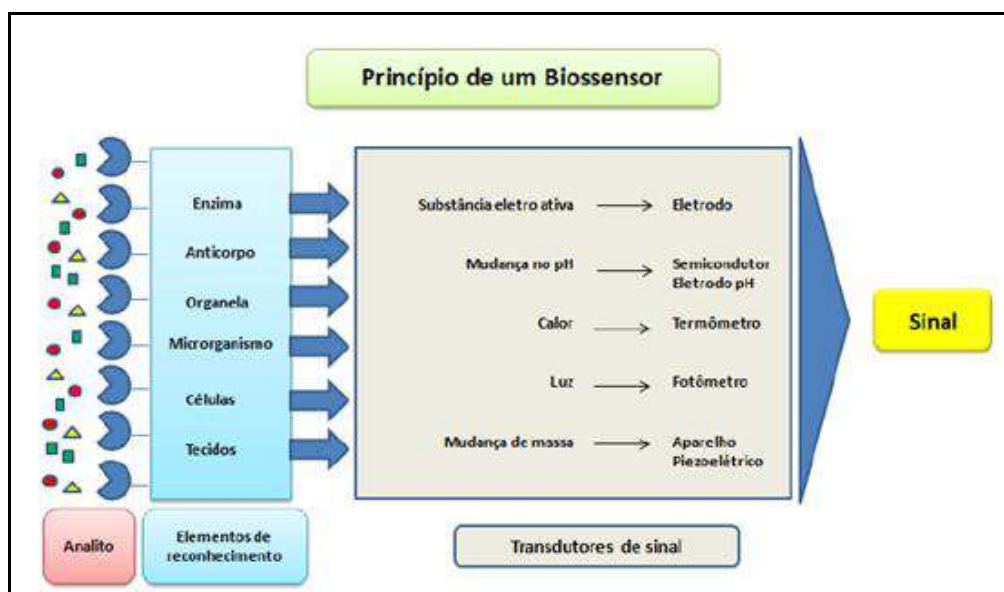


Figura IX- Esquema geral de funcionamento do biossensor. Fonte: DOS SANTOS, 2012.

O elemento biológico pode ser composto por enzimas, tecidos vegetais e animais, bactérias, fungos, leveduras, anticorpos, entre outros. Na sua presença, ocorrem reações específicas e reversíveis com o substrato gerando variações de um ou mais parâmetros físico-químicos associados a esta interação, no qual um elemento de detecção se faz necessário (DRUMMOND, 2009).

O transdutor é capaz de transformar o sinal resultante dessa reação em outro sinal mensurável e quantificável. O processador de dados confere a parte eletrônica e é o responsável por exibir os resultados de forma fácil à interpretação (DRUMMOND, 2009).

No Quadro II são apresentadas vantagens e desvantagens do uso de biossensores.

Quadro II- Vantagens e desvantagens do uso de biossensores.

Uso de Biossensores	
Vantagens	Desvantagens
Análise direta	Baixa estabilidade do biocomponente
Uso de pequenas quantidades de amostra	Determinação de um único analito
Facilidade de utilização	Pouca disponibilidade comercial
Portabilidade	
Baixo custo	
Resultados rápidos	
Sensibilidade	
Precisão	
Determinação de efeitos biológicos	
Determinação de poluentes biodisponíveis	

Elaborado a partir de RUBENS, 2008.

III.6.2- Aplicações dos biossensores

As aplicações dos biossensores se concentram nos seguintes campos: Indústrias de Alimentos, Farmacêuticas, Químicas, Mecânica e Mecatrônica (DRUMMOND, 2009).

Podem ser usados para o monitoramento ambiental, detecção de gases e toxinas presentes na água (DRUMMOND, 2009). Algumas aplicações são listadas a seguir:

- Controle Ambiental, detecção de pesticidas e contaminantes na água,
- Controle de Qualidade,
- Medicina e Engenharia Biomédica, detecção de patógenos,

- Uso em pesquisas científicas diversas, descoberta de drogas e avaliação biológica de novos compostos,
- Controle antidoping,
- Segurança Predial (incêndios, fumaça, agentes tóxicos),
- Uso militar.

III.6.3- Biossensores baseados na inibição enzimática

No caso dos biossensores de inibição, dentre todos os elementos de reconhecimento, as enzimas são as mais utilizadas. Apesar de serem mais caras e o processo de recuperação ser mais oneroso, suas vantagens se sobrepõe quando a construção de um biossensor é realizada . São vantagens como: menor tempo de resposta, especificidade, maior praticidade e versatilidade. As enzimas devem ser selecionadas criteriosamente em função das substâncias que se deseja mensurar (DRUMMOND, 2009).

Alguns dos mais conhecidos biossensores de inibição são listados a seguir e confeccionados com as seguintes enzimas: Colinesterase (ChE), Acetilcolinesterase (AChE), Tirosinase (TYR) e Peroxidase (POD).

Um biossensor de fibra ótica com a enzima colinesterase (ChE) foi desenvolvido para determinação de duas classes de pesticidas: carbamatos e organofosforados. A fibra é construída com a tecnologia sol-gel e a transdução de sinal é observada pela alteração de pH do indicador bromocresol fazendo com que o mesmo mude de cor. Essa mudança de cor se dá, pois ocorre a hidrólise do substrato acetilcolina pela enzima e a mesma é rapidamente inibida. Essa desativação leva a uma diminuição da absorvância quando comparado à reação onde não ocorre inibição. Tem como desvantagem sua falta de seletividade em relação aos outros pesticidas e vantagens como o uso direto em amostras de águas sem nenhum pré-tratamento e ser compacto podendo ser levado para análises em campo (ANDREOU & CLONIS, 2002).

Dois tipos naturais de colinesterase são conhecidos: acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. O desenvolvimento de um biossensor baseado em acetilcolinesterase (AChE) usando fibra ótica foi utilizado para a detecção de compostos organofosforados. O mesmo princípio básico do biossensor de colinesterase (ChE) também é usado, mudança de pH da solução. A estrutura é

confeccionada em um filme de sol-gel com acetilcolinesterase e o indicador azul de bromotimol. A alteração de pH se dá pela ação da AChE no substrato acetilcolina, liberando do ácido acético para a solução como mostra a Figura X (KUSWANDI *et. al.*, 2008).

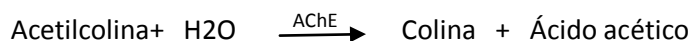


Figura X- Reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase (KUSWANDI *et. al.*, 2008).

Têm como vantagens a simples confecção do biossensor, um rápido tempo de resposta, boa reprodutibilidade e detecção de baixas concentrações do pesticida.

Um biossensor amperométrico foi desenvolvido com a enzima tirosinase (TYR) imobilizada na superfície de um transdutor de cobalto (II) ftalocianina de celulose modificada e grafite eletrodo compósito (CoPc – CGCE) por ligação cruzada com glutaraldeído e soro bovino albumina (SASSOLAS, 2012).

A tirosinase catalisa a hidroxilação do monofenol para difenol e o mesmo é oxidado produzindo então *o*-quinona como mostradas na Figura XI (SASSOLAS, 2012).

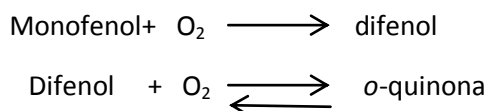


Figura XI- Reação catalisada pela enzima tirosinase (SASSOLAS, 2012).

A imobilização feita com esses compostos promove um sinal eletroquímico estável fazendo com que o eletrodo tenha alto desempenho analítico. Por esse motivo, o biossensor de tirosinase é recomendado para a monitoração dos compostos organofosforados e carbamatos em soluções aquosas (SASSOLAS, 2012).

Um biossensor de peroxidase (POD) foi descrito pela detecção de tiocarbamatos, um pesticida da classe dos carbamatos. Na presença de peróxido de hidrogênio, a hidroquinona é oxidada pela peroxidase formando *p*-benzoquinona que pode ser eletroquimicamente reduzida a hidroquinona. A presença da inibição se dá pela redução do potencial relativo ao biossensor correspondente ⁴⁶. As moléculas de peroxidase podem ser oxidadas por H₂O₂ e depois reduzidas a compostos fenólicos. O

processo envolve a participação de duas enzimas intermediárias (componente I e componente II). Os compostos fenólicos são então oxidados a quinona ou radicais livres que são capazes de se reduzir eletroquimicamente na superfície do eletrodo. Para sua inibição enzimática, muitos componentes orgânicos e inorgânicos foram reportados na literatura, como sendo eficazes na inibição do componente I (SASSOLAS, 2012).

O Quadro III mostra um resumo das enzimas utilizadas e outras enzimas que não foram listadas no presente trabalho.

Quadro III- Algumas enzimas usadas na construção de biossensores no processo de inibição.

Enzima	Reação catalisada	Inibidor
Colina oxidase	colina + O ₂ → aldeído betaina + H ₂ O ₂	organofosforados, carbamatos, Ag ⁺ , Cu ⁺ , Hg ²⁺
Colinesterase	acetil (butiril) colina + H ₂ O → colina e ácido acético	organofosforados, carbamatos, metais. nicotina, microcistinas
Fosfatase	glucose-6-fosfato + H ₂ O → glucose + fosfato inorgânico	organofosforados, carbamatos, microcistinas
Glucose oxidase	beta-D-glucose + O ₂ → D- glucono-1,5-lactone + H ₂ O ₂	hidroxiquinolina, adenina nucleotídeo, Ag ⁺ , Br ⁻ , Cl ⁻ , CN ⁻ , CuSO ₄ , Hg ⁺ , hidrazina
Lactato desidrogenase	lactato + NAD ⁺ → piruvato + NADH ⁺	fluoropiruvato, ADP, ATP, Cd ²⁺ , citrato, CO ₂ , glutamato, Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , piruvato
Peroxidase	ROOR' + doador (2 e-) + 2H ⁺ → ROH + R'OH	tiuréia, etilnotiuréia, sulfitos, mercúrio
Tirosinase	monofenol + ½ O ₂ → O- diidroxifenol O-diidroxifenol → O- quinona	benzoatos, carbamatos, organofosforados, atrazinas, tiuréas, herbicidas, clorofenóis, agentes quelantes

Fonte: DOS SANTOS, 2012.

III.6.4-Biossensor para detecção de atrazina

Alguns biossensores já desenvolvidos para detecção de atrazina são encontrados na literatura. Em 2001, um biossensor amperométrico foi construído utilizando como componente biológico complexos de fotosistema II (PSII) isolado a partir da cianobactéria termofílica *Synechococcus elongatus* e imobilizado na superfície de um sensor composto por um eletrodo de grafite e eletrodo de referência Ag/AgCl, sobre um substrato polimérico. A detecção baseia-se na inibição do PSII pelos herbicidas, pois bloqueiam o transporte de elétrons de uma forma dependente da concentração. A atividade do PSII é medida pela fotoredução de um receptor artificial de elétrons. Tem boa estabilidade (meia-vida de 24 horas) e um limite de detecção de cerca de 10^{-9} M para diuron, atrazina e simazina (KOMENDA *et al.*, 2002).

Um biossensor foi confeccionado para determinar a concentração de atrazina na água. Este mede a mudança de pH que a concentração do agrotóxico proporciona, sendo feito com duas camadas: a primeira contém um sensor de pH fluorescente e a segunda camada contém uma bactéria (*Pseudomonas* sp. ADP ou *Clavibactermichiganese* sp. ATZ1) imobilizada em alginato. Esses micro organismos usam a atrazina como substrato liberando ácido clorídrico fazendo com que a primeira camada do biossensor detecte a produção do ácido. O biossensor feito de *Clavibacter* tem maior especificidade e alta sensibilidade pela atrazina. Seu limite inferior de detecção é de 1ppb. Sua reprodutibilidade se dá somente a baixas concentrações e a resposta do biossensor em relação à concentração de atrazina tem tendência linear e está localizada na faixa de 1ppb a 100ppb. O tempo total de análise ocorre em 10 minutos (MASAPHY & MANDELBAUM, 2007).

Em 2010, um biossensor óptico de medição contínua e em tempo real foi desenvolvido para detecção de atrazina e outros pesticidas halogenados. O sistema consiste de três partes: uma unidade óptico-eletrônica, o biossensor e conectores de fibra óptica. O elemento de detecção tem duas camadas: um corante fluorescente e enzimas específicas (não mencionadas). As enzimas agem como catalisadores da reação e os produtos obtidos provocam alteração nas propriedades da fluorescência do corante. Essa alteração é detectada e correlacionada com a concentração de

atrazina. Sua versatilidade, facilidade de uso e baixos limites de detecção (mg/L e ng/L) são vantagens desse sensor (REARDON, 2010).

III.6.5- Biossensores comerciais disponíveis no mercado

Os biossensores comerciais disponíveis são utilizados, principalmente, na medicina e na agricultura. São capazes de fazer diagnósticos em tempo real por telemetria e possibilitam o monitoramento das funções fisiológicas do paciente a distância, mostram diretamente se a água está própria para consumo humano e monitoram crescimento de biomassa proveniente de bactérias em bovinos e humanos (DRUMMOND, 2009).

O exemplo mais conhecido no mercado é o biossensor que mede glicose no sangue. É um dispositivo portátil que usa como componente biológico a enzima glicose oxidase. A Figura XII mostra um aparelho portátil medidor de glicose (ONE TOUCH LA, 2013).



Figura XII- Medidor de glicose da marca OneTouch® (ONE TOUCH LA, 2013).

Na agricultura, o biossensor disponível no mercado desde 2010 é o OptiEnz Sensors, LLC. É um biossensor óptico e pode ser utilizado para detecção de muitos

pesticidas, incluindo triazinas, hidrocarbonetos halogenados e organofosforados. A Figura XIII mostra biossensor óptico (REARDON, 2010).



Figura XIII- Biossensor OptiEnz Sensors, LLC (REARDON, 2010).

Pesquisadores da UFMT e USP construíram um biossensor capaz de identificar a presença de metamidofós (Figura XIV), um pesticida altamente tóxico usado nas culturas de soja, milho, tomate e morango. É capaz de detectar o pesticida no solo, água e alimentos e seu funcionamento acontece de forma simples: em uma fina película, a enzima acetilcolinesterase é colocada, onde em condições normais emite prótons, mas quando em contato com moléculas de metamidofós, essa emissão é alterada. A detecção é feita em poucos minutos e a leitura é feita com a alteração mostrada, provando que há contaminantes na amostra. É um biossensor compacto e de baixo custo, de acordo com os pesquisados, seu valor varia entre R\$100 e R\$200 (“Detector de agrotóxico — CH,” [S.d.]).

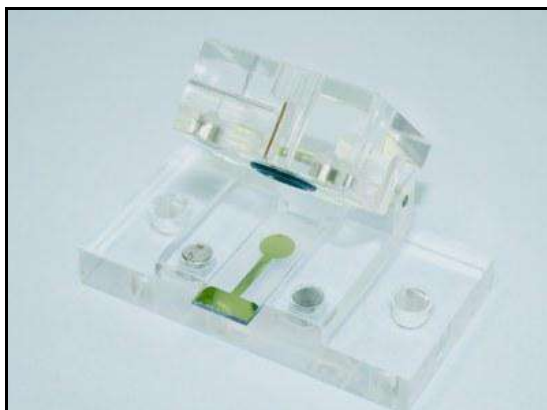


Figura XIV- Biossensor detector de metamidofós (“Detector de agrotóxico — CH,” [S.d.]).

Capítulo IV: Material e Métodos

IV.1- Preparo do biocomponente

IV.1.1- Moagem e Peneiramento do feijão de porco

Algumas etapas de “pré-tratamento” do feijão de porco foram realizadas, visando à obtenção de um biocomponente com a enzima mais biodisponível. Os grãos de feijão foram descascados manualmente usando uma lâmina de corte e triturados a seco em um triturador elétrico. Um peneira de uso doméstico de granulometria igual a 3mm foi usada para separação do pó do feijão a ser usado e, uma parte do material resultante do peneiramento foi utilizada imediatamente no processo de imobilização e a outra foi então estocada na geladeira, a 4°C, em recipiente vedado (SILVA, 2011). A Figura XV mostra as etapas do “pré-tratamento” do feijão de porco.

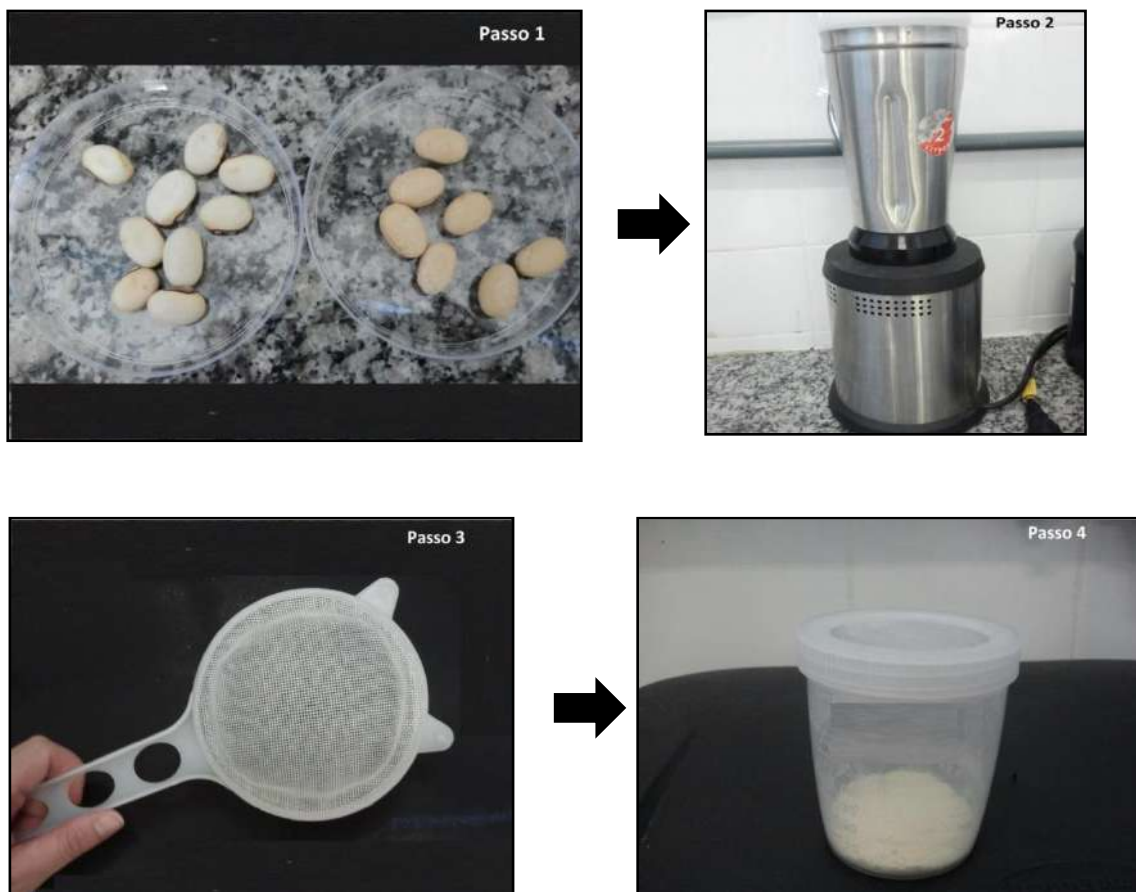


Figura XV- Esquema do "pré-tratamento" do feijão de porco. Passo 1: feijão *in natura* (esquerda) e feijão descascado (direita); Passo 2: Feijão descascado é levado para um triturador elétrico; Passo 3: Feijão triturado é peneirado ; Passo 4: o pó selecionado é armazenado em recipiente vedado.

IV.1.2- Imobilização do biocomponente em tela de nylon comercial

A imobilização foi baseada no trabalho de JUNIOR (1995) com algumas modificações ⁴⁹. No método, são utilizados telas de nylon comercial, anéis de PVC, elástico de borracha comercial (escritório), filme de PVC, tecido vegetal triturado (pó), solução de imobilização, tampão fosfato de sódio pH 6,0 e água destilada (Passo 1).

Na Figura XVI, o processo de imobilização é mostrado. A tela de nylon foi posicionada no centro do anel de PVC (Passo 2) onde 0,2g do tecido vegetal triturado (pó) foram colocados e espalhados a fim de cobrir toda a superfície (Passo 3). Então, 200 μ L de uma solução previamente preparada (solução de imobilização) com 300 μ L de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e 100 μ L de glutaraldeído 25,0% (solução de imobilização) foi depositada no tecido vegetal triturado (Passo 4). Outra tela de nylon foi usada para cobrir o material imobilizado e então presa com o elástico (Passo 5).

Após a confecção do material, o biocomponente imobilizado foi deixado por 20 minutos em contato com o ambiente, 15 minutos imerso em água destilada, 15 minutos imerso em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (Passo 6), envolto por um filme de PVC e armazenado na geladeira, a 4°C, por 24 horas, respectivamente.

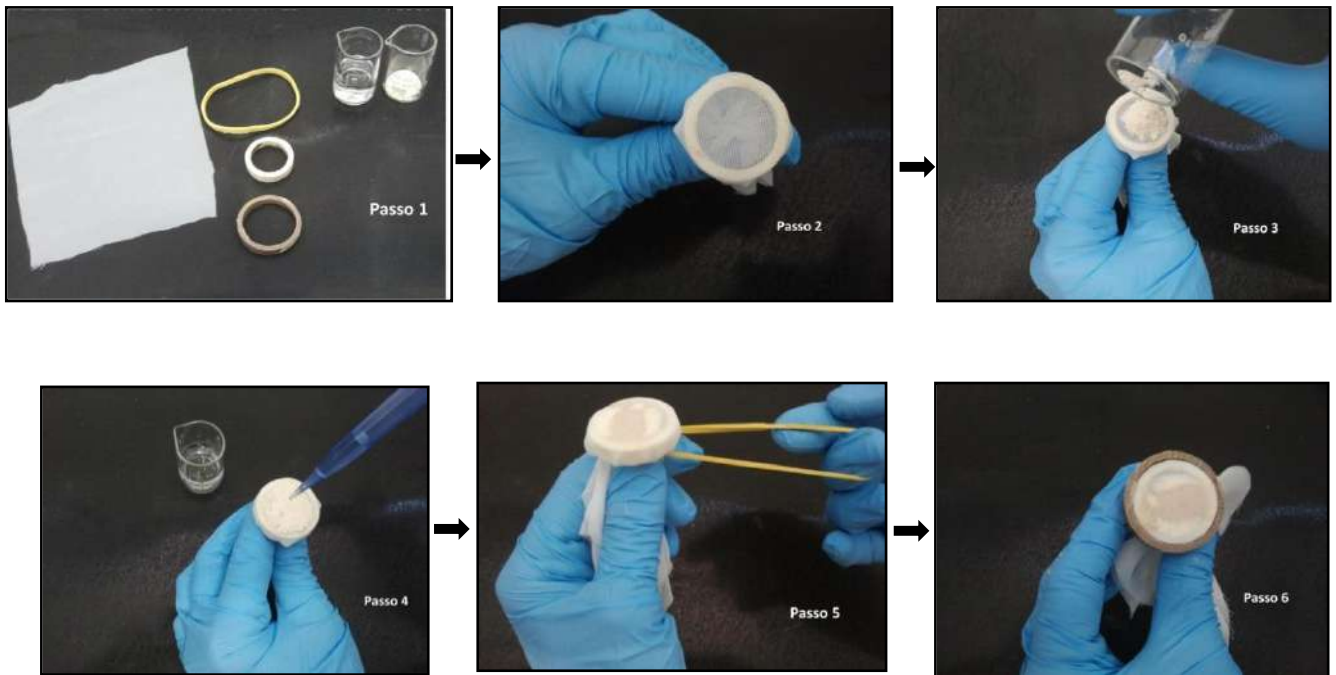


Figura XVI- Etapas da imobilização do biocomponente.

O uso do filme de PVC tem o objetivo de evitar o ressecamento e possível inativação do componente biológico. A solução de imobilização com glutaraldeído promove a ligação cruzada desejada que envolve a formação de ligação covalente entre as estruturas da superfície do tecido vegetal, formando estabilidade frente aos efeitos ambientais, como pH, temperatura, força iônica e uso de solventes (SILVA, 2011). A Figura XVII mostra as ligações covalentes.

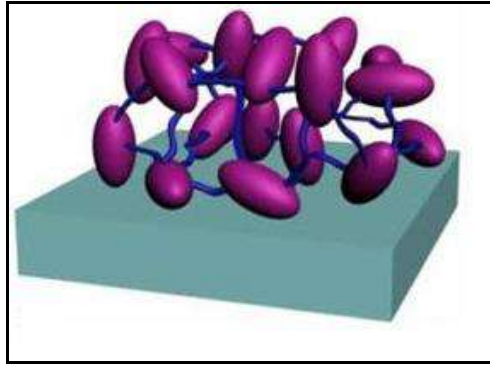


Figura XVII- Representação da ligação covalente do biocomponente com o suporte (tela de nylon) (SOUTHGATE, 2011).

IV.2- Calibração e Curva padrão do eletrodo íon seletivo a amônio

O transdutor utilizado no presente trabalho foi o eletrodo íon-seletivo a amônio. Antes de qualquer ensaio de inibição, a calibração do eletrodo e elaboração da curva padrão específica foi necessária a fim de monitorar o bom funcionamento do mesmo.

Para a curva padrão, soluções diluídas de cloreto de amônio (NH_4Cl) em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (soluções padrão) foram feitas nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 40, 50 e 100ppm.

Para o início da calibração, o eletrodo foi imerso em 5mL das soluções de cloreto de amônio, nas concentrações mencionadas anteriormente, com 100 μL de NaOH 10M (solução de ajuste de força iônica).

Após 4 minutos de reação, a leitura do sinal (em mV) produzido foi registrada. Entre as leituras, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel macio.

A Figura XVIII mostra uma curva padrão encontrada na calibração do eletrodo. É um gráfico com tendência logarítmica correlacionando os valores de mV encontrados com suas respectivas concentrações padrão de amônia (SILVA, 2011).

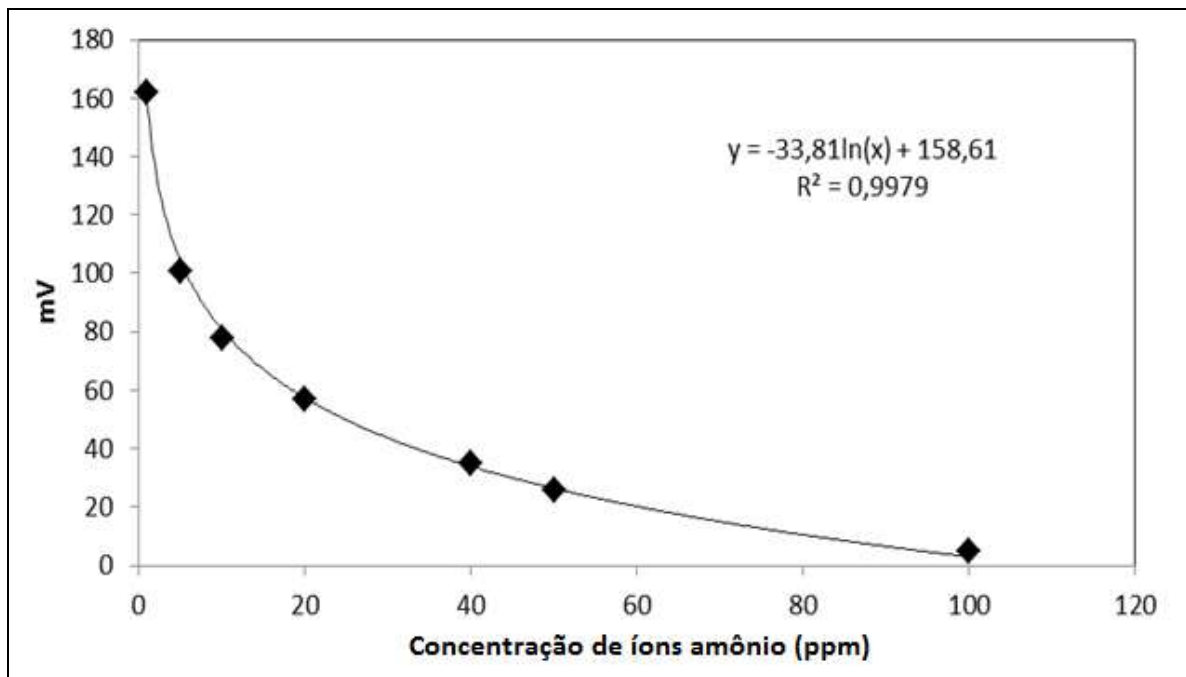


Figura XVIII- Exemplo de uma curva padrão do eletrodo íon-seletivo de amônio.

IV.3- Estudo da estabilidade da enzima urease presente no tecido vegetal imobilizado

A estabilidade da enzima se dá por sua aptidão de reter sua capacidade catalítica sob diferentes condições de reação ao longo do tempo. Após montar o perfil de variação da resposta do transdutor ao longo do tempo com o biocomponente imobilizado e imerso na solução padrão de ureia de 10ppm, observou-se que houve estabilização da resposta do eletrodo a partir do tempo de 15 minutos (SILVA, 2011).

No presente trabalho, esses parâmetros definidos por SILVA (2011) foram utilizados para o início dos experimentos. A Figura XIX mostra o perfil de variação da resposta do transdutor ao longo do tempo com ureia a 10ppm.

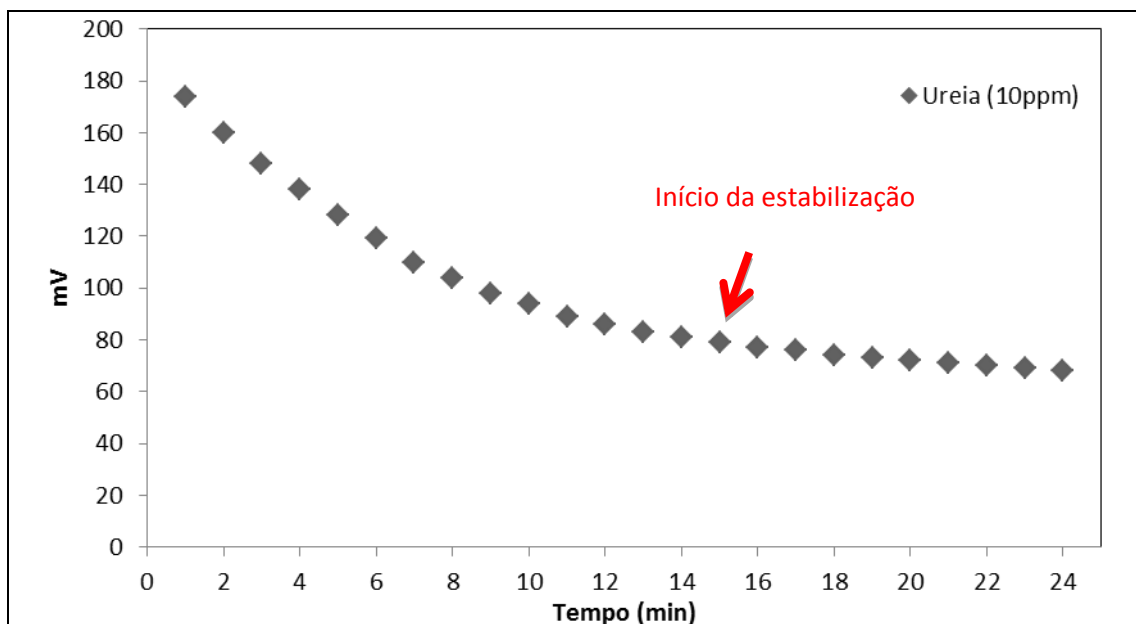


Figura XIX- Exemplo de estabilização da resposta do eletrodo íon-seletivo de amônio para ureia 10ppm.

IV.4- Aparato experimental e condições reacionais

O esquema do aparato experimental usado nos experimentos é mostrado na Figura XX e foram realizados usando o eletrodo íon-seletivo a amônio, o biocomponente imobilizado (fonte de urease) imersa em uma solução contendo 20mL de ureia (10ppm), 350 μ L de NaOH (10M) e diferentes volumes da solução mãe de atrazina (herbicida) com concentração de 200ppb. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os melhores resultados são apresentados no Capítulo V.



Figura XX- Esquema do aparato experimental usado nos experimentos realizados.

A Tabela I mostra os volumes adicionados e as concentrações finais de atrazina. Foram feitos estudos do tempo de adição do herbicida, tempo de reação da atrazina com a urease, diferentes formas de agitação e reutilização do componente biológico imobilizado.

Tabela I- Concentrações finais de atrazina no sistema.

Volume de atrazina adicionado (mL)	Concentração final de atrazina (ppb)
0,002	2
0,005	5
1,0	9
2,0	18
3,0	26
4,0	33
5,0	40
6,0	46

IV.4.1- Estudo do tempo de adição do herbicida atrazina

Considerando o tempo de estabilização da leitura do eletrodo e da enzima (15 minutos), testes foram realizados com o objetivo de definir o melhor tempo da adição da atrazina na solução buscando assim indícios da ocorrência de inibição enzimática (SILVA, 2011). Os tempos considerados nos experimentos foram de 1, 5 e 10 minutos.

IV.4.2- Estudo do tempo reacional da urease com a atrazina

Sabe-se que a atrazina é um defensivo agrícola da classe dos herbicidas, portanto o estudo do tempo reacional teve o intuito de investigar a ocorrência de inibição enzimática (AQUINO *et. al.*, 2013).

Para o experimento com adição de atrazina em 10 minutos, os tempos considerados foram de 5, 10 e 15 minutos. Com os ensaios de adição com 1 e 5 minutos, os tempos de contato analisados foram de 5, 10 e 20 minutos. O tempo total do ensaio foi de 25 minutos.

IV.4.3- Estudo da interferência da agitação (mecânica e magnética)

Os testes com agitação mecânica manual e agitação magnética, ambas por 10 segundos, foram realizados após a adição de atrazina, com o objetivo de estudar a interferência da agitação na resposta do eletrodo em relação ao processo de inibição.

IV.4.4- Estudo da reutilização do componente biológico

O estudo da reutilização da enzima imobilizada se deu da seguinte forma: após a utilização da enzima pela primeira vez, a mesma foi lavada com água destilada, envolta em filme de PVC e armazenada em geladeira, a 4°C. No ensaio seguinte, a enzima foi reutilizada com o intuito de estudar a viabilidade da mesma.

IV.4.5- Análise das respostas dos ensaios de inibição da urease

O procedimento de leitura, com o sistema e o eletrodo íon- seletivo a amônio, foi realizado de minuto em minuto, começando com a leitura do eletrodo (em mV) com a ureia pura. Em seguida, as leituras foram feitas com a ureia mais a adição de atrazina, considerando todas as condições estudadas no presente trabalho.

A partir do tempo de adição da atrazina até o final da reação, foi determinada a variação de milivoltagem dada pelo eletrodo, da ureia pura (ΔmV_{pura}) e das adições de atrazina (ΔmV_{inib}).

Considerando então essa variação, procurou-se então alguma relação entre a atividade da enzima quando exposta somente ao substrato e a inibição da mesma imersa ao substrato mais o herbicida.

A inibição enzimática (I) foi relacionada como porcentagem pela Equação II.

$$I(\%) = \frac{(\Delta mV_{\text{pura}} - \Delta mV_{\text{inib}}) * 100}{\Delta mV_{\text{pura}}} \quad (\text{II})$$

Capítulo V: Resultados e Discussões

V.1- Influência da interferência da agitação (mecânica e magnética)

Na Figura XXI, observam-se os resultados com a agitação mecânica que foi realizada no tempo de adição de atrazina de 10 minutos, por 10 segundos, e utilizando-se o próprio eletrodo para homogeneizar a solução. Assim, observa-se no gráfico que, com a utilização da agitação manual, houve interferência na leitura do eletrodo íon seletivo fazendo com que o potencial elevasse seu valor, mascarando então uma possível avaliação dos resultados de inibição.

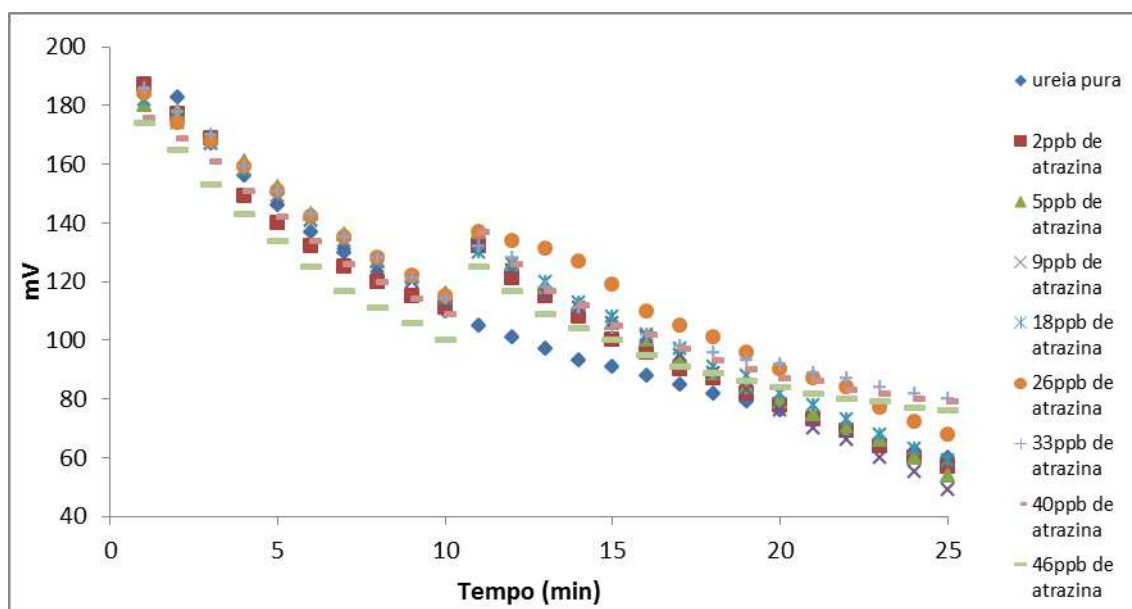


Figura XXI- Ensaio feito com agitação mecânica por 10 segundos, no tempo de adição artificial de atrazina de 10 minutos.

Após constatação de que a agitação mecânica interferia na leitura do eletrodo, a agitação magnética foi testada. A Figura XXII mostra os resultados com agitação magnética que foi realizada por 10 segundos, no tempo de adição artificial de atrazina de 5 minutos onde o eletrodo permaneceu imóvel e somente a solução foi homogeneizada.

Observa-se que não houve qualquer tipo de interferência na leitura do eletrodo podendo então investigar a possível ocorrência de inibição enzimática. Assim, constatou-se que esta era a melhor forma de agitação a ser utilizada no trabalho.

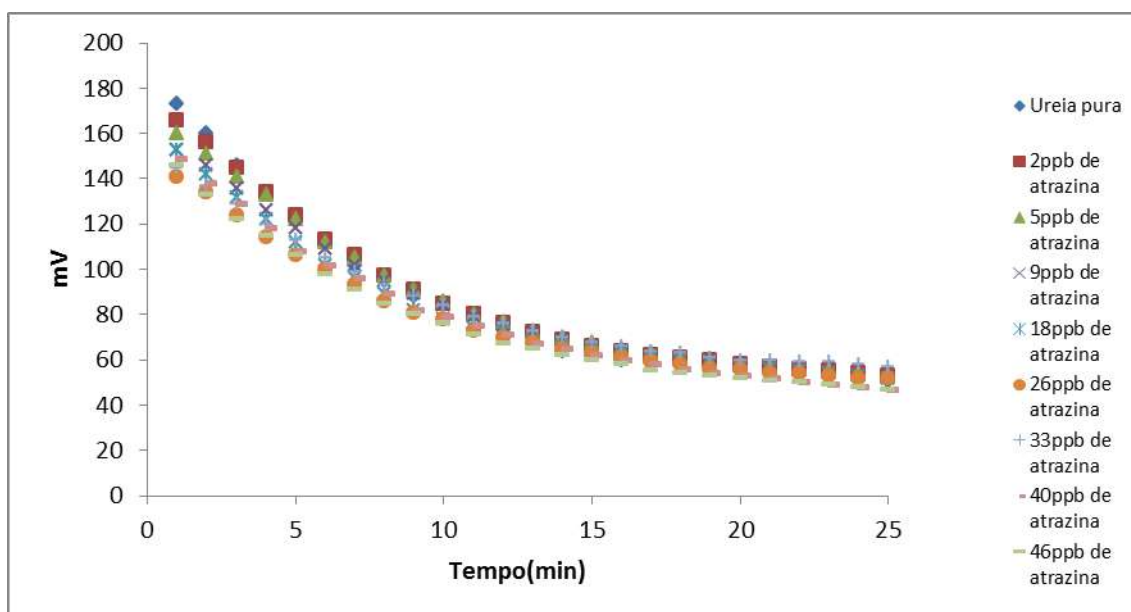


Figura XXII- Ensaio feito com agitação magnética por 10 segundos, no tempo de adição artificial de atrazina de 5 minutos

V.2- Influência do tempo de adição do herbicida

SILVA ⁴⁹ observou que o tempo necessário para a estabilização da resposta do eletrodo, com solução padrão de ureia 10ppm com a enzima imobilizada, foi de 15 minutos, portanto a adição de atrazina foi efetuada antes da estabilização, a fim de averiguar o melhor tempo de acréscimo do herbicida.

Várias hipóteses são consideradas no sistema imobilizado, como: menor transferência de massa do meio reacional para a enzima, já que há redução da difusão da ureia nos interstícios do suporte, decréscimo da velocidade das enzimas presentes no tecido vegetal devido às mudanças conformacionais na sua estrutura terciária ou aos impedimentos estéreos que resultam na dificuldade de acesso do substrato ao seu sítio ativo (MATEO *et. al.*, 2000).

Para investigação da inibição foi analisado o módulo da variação de potencial, que resulta da leitura do potencial no início da adição do herbicida ($mV_{adição}$) e no final da reação (mV_{final}), da solução de ureia pura (sem interferente) e da solução em diferentes concentrações do herbicida. A Equação III exemplifica o cálculo do módulo da variação de potencial ($I\Delta mV$).

$$|\Delta mV| = mV_{\text{final}} - mV_{\text{adição}} \quad (\text{III})$$

A resposta do eletrodo se dá da seguinte forma: quanto mais íons amônio na solução, menor será seu valor de potencial. Cada experimento começou com diferentes valores iniciais, por esse motivo, avaliou-se o valor da variação de potencial fazendo com que o método fosse algo quantificável.

Para o tempo de 10 minutos, como mostra a Figura XXIII e Tabela II, a avaliação da adição foi prejudicada, pois a agitação mecânica manual causou interferência na resposta do eletrodo e os valores de 2 a 18ppb foram maiores que a solução sem interferente, então com esses testes nenhuma consideração pôde ser feita.

Tabela II- Módulo da variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 10 minutos.

	Concentração de atrazina (ppb)									
	0	2	5	9	18	26	33	40	46	
mVadição (10min)	110	111	116	113	114	115	114	109	100	
mVfinal (25min)	60	57	54	49	59	68	80	79	76	
 \Delta mV 	50	54	62	64	55	47	34	30	24	

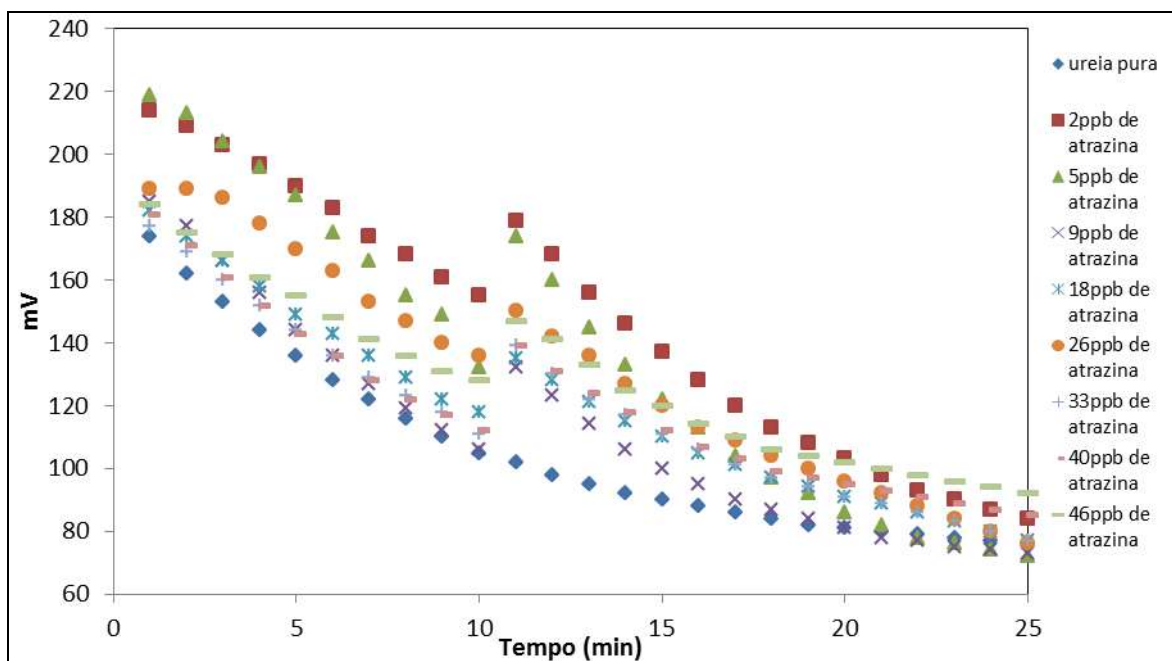


Figura XXIII- Ensaio de adição artificial de atrazina em 10 minutos com agitação manual.

Imediatamente após a constatação do melhor método de agitação, os testes com adição de atrazina em 10 minutos não foram novamente realizados, pois se constatou que esse tempo estava muito próximo da estabilização do eletrodo (15 minutos), prejudicando então qualquer visualização de inibição. Por esse motivo, tempos inferiores foram analisados.

A Figura XXIV apresenta a adição artificial de atrazina no tempo de 5 minutos. A Tabela III, mostra o módulo da variação de potencial para adição de atrazina em 5 minutos para identificação da inibição. Notou-se que a partir de 5ppb, o ΔmVI foi menor que o mesmo sem a presença de atrazina mostrando que a partir dessa concentração a enzima consumiu uma quantidade de substrato menor que quando exposta somente a ureia pura, indicando a possibilidade de que a atrazina estava interferindo na reação da ureia com a urease, notando então, indícios de inibição enzimática.

Tabela III- Módulo da variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 5 minutos.

	Concentração de atrazina (ppb)								
	0	2	5	9	18	26	33	40	46
mVadição (5min)	138	138	136	131	131	124	124	132	127
mVfinal (25min)	63	63	67	65	64	63	62	64	65
ΔmVI	75	75	69	66	67	61	62	68	62

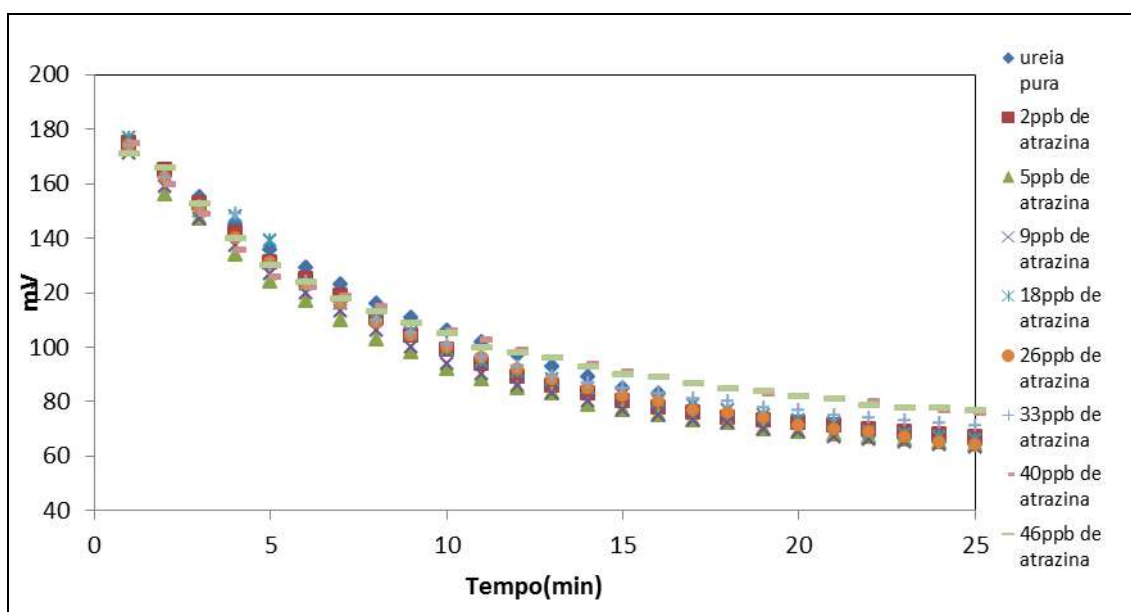


Figura XXIV- Ensaio de adição artificial de atrazina em 5 minutos com agitação magnética.

A Figura XXV apresenta a adição artificial de atrazina no tempo de 1 minuto. A Tabela IV mostra o módulo da variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 1 minuto. A partir de 2ppb, observou-se que o ΔmVI na adição foi menor que o ΔmVI sem a presença de atrazina. Com a adição artificial de atrazina em 1 minuto, houve maior sensibilidade a menores concentrações.

Tabela IV- Variação de potencial analisado para adição de atrazina no tempo de 1 minuto.

	Concentração de atrazina (ppb)									
	0	2	5	9	18	26	33	40	46	
mVadição (1min)	173	166	160	153	153	141	145	149	146	
mVfinal (26min)	50	52	52	51	52	51	56	47	46	
ΔmVI	123	114	108	102	101	90	89	102	100	

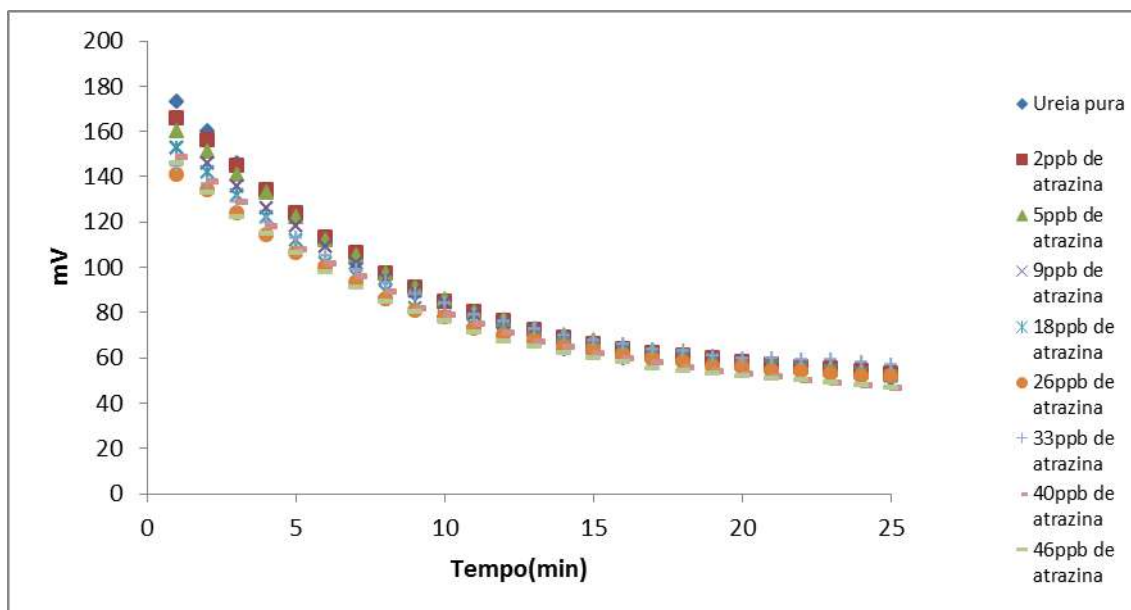


Figura XXV- Ensaio de adição artificial de atrazina em 1 minuto com agitação magnética.

V.3- Influência do tempo reacional do herbicida com a urease

Para a determinação da influência do tempo de reacional entre a urease (presente no tecido vegetal) e a atrazina, foram feitos cálculos de porcentagem de inibição, por meio da Equação II no Item IV.4.5, para cada concentração do herbicida, com tempos de reação (a partir da adição) de 5, 10 e 20 minutos.

A Figura XXVI mostra o tempo de reação do herbicida (adicionado em 10 minutos) e da enzima. Notou-se que o melhor tempo foi de 5 minutos, mas esse resultado não foi considerado, pois houve interferência de agitação neste teste. Concluiu-se então, que nenhuma análise coerente pôde ser realizada neste experimento, pois os valores das porcentagens foram negativos no tempo de 10 e 15 minutos.

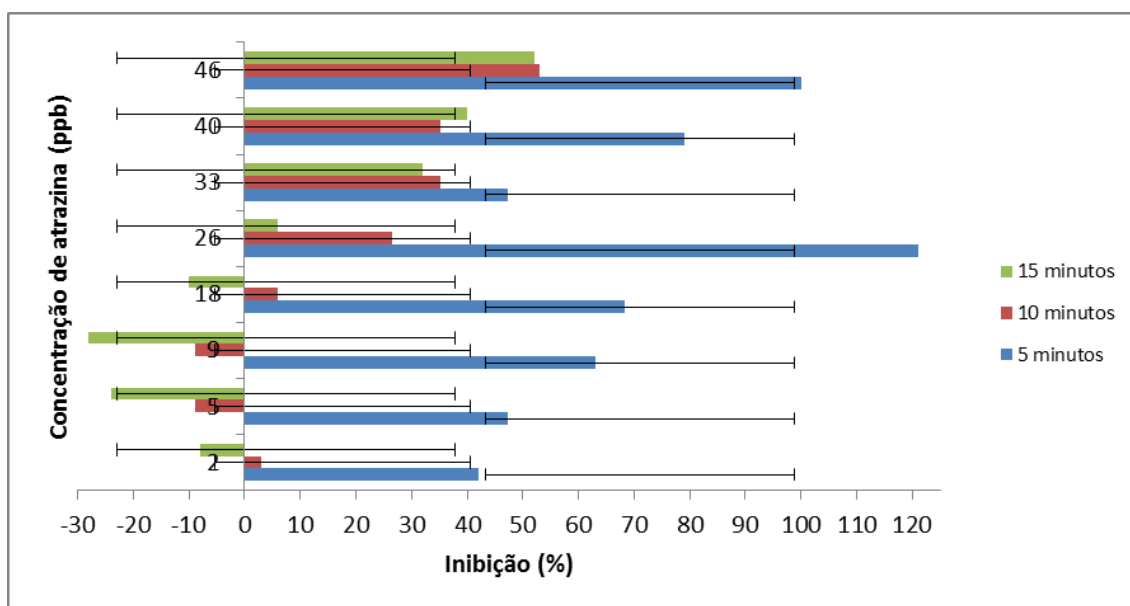


Figura XXVI- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 10 minutos) com a urease.

Na Figura XXVII, contata-se que ocorreu interferência por conta do processo de agitação mecânica manual não podendo, estatisticamente, ser avaliado.

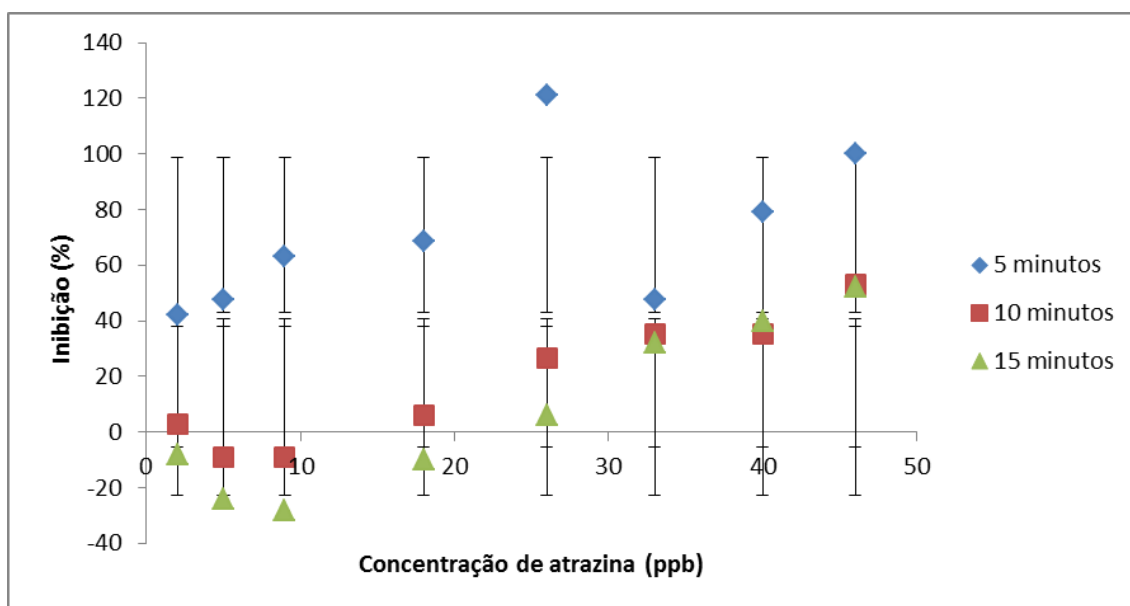


Figura XXVII- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 10 minutos) e da urease.

O mesmo procedimento foi feito para a avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 5 minutos) e a urease. Notou-se que a maior porcentagem de inibição encontrada para todas as concentrações do herbicida foi no tempo de 5 minutos, como mostra a Figura XXVIII.

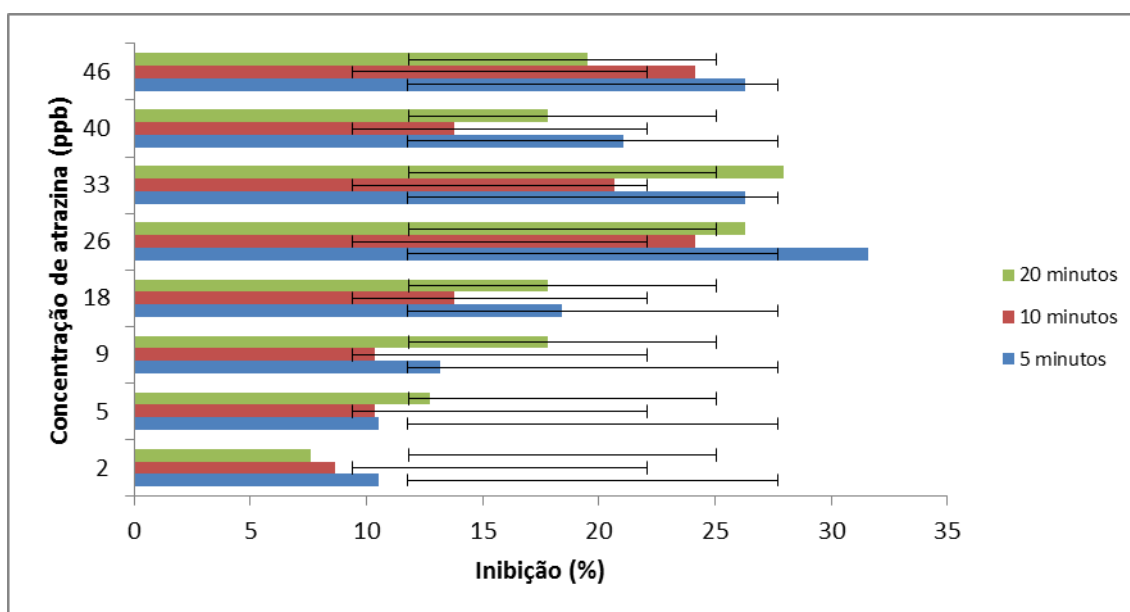


Figura XXVIII- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 5 minutos) com a urease.

Nas concentrações de 2 a 26ppb de atrazina, traçando um reta entre essas concentrações, obtemos $R^2 = 0,8752$ (5 minutos), $R^2 = 0,872$ (10 minutos) e $R^2 = 0,915$ (20 minutos), constatando então que o mesmo estava abaixo do desejado ($R^2 = 0,999$). Portanto, considerando toda a faixa de concentração, não ocorreu um padrão de aumento da porcentagem de inibição com o aumento da concentração do herbicida, como mostrado na Figura XXIX.

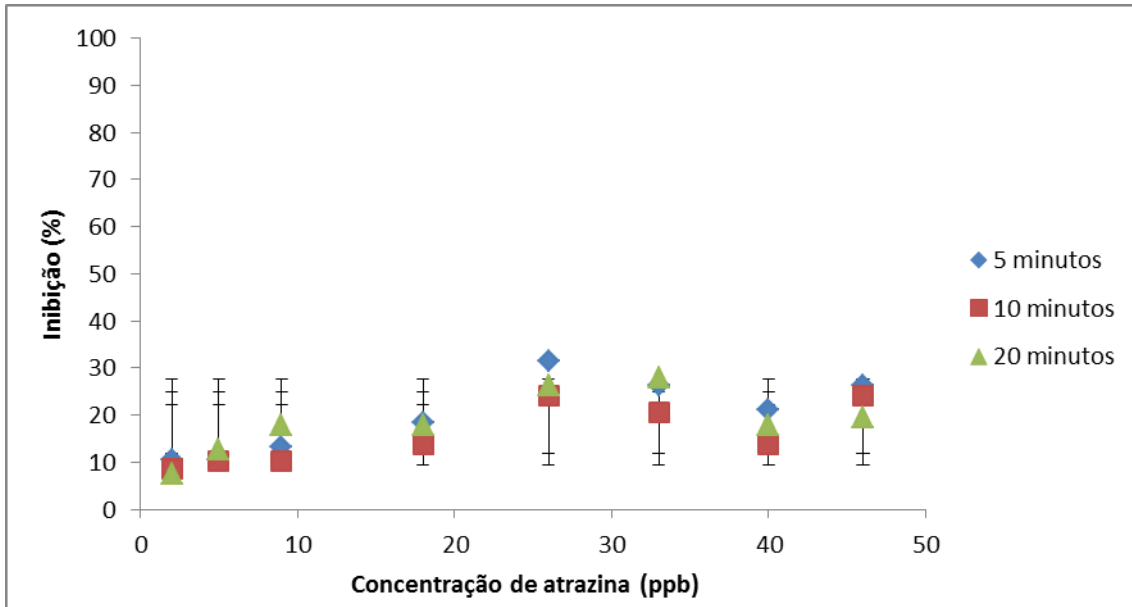


Figura XXIX- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 5 minutos) e da urease.

Na Figura XXX, a avaliação do tempo reacional do herbicida (adicionado em 1 minuto) e da enzima também foi realizada pelo procedimento mencionado anteriormente.

Notou-se que no tempo de contato de 5 minutos, a maior porcentagem de inibição se deu nas concentrações de atrazina de 5, 9, 26, 33ppb e em 10 minutos, nas concentrações de 18, 40 e 46ppb. Para a concentração de atrazina a 2ppb, com os tempos de 5 e 10 minutos de contato, os valores foram iguais.

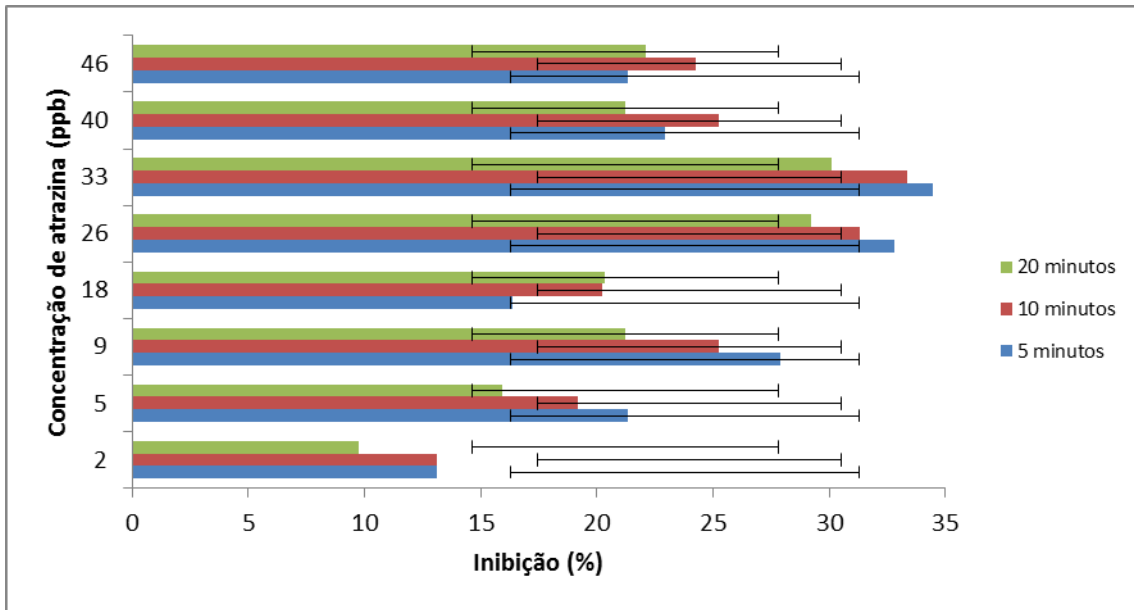


Figura XXX- Tempo de contato da atrazina (adicionada em 1 minuto) com a urease.

Na Figura XXXI, notou-se que nos tempos de contato de 10 e 20 minutos para as concentrações de 2, 5 e 9ppb, ocorreu um padrão de aumento da porcentagem de inibição com o aumento da concentração da atrazina com $R^2 = 0,25$ (5 minutos), $R^2 = 0,9932$ (10 minutos) e $R^2 = 0,9932$ (20 minutos).

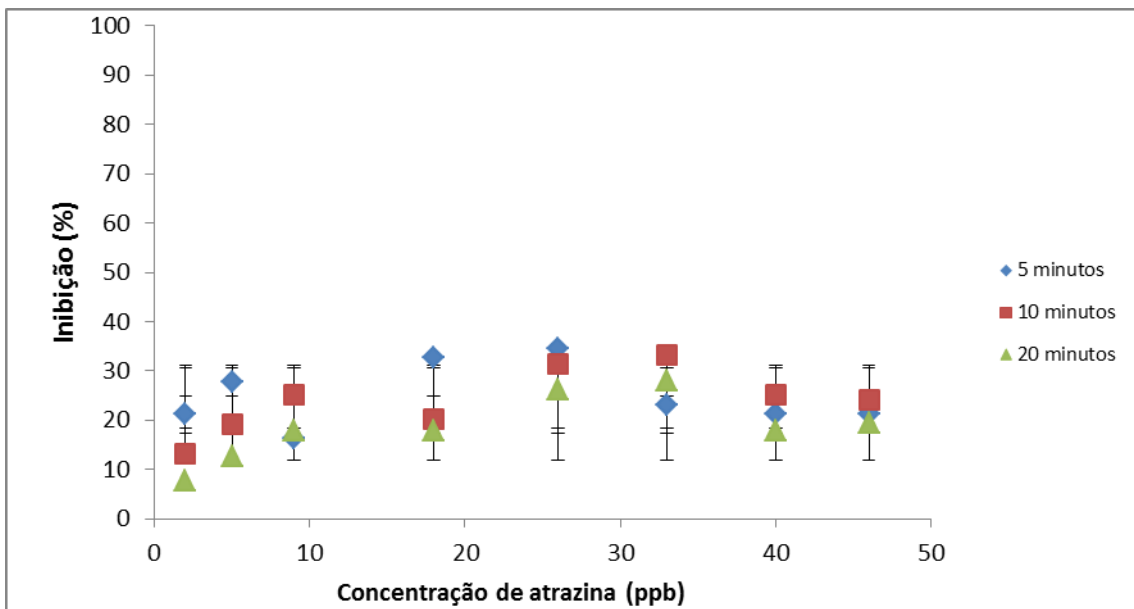


Figura XXXI- Avaliação do tempo reacional da atrazina (adicionada em 1 minuto) e da urease.

V.4- Influência da reutilização do componente biológico

A Figura XXXII apresenta a utilização do biocomponente pela primeira vez e mostra o experimento completo onde a adição artificial de atrazina foi feita em 10 minutos e com agitação mecânica manual.

Constatou-se nos itens anteriores que nenhuma avaliação plausível pôde ser realizada, mas com o objetivo de comparação da reutilização, esse teste pôde ser validado. Notou-se que antes de 10 minutos (na adição de atrazina), o teste confirmou a resposta do eletrodo íon-seletivo a amônio onde mostra que, quanto mais íons amônio na solução, menor seria o valor de potencial.

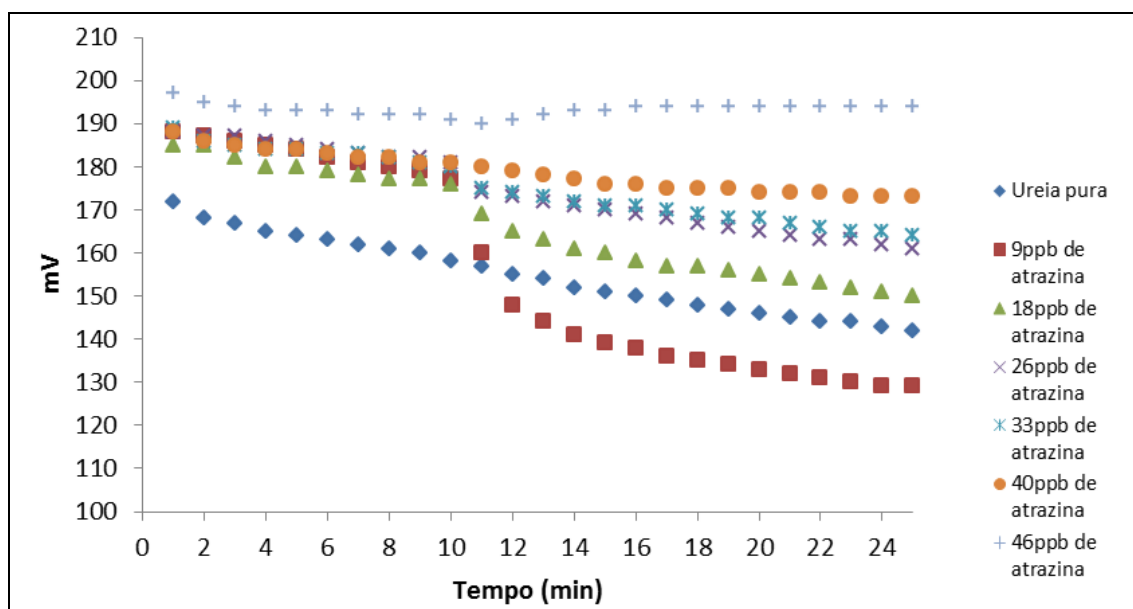


Figura XXXII- Biocomponente utilizado pela primeira vez, com tempo de adição de atrazina em 10 minutos e agitação manual.

O biocomponente, que estava armazenado conforme Item IV.4.4, foi reutilizado com o intuito de investigar se o mesmo poderia reproduzir os resultados do primeiro ensaio.

Na Figura XXXIII comprovou-se que a reutilização do componente biológico não foi viável, pois a própria curva utilizando o substrato natural (ureia pura) apresentou-se de forma diferente do esperado encontrado nos demais ensaios (curva logarítmica).

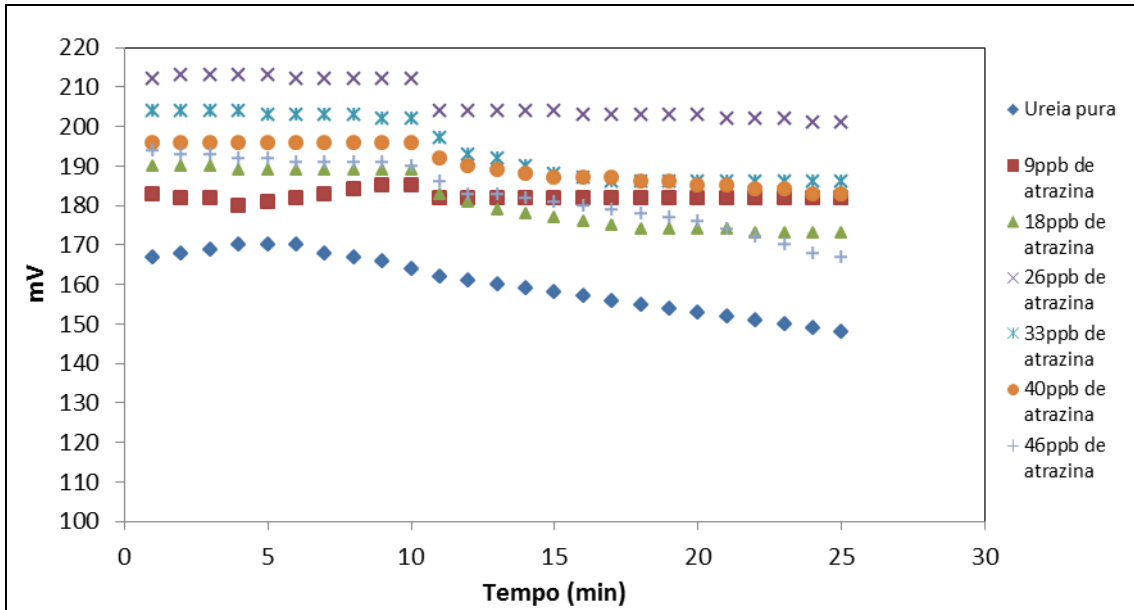


Figura XXXIII- Biocomponente reutilizado, com tempo de adição de atrazina em 10 minutos e agitação manual.

Capítulo VI: Análise preliminar de viabilidade econômica do biossensor de ureia para atrazina por inibição enzimática

A análise de viabilidade econômica visa averiguar o processo produtivo como maquinário, conhecimento da tecnologia e das técnicas capazes de fornecer um produto da forma mais barata e eficiente (KRAYCHETE, 1997).

O estudo de viabilidade econômica do biossensor teve como objetivo projetar e identificar custos relativos à estruturação de um laboratório voltado para utilização do biossensor potenciométrico de ureia confeccionado por SILVA (2011) para análises de amostras retiradas do meio ambiente que possam conter atrazina como agente poluente.

Na Tabela V, foram analisados os custos dos equipamentos considerando uma vida útil de 5 anos (custo fixo), os reagentes utilizados nas análises (Tabela VI) e material suporte para as análises (Tabela VII), sendo os dois últimos citados custos variáveis.

Tabela V- Equipamentos fixos.

Equipamentos	Marca	Valor (R\$)
Eletrodo íon seletivo a amônio	Labtec	3.950,00
Agitador magnético	Prolab	1.400,00
Liquidificador elétrico	Siemens	775,21
Balança analítica de alta precisão	Prolab	3.500,00
Estufa	Prolab	2.500,00
Destilador	SPLabor	1.100,00
Bomba dosadora peristáltica	SPLabor	5.050,00
Geladeira (264L)	Electrolux	1.250,00
Vidrarias	Prolab	1114,50
Pipetas volumétricas automáticas (5 unidades)	Prolab	462,50
EPI (respiradores)	Termo Rio	115,00
Instek GPS-2303 (transdutor- 2 canais)	Tequipment	3.097,90
Total		24.315,11

Tabela VI- Reagentes utilizados.

Reagente	Quantidade	Marca	Valor (R\$)
Glutaraldeído 25%	25mL	Aldrich	217,00
NaH₂PO₄.H₂O	1Kg	Vetec química/Sigma	62,00
NaH₂PO₄.7H₂O	500 g	Sigma/Aldrich	88,00
Ureia	1Kg	Sigma	253,00
NH₄Cl	1Kg	Vetec química/Sigma	16,00
NaOH	1Kg	Vetec química/Sigma	38,00
Atrazina	250mg	Flukar	183,00

Tabela VII- Material suporte.

Material	Quantidade	Marca	Valor (R\$)
Membrana para o eletrodo	20 unidades	Labtec	950,00
Solução interna do eletrodo	60mL	Labtec	470,00
Câmara reacional de PVC	6 peças	Tigre	7,19
Tela de nylon comercial	1m	----	3,00
Tubo de PVC (anéis de PVC)	3m	Tigre	29,90
Elástico de escritório	2200 unidades	Mercur	34,00
Filme de PVC	30m	Wyda Pratic	2,99
Luvras de acrilato	100 unidades	Termo Rio	39,00
Peneira (3mm)	1 unidade	Sanremo	5,40
Lenço de papel	50 unidades	Kleenex	2,61
Filtros (respirador)	2 unidades	Termo Rio	86,00

Além disto, foram projetados o custo do preparo do sistema da curva de calibração (Tabela VIII), bem como custo de oito análises por dia, correspondente ao número de análises feitos nos experimentos do presente trabalho (Tabela IX), e o custo de uma análise por dia (Tabela X) .

Tabela VIII- Custo do preparo das soluções da curva de calibração.

Soluções de NH₄Cl (ppm)	Valor (R\$)
1	0,0000008
5	0,000004
10	0,000008
20	0,000016
40	0,000032
50	0,00004
100	0,00008
TOTAL	0,0001808

Tabela IX- Custo do preparo do sistema para oito análises por dia.

Análise	Valor (R\$)
20mL de ureia (10 ppm)	0,24
1mL de Atrazina (200ppb)	0,009344
Biocomponente imobilizado no suporte	11,49
Eletrodo íon seletivo a amônio (fixo)	4,30
Lenço de papel	0,41
TOTAL	16,44
TOTAL (1 amostra)	2,05

Tabela X- Custo de uma análise por dia.

Análise	Valor (R\$)
20mL de ureia (10 ppm)	0,03
1mL de Atrazina (200ppb)	0,001168
Biocomponente imobilizado no suporte	1,43
Eletrodo íon seletivo de amônio (fixo)	4,30
Lenço de papel	0,05
TOTAL	5,81

A fim de comprovar o baixo custo do uso do biossensor, foi feita uma comparação com outro método analítico usado no mercado para detecção de atrazina. O método escolhido foi o de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS), feito pela empresa Centro de Qualidade Analítica LTDA (CQA-Laboratórios). O orçamento da empresa foi de R\$ 390,00 por amostra analisada, totalizando R\$ 3.120,00 por oito amostras.

A Tabela XI apresenta uma comparação dos custos dos dois métodos mencionados.

Tabela XI- Comparação de custo do método analítico e do biossensor.

Comparação		
Métodos	GC-MS (R\$)	Biossensor de ureia (R\$)
1 amostra	390,00	84,72
8 amostras	3120,00	95,51

Para o valor total do biossensor de ureia foram considerados os valores dos equipamentos com vida útil de 5 anos, custo de um técnico em química de acordo com o piso salarial do Conselho Regional de Química (R\$ 1.940,00), imposto de renda (IRRF de 1,5%), além do custo das análises e custos variáveis.

Capítulo VII: Conclusões

No presente trabalho, a melhor opção para realização dos experimentos foi a utilização da agitação magnética, pois homogeneizava a solução da melhor forma, mantendo o eletrodo imóvel e não interferindo na resposta do mesmo.

No estudo de investigação da reutilização do biocomponente, inferiu-se que o mesmo perdeu sua atividade após o primeiro uso. Assim, sua reutilização não foi possível, sendo considerado, portanto, um material descartável.

Em relação ao tempo de adição artificial de atrazina a melhor condição se deu em 1 minuto, pois teve maior sensibilidade a baixas concentrações, permitindo que toda faixa utilizada no estudo fosse detectada.

Para a determinação do melhor tempo reacional entre o herbicida com o biocomponente imobilizado, apesar dos indícios de inibição enzimática, concluiu-se que não houve um padrão de aumento da porcentagem de inibição com o aumento da concentração de atrazina, não permitindo afirmar qual o melhor tempo de contato entre eles. Assim, na faixa estudada de concentração de atrazina, não foi possível construir uma curva de calibração do método.

Em termos da análise preliminar da viabilidade econômica do sistema proposto para detecção, quando comparado com o método analítico Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS), o biossensor de ureia provou ser o método mais viável economicamente.

Capítulo VII: Sugestões para ensaios futuros

A fim de dar continuidade ao presente trabalho, algumas sugestões são dadas, a saber:

- Avaliar as condições estudadas com volumes finais iguais para todas as análises, a fim de padronizá-las,
- Aumentar a quantidade de biocomponente imobilizado utilizado para analisar se haverá alguma mudança da sensibilidade na detecção,
- Utilizar o extrato enzimático vegetal das raízes e folhas do biocomponente, para investigar se a urease se torna mais sensível a atrazina. Sabe-se que, de acordo com o mecanismo de ação, ou seja, onde o herbicida atua, a atrazina tem baixa penetração em grãos, sendo então mais absorvida por raízes e folhas por atuar na fotossíntese (JUNIOR, 2011).
- Montar um transdutor para analisar o íon amônio mais sensível, visto que, o eletrodo íon-seletivo a amônio comercial apresenta limitação de leitura e seletividade, conforme mostrado em seu manual de uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrotóxicos* - MAPA. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos>>. Acesso em: 25 out. 2013.
- AINSWORTH, Claire. *Cell biology: Stretching the imagination*. Nature. [S.l: s.n.]. , 2008
- AMBIENTE, Meio; APLICA, D E Principais. Ureia Industrial. [S.d.].
- ANDREOU, Vangelis G; CLONIS, Yannis D. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use. *Biosensors & bioelectronics*, v. 17, n. 1-2, p. 61–9, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742736>>.
- AQUINO, Regimeire Freitas *et al.* Soil losses from typic cambisols and red latosol as related to three erosive rainfall patterns. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 37, n. 1, p. 213–220, fev. 2013. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832013000100022&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- ARNDTSEN, Bruce a. *et al.* Selective Intermolecular Carbon-Hydrogen Bond Activation by Synthetic Metal Complexes in Homogeneous Solution. *Accounts of Chemical Research*, v. 28, p. 154–162, 1995. Disponível em:
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar00051a009>>.
- BARTH, Gabriel. Inibidores de urease e de nitrificação na eficiência de uso de adubos nitrogenados Piracicaba Engenheiro Agrônomo Inibidores de urease e de nitrificação na eficiência de uso de a. 2009.
- Bibliomed – Central de Toxicologia – fichários de venenos - Central de Toxicologia - Atrazina*. Disponível em:
<<http://www.bibliomed.com.br/toxicology/showdoc.cfm?LibCatID=-1&bookchptrid=3550&titulo=central-de-toxicologia-atrazina.html>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- Boletim Agrotóxicos | FEAB on WordPress.com*. Disponível em:
<<http://feab.wordpress.com/contra-os-agrotoxicos/>>. Acesso em: 21 out. 2013.
- BRAIBANTE, MARIA ELISA FORTES; ZAPPE, Janessa Aline. A Química dos Agrotóxicos. v. 34, p. 10–15, 2012.
- Detector de agrotóxico — CH*. Disponível em:
<<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2013/09/detector-de-agrotoxico>>.

- DIXON, N E *et al.* Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian journal of biochemistry*, v. 58, p. 1335–1344, 1980.
- DOS SANTOS, V P S. Desenvolvimento de um método de detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná. 2012.
- ESTIU, Guillermina; MERZ, Kenneth M. Catalyzed decomposition of urea. Molecular dynamics simulations of the binding of urea to urease. *Biochemistry*, v. 45, p. 4429–4443, 2006.
- FERTILIZANTE, Ureia; FISHER, Karl. Ureia Fertilizante. p. 99–100, [S.d.].
- FOLLMER, Cristian. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, v. 69, n. 1, p. 18–28, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706733>>. Acesso em: 25 out. 2013.
- KOMENDA, Josef *et al.* A Biosensor for the Detection of Triazine and Phenylurea Herbicides Designed Using Photosystem II Coupled to a Screen-Printed Electrode. n. 94, 2002.
- KRAYCHETE, Gabriel. Como fazer um estudo de viabilidade econômica 1. 1997.
- KUSWANDI, Bambang; FIKRIYAH, Chulaifah Indah; GANI, Agus Abdul. An optical fiber biosensor for chlorpyrifos using a single sol-gel film containing acetylcholinesterase and bromothymol blue. *Talanta*, v. 74, n. 4, p. 613–8, 15 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371683>>. Acesso em: 25 out. 2013.
- MARIOTTO, Juliana Ribeiro. Cinética Enzimática. 2006.
- NORTOX. Disponível em: <<http://www.nortox.com.br/detprod.php?id=3>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- Nosso Futuro Roubado*. Disponível em: <<http://www.nossofuturoroubado.com.br/portal/agricultura/relatorio-especial-a-campanha-da-syngenta-para-proteger-a-atrazina-desacreditando-as-criticas>>. Acesso em: 22 out. 2013.
- REARDON, Ken; SENSORS, Optienz; OPTIENZ, The. Biosensors for continuous , in-place , real time measurement of atrazine and other halogenated pesticides. v. 1, n. 970, p. 2–3, 2010.
- RESOLUÇÃO CONAMA no 396. p. 64–68, 2008.
- RIBAS, Priscila Pauly. A química dos agrotóxicos : impacto sobre a saúde e meio ambiente Resumo. 1970.

RIDDLES, P W *et al.* Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene*, v. 108, p. 265–267, 1991.

RODRIGUES, Leonardo. *Estudo de agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de raio X*. 2012. 2012.

SASSOLAS, Audrey. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 03, n. 03, p. 210–232, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ajac.2012.33030>>. Acesso em: 18 out. 2013.

SHAH, Muhammad Raza; SOOMRO, Zahid Hussain. Urease Inhibition, Enzyme Inhibition and Bioapplications. *InTech*, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/enzyme-inhibition-and-bioapplications/urease-inhibition>>.

SILVA, Livia *et al.* Development of Potentiometric Urea Biosensor Based on *Canavalia ensiformis* Urease. 2006.

SILVA, Livia; ELETROQUÍMICOS, Desenvolvimento D E Biossensores. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. 2011.

SIRKO, A; BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta biochimica Polonica*, v. 47, p. 1189–1195, 2000.

STENERSEN, J. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. [S.l: s.n.], 2004. p. 274

TSUBOI, S *et al.* Organ-specific occurrence and expression of the isoforms of nonspecific lipid transfer protein in castor bean seedlings, and molecular cloning of a full-length cDNA for a cotyledon-specific isoform. *Journal of biochemistry*, v. 110, p. 823–831, 1991.

UETA, Julieta *et al.* Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação. 1989.

ZADAKA, Dikla *et al.* Atrazine removal from water by polycation-clay composites: effect of dissolved organic matter and comparison to activated carbon. *Water research*, v. 43, n. 3, p. 677–83, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038414>>. Acesso em: 25 out. 2013.