



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LAIANE ARAÚJO DA SILVA SOUTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS À BASE DE
ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS**

São Luis

2016

LAIANE ARAÚJO DA SILVA SOUTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS À BASE DE
ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilvanda Silva Nunes

São Luis

2016

Souto, Laiane Araújo da Silva.

Desenvolvimento de Biossensores Amperométricos à base de acetilcolinesterase para detecção de Microcistinas/ Laiane Araújo da Silva Souto. - 2016.

76 f.

Orientador(a): Gilvanda Silva Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Acetilcolinesterase. 2. Biossensor. 3. Microcistinas-LR I. Nunes, Gilvanda Silva. II. Título.

LAIANE ARAÚJO DA SILVA SOUTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS À BASE DE
ACETILCOLINESTERASE PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª. Gilvanda Silva Nunes
Orientador-DETQI-UFMA

Profº Drº. Cícero Wellington Brito Bezerra
DEQUI-UFMA

Profª Drº. Paulo Cesar Mendes Villis.
UNICEUMA

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai supremo que nos guia e nos protege em todos os momentos de nossas vidas;

À Professora Dr^a Gilvanda Nunes, pela inestimável orientação, motivação, dedicação e por tudo que me ensinou;

Ao Professor Dr. Auro Tanaka, pelo apoio e dedicação fundamentais para existência e permanência desse curso;

Ao professor Dr. Paulo Brasil, pela contribuição e disposição em contribuir para finalização desse trabalho;

Aos meus pais, pela incondicional dedicação e estímulo na conquista de meus objetivos e por abrir as portas para meu futuro;

Ao meu marido Domingos Mendes Junior, por encher a minha vida de alegria, carinho, compreensão, sempre com palavras de encorajamento, força e credibilidade;

Aos meus irmãos, que me acompanham e apoiam em todas as etapas da minha vida;

Aos colegas do NARP, pelo apoio, incentivo e compreensão fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho;

Em especial aos amigos Isabel Dias, Fernanda Gabrielle, Helilma Andrea, Lorena Carreiro, Francisco Eduardo Paiva e Danilo Ribeiro, pela força, paciência e apoio fundamentais para que este trabalho se realizasse, o meu sincero agradecimento;

A meus colegas de turma, por todos os momentos vividos e compartilhados durante todo o curso;

A todos que não mencionei o nome e que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, a minha mais profunda gratidão.

Obrigada!

“A persistência é o caminho para o sucesso.”

Charles Chaplin

RESUMO

Microcistinas (MC-LR) são uma classe de hepatotoxinas produzidas por cianobactérias em águas de superfície. Registros científicos comprovam que a MC-LR inibe a ação de proteínas intracelulares, as fosfatases alcalinas, mas também foi comprovado que sua ação aumenta a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Portanto, esse trabalho objetivou desenvolver biossensores amperométricos à base da enzima AChE para detecção indireta da MC-LR. Para construção do eletrodo de trabalho, foi preparada uma pasta de grafite em pó contendo hidroxietilcelulose (HEC), soroalbumina bovina (BSA) e glutaraldeído (Glu). A pasta foi incorporada às enzimas AChE extraídas do eritrócito bovino (EB) e da enguia elétrica (EE), bem como enzimas geneticamente modificadas extraídas da *Drosophila melanogaster*. Também foi testada a enzima butirilcolinesterase (BChE) obtida de soro humano. Uma porção da pasta sensível foi depositada no eletrodo de trabalho de sensores serigrafados, e realizados testes de caracterização envolvendo voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica. Leituras cronoamperométricas foram realizadas, em seguida, construídas curvas da ativação relativa percentual (AR%) em função da concentração da MC-LR. As seguintes condições operacionais: potencial de trabalho, mediador eletroquímico, pH do meio e concentração do substrato, foram otimizadas. Os ensaios de ativação enzimática revelaram que a enzima AChE (EE) apresentou melhores resultados de ativação relativa percentual (AR%) (>10%), sendo esses valores diretamente proporcionais à concentração da MC-LR. O biossensor desenvolvido mostrou-se preciso Coeficiente de Variação (CV ~ 8,32%), sensível Limite de detecção e Quantificação (LD 0,27 μgL^{-1} e LQ 0,91 μgL^{-1}) e exato (índices de recuperação variando de 73 a 105%). O estudo revelou ser o biossensor adequado à verificação da presença de MC-LR em ambientes aquáticos, tendo sido então utilizado no monitoramento do poluente em sete pontos do Rio Bacanga, um importante ecossistema aquático de São Luis, MA. Os resultados indicaram não haver uma importante contaminação desse poluente nas áreas investigadas.

Palavras chave: Biossensores, Microcistinas-LR, Acetilcolinesterase

ABSTRACT

Microcystin (MC-LR) are a class hepatotoxins produced by cyanobacteria in surface water. scientific records show that the MC-LR, inhibits the action of intracellular proteins, alkaline phosphatases, but has also been proven to increase the enzyme acetylcholinesterase activity (AChE) by the MC-LR action. Therefore, this study aimed to develop biosensors amperometric based AChE enzyme for indirect detection of MC-LR. For construction of the working electrode, a powder graphite paste containing hidroxicetilcelulose (HEC), bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde (Glu) was prepared. The slurry was incorporated into the AChE enzyme extracted bovine erythrocyte (EB) and electric eel (EE) as well as enzymes derived from *Drosophila melanogaster* was tested genetically modificadas. También enzyme butyrylcholinesterase (BChE) obtained from human serum. A portion of the sensitive paste was deposited in the screen-printed sensor working electrode and performed characterization tests involving differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry. cronoamperométricas readings were performed and the percentage built on activation curves (% RA) as a function of the concentration of MC-LR. Some operating conditions, such as working potential, electrochemical mediator, medium pH and substrate concentration, were optimized. enzyme activation assays showed that the EE-AChE enzyme showed best results percent relative activation (% RA) (> 10%), these values being directly proportional to the concentration of MC-LR. The biosensor developed proved accurate (CV ~ 8.32%), sensitive (Ld 0.27 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and LQ 0.91 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and accurate (recovery rates varying from 73 to 105%). The initial study proved to be the right biosensor to verify the presence of MC-LR in aquatic environments, this being then used in monitoring pollutant seven points of Bacanga River, an important aquatic ecosystem of San Luis, MA. The results indicated that there was no significant contamination.

Keywords: Biosensors, Microcystins-LR, acetylcholinesterase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema analítico para verificar a resposta da enzima AchE na presença e na ausência da Microcistina.	32
Tabela 2. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR	35
Tabela 3. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR	35
Tabela 4. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR (envolvendo velocidade inversa 1/V)	36
Tabela 5. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR (envolvendo velocidade inversa 1/V)	37
Tabela 6. Reagentes utilizados no preparo da pasta enzimática a ser aplicada no eletrodo de trabalho do biossensor	37
Tabela 7. Informações sobre os pontos tomados para amostragem em diferentes pontos do Rio Bacanga	42
Tabela 8. Valores da ativação relativa percentual observados com as diferentes enzimas colinesterases testadas	46
Tabela 9. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR	46
Tabela 10. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR	47
Tabela 11. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR com dois novos pontos	48
Tabela 12. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR com dois novos pontos	48
Tabela 13. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR	49
Tabela 14. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR	50
Tabela 15. Otimização da concentração do substrato e da carga enzimática no eletrodo de trabalho do biossensor	54
Tabela 16. Comparação entre as médias das intensidades corrente obtidas nos testes de otimização concentração do substrato <i>versus</i> carga enzimática	55
Tabela 17. Sensibilidade dos ensaios de ativação da AChE (EE) livre e imobilizada, pela MC-LR	59
Tabela 18. Recuperações médias obtidas utilizando o biossensor otimizado	60
Tabela 19. Ativações relativas determinadas nas amostras de água coletadas em diferentes pontos do Rio Bacanga, em São Luis, MA, utilizando o biossensor otimizado	61
Tabela 20. Caracterização das amostras em valores de pH e salinidade	62
Tabela 21. Ativações relativas geradas pela fortificação das amostras ambientais	63

Tabela 22. Recuperações obtidas nas amostras de água A₁, A₂, A₄, A₅ coletadas no Rio Bacanga em São Luis-MA.-----64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da MC-LR-----	20
Figura 2. Imagem do efeito inibidor das microcistinas nas células hepáticas-----	22
Figura 3. Características de um Biossensor-----	23
Figura 4. Representação de um Biossensor-----	23
Figura 5. Materiais e técnicas empregadas na construção de Biossensores-----	24
Figura 6. Representação da formação do complexo enzimático-----	25
Figura 7. Fórmula tridimensional da acetilcolinesterase-----	26
Figura 8. Reação de hidrólise da acetiltiocolina catalisada pela enzima AChE-----	27
Figura 9. Biossensor serigrafado de três eletrodos: Trabalho (grafite contendo a enzima AChE, a macroalga e o mediador TCNQ); Ag/AgCl (referência) e grafite (auxiliar). Na parte circular (eletrodo de trabalho) onde 2mg pasta enzimática foi manualmente depositada-----	30
Figura 10. Solução contendo tampão fosfato pH 7,2 com substrato ATChCl e enzima AChE (EE) livre-----	31
Figura 11. Reação da acetiltiocolina até a formação do composto 5-tionitrobenzoato (Método de Elman)-----	33
Figura 12. Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoato-----	33
Figura 13. Aplicação da pasta sensível de AChE (EE) no eletrodo de trabalho do sensor----	38
Figura 14. Curva de ativação da enzima AChE (EE) livre em solução pela MC-LR-----	45
Figura 15. Representação da formação do complexo enzimático-----	46
Figura 16. Sobreposição das curvas de velocidade (com e sem MC-LR)-----	47
Figura 17. Sobreposição das curvas de Velocidade (com e sem MC-LR) incluído mais 2 pontos-----	49
Figura 18. Sobreposição das curvas da cinética enzimática na presença e ausência de MC-LR relação 1/V e 1/[S]-----	50
Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial gerado nos testes de otimização do sistema empregando biossensores, modificados com CoPC e TCNQ. Sensores modificado com CoPC e TCNQ respectivamente, em solução tampão fosfato, contendo o substrato ATChCl-----	52
Figura 20. Variação da corrente em função do pH-----	53
Figura 21. Estabilidade da corrente, obtida cronoamperometricamente em diferentes tempos-----	55

Figura 22. Curvas de estabilidade da corrente, obtidas cronoamperometricamente em nos tempos de 30 e 55s-----	56
Figura 23. Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor à base de AChE (EE), na ausência e na presença da MC-LR-----	57
Figura 24. Sobreposição das curvas de ativação relativa (AR) para a enzima AChE(EE), proporcional a concentração da MC-LR-----	58
Figura 25. Detecção direta da tiocolina, utilizando mediador eletroquímico-----	58
Figura 26- Recuperações Obtidas em Água deionizada -----	65
Figura 27- Recuperações Obtidas nas Amostras A ₁ ,A ₂ ,A ₄ ,A ₅ -----	65
Figura 28- Sobreposição das Recuperações Obtidas com água deionizada e nas Amostras A ₁ ,A ₂ ,A ₄ ,A ₅ -----	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs - Absorbância
ACh – Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
ATChCl - Cloreto de Acetilcolina
AR - Ativação Relativa
BChE – Butirilcolinesterase
BSA - Soroalbumina Bovina
BTChI - Iodeto de Butirilcolina
CoPC - Fitalocianina de cobalto
CV - Coeficiente de Variação
DTNB - 5,5-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
EB-Eritrócito Bovino
EE - Enguia Elétrica
EH - Eritrócito Humano
GLU-Glutaraldeído
GM - Geneticamente Modificada
HEC - Hidroxietilcelulose
HPLC-Cromatografia líquida de alta eficiência
IC-Intervalo de confiança
IR - Inibição Relativa Percentual
LC-MS -Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
LC – Limite de Confiança
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação
MC-LR-Microcistina LR
PBS - Solução Tampão Fosfato
pH - Potencial Hidrogeniônico
PP1A- Fosfatase 1
PP2A- Fosfatase 2
TCNQ – Tetracinaquinodimetano
VC-Voltametria Cíclica
VPD-Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 CIANOTOXINAS	18
3.2 MICROCISTINA-LR	19
3.2.1 <i>Contaminação por MC-LR</i>	211
3.3 BIOSENSORES	222
3.3.1 <i>Biossensores enzimáticos</i>	222
3.4 ENZIMAS	255
3.4.1 <i>Acetilcolinesterase</i>	26
3.4.2 <i>Atividade enzimática</i>	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	299
4.1 SOLUÇÕES E REAGENTES	299
4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	30
4.3 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DA ENZIMA LIVRE PELA MC-LR	31
4.4 INTERAÇÃO DA ENZIMA AChE(EE) COM O SUBSTRATO E COM A MC-LR	32
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	32
4.6 ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA AChE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MC-LR ... 34	
4.6.1 <i>ESTUDO CINÉTICO DA AChE ENVOLVENDO VELOCIDADE INVERSA (1/V PROPORCIONAL A 1/S)</i>	366
4.7 PREPARO E OTIMIZAÇÃO DOS BIOSSENSORES	377
4.7.1 <i>PREPARO DOS BIOSSENSORES</i>	37
4.7.2 <i>OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS OPERACIONAIS</i>	39
4.7.3 <i>OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO</i>	369
4.8 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO E SENSIBILIDADE DOS BIOSSENSORES	40
4.9 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO EM ÁGUA DEIONIZADA	41
4.10 MONITORAMENTO DA MC-LR EM AMBIENTE AQUÁTICO MEDIANTE USO DE BIOSSENSORES	41
4.11 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA: ESTUDO DO EFEITO MATRIZ	43
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 <i>ATIVAÇÃO INICIAL DA ENZIMA LIVRE EM SOLUÇÃO</i>	44
5.2 RESULTADOS DOS TESTES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	44
5.3 INTERAÇÃO DA ENZIMA AChE(EE) COM O SUBSTRATO E COM A MC-LR	45
5.4 ESTUDO CINÉTICO DA ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	45
5.4.1 <i>DADOS DA CINÉTICA DA AChE POR INTERAÇÃO COM A MC-LR À PARTIR DA VELOCIDADE INVERSA</i> 49	
5.4.2 <i>CÁLCULO DA CONSTANTE CINÉTICA DA VELOCIDADE</i>	51
5.5 OTIMIZAÇÃO DO BIOSSENSOR	51
5.5.1 <i>ESCOLHA DO MEDIADOR ELETROQUÍMICO E POTENCIAL DE TRABALHO</i>	51
5.5.2 <i>VARIAÇÃO DA CORRENTE EM FUNÇÃO DO PH</i>	52
5.5.3 <i>OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E DA CARGA ENZIMÁTICA NO ELETRODO DE TRABALHO DO BIOSSENSOR</i>	53
5.5.4 <i>ESTABILIDADE DA CORRENTE, OBTIDA CRONOAMPEROMETRICAMENTE EM DIFERENTES TEMPO</i>	55
5.6 TESTES DE PRECISÃO	56
5.7 ATIVAÇÃO DA ENZIMA AChE(EE) IMOBILIZADA E SENSIBILIDADE DO BIOSSENSOR	57

5.8 EXATIDÃO DO MÉTODO	60
5.9 MONITORAMENTO DA MC-LR EM ÁGUAS NATURAIS UTILIZANDO O BIOSSENSOR OTIMIZADO	60
5.10 RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	63
5.11 FORTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	64
<i>5.11.1. Recuperação das amostras ambientais</i>	<i>64</i>
6.0 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são bactérias Gram-negativas procariontes fotossintéticas que são encontradas em uma variedade de habitats, colonizando biótopos aquáticos e terrestres (MANKIEWICZ *et. al.*, 2003; BRIAND, J. *et. al.*, 2003). Seu domínio sobre as demais espécies do ecossistema é uma indicação de que elas possuem algumas capacidades fisiológicas específicas que lhes permitem competir de forma muito eficiente (JAYARAJ, R.; ANAND, T.; RAO, 2006).

Ambientes eutróficos, ou seja, rico em nutrientes, favorecem a proliferação e predominância de espécies de cianobactérias que, por sua vez, podem produzir diversas toxinas e liberá-las no meio aquático, principalmente durante os fenômenos de florações (crescimento exuberante) (MARTINS, 2010). Geralmente, estas florações têm grande impacto negativo nos corpos d'água, alterando as características de qualidade, tais como odor, sabor e presença de toxinas específicas (BRASIL, 2011). Entre as toxinas produzidas por cianobactérias destacamos a microcistina-LR (MC-LR), alguns pesquisadores da área (DELGADO *et. al.*, 2012; ALVERCA *et. al.*, 2009) têm mostrado que esta atua inibindo enzimas intracelulares denominadas fosfatases, removendo os grupamentos fosfato das proteínas. O que promove uma alteração na estrutura do esqueleto celular, causando disfunção, ou seja, modifica a arquitetura e, conseqüentemente, a função das células do fígado (FONSECA, 2014). Alguns autores chegam a admitir que a ação de doses sub-letais das hepatotoxinas provenientes de cianobactéria estaria associada ao desenvolvimento de câncer hepático. Esta suposição tem sido investigada na China onde existe cianobactéria nos mananciais de água fornecida a uma população que apresenta elevada frequência dessa neoplasia. (LOPES, 2011; AZEVEDO, 2014,)

Devido aos efeitos ambientais provocados pela MC-LR é necessário o controle destes poluentes naturais, vários métodos de detecção têm sido utilizados atualmente na detecção/quantificação de microcistinas, tais como bioensaio, ELISA, HPLC e LC-MS. No entanto, a maioria destas técnicas demanda de um grande processo de pré-tratamento e da utilização de aparelhos sofisticados, o que gera aumento nos custos e no tempo de análise (KESTWAL; BAGAL, KESTWAL e CHIANG, 2015; SHAMAGSUMOVA *et. al.*, 2015). Assim, torna-se de suma importância o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e eficientes para detecção desses compostos.

Nesta perspectiva, os biossensores têm emergido como ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas existentes (SILVA, 2011). Os biossensores podem ser confeccionados para uso contínuo, em linhas no processo, ou mesmo ser descartáveis. De fato, nas últimas décadas, estão sendo efetuados esforços pela comunidade científica objetivando o desenvolvimento de metodologias mais seguras, que melhorem a seletividade e a sensibilidade dos biossensores enzimáticos baseados no monitoramento do processo de inibição por analitos potencialmente tóxicos (WEI e WANG, 2015; MARQUES & YAMANAKA, 2008).

As proteínas utilizadas até o momento para construção de biossensores amperométricos para detecção de microcistinas são as fosfatases (PP1A e PP2A) (ALVERCA *et. al*, 2009). Estas, entretanto, são extremamente caras, o que torna o custo para construção desse biossensor relativamente elevado. Estudos recentes demonstraram, contudo, que as MC-LR podem aumentar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) (W.U *et. al*, 2016; KIST e BOGO, 2015; FRITSCH.R.S, KIST, BOGO, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver biossensores amperométricos, utilizando a enzima AChE como elemento de biorreconhecimento explorando o princípio da ativação enzimática para detectar microcistinas em amostras de água.

2.2 Específicos

- a) Selecionar as enzimas que serão utilizadas no processo como acetilcolinesterases (AChE) de eritrócito bovino (EB) e enguia elétrica (EE) , acetilcolinesterases geneticamente modificadas(GM), butirilcolinesterase (BChE);
- b) Imobilizar as enzimas utilizando o método apropriado e previamente testado, baseado na ligação cruzada com glutaraldeído;
- c) Preparar e aperfeiçoar, mediante testes empregando voltametria de pulso diferencial e cíclica, as condições operacionais (seleção do mediador eletroquímico, carga enzimática, tipo e concentração do substrato, pH do meio, dos biossensores serigrafados;
- d) Aplicar os sistemas biossensores na detecção de microcistinas em amostras de água deionizada dopada com microcistinas e em amostras coletadas no Rio Bacanga.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cianotoxinas

As cianotoxinas são conhecidas como toxinas produzidas por cianobactérias. Essas toxinas constituem um amplo grupo de produtos naturais tóxicos (LOPES, 2011). Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas permanecem contidas nas células de cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a fase de senescência (morte natural), ou ainda por estresse celular ou uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloração (MAGALHÃES, SOARES e AZEVEDO, 2001).

De acordo com Leal e Castro (2004), as estruturas das microcistinas foram determinadas como monocíclicas fazendo parte da composição dessas toxinas dois L-aminoácidos variáveis que incluem, por exemplo, leucina e alanina (LA), leucina e arginina (LR), tirosina e arginina (YR), tirosina and alanina (YA), tirosina e metionina (YM), e dois aminoácidos não usuais, N-metildehidroalanina (Mdha) e ácido 3-amino-metoxi-10-fenil-2,6,8- trimetildeca-4,6-dienóico (Adda).

Dessa forma a toxicidade das Microcistinas é classificada em 3 grupos, dependendo da substituição de dois L-aminoácidos variáveis: forte: -LR, -LA, e -YR; média: -WR; ou fraca: -RR e -M(O)R. Resultados de pesquisas indicam que os resíduos de Adda e Glu da molécula de microcistina-LR possuem importante papel na hepatotoxicidade da microcistina.(Kaya, 1996, Watanabe,1996)

Algumas doenças humanas são atribuídas às toxinas de cianobactérias, tais como: gastroenterite e doenças associadas, reações alérgicas e irritação, e doenças hepáticas (LOPES, 2011). Relatos de intoxicação animal e de doenças em seres humanos ligadas a toxinas de cianobactérias ocorrem no mundo todo. Em 1985, na Austrália, 25 pessoas foram contaminadas após consumirem água contaminada com cilindrospermopsina, uma toxina produzida pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciboskii*. Em 1996, a morte de 50 pacientes em um hospital no estado de Pernambuco foi atribuída à intoxicação por essas toxinas provenientes de cianobactérias contidas na água utilizada para a hemodiálise (NUNES, 2005).

Cianobactérias produtoras de toxinas são conhecidas por cianobactérias tóxicas, como algumas linhagens de *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis*. Os efeitos tóxicos de cianobactérias descritos são diversos: dermatotóxicos, hepatotóxicos e neurotóxicos (FONSECA, 2014). Esses organismos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários com função desconhecida, dentre esses metabólitos estão as cianotoxinas, um grupo diverso de toxinas naturais, tanto do ponto de vista químico como toxicológico. Pela estrutura química as cianotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (CORDEIRO DE ARAÚJO, 2014).

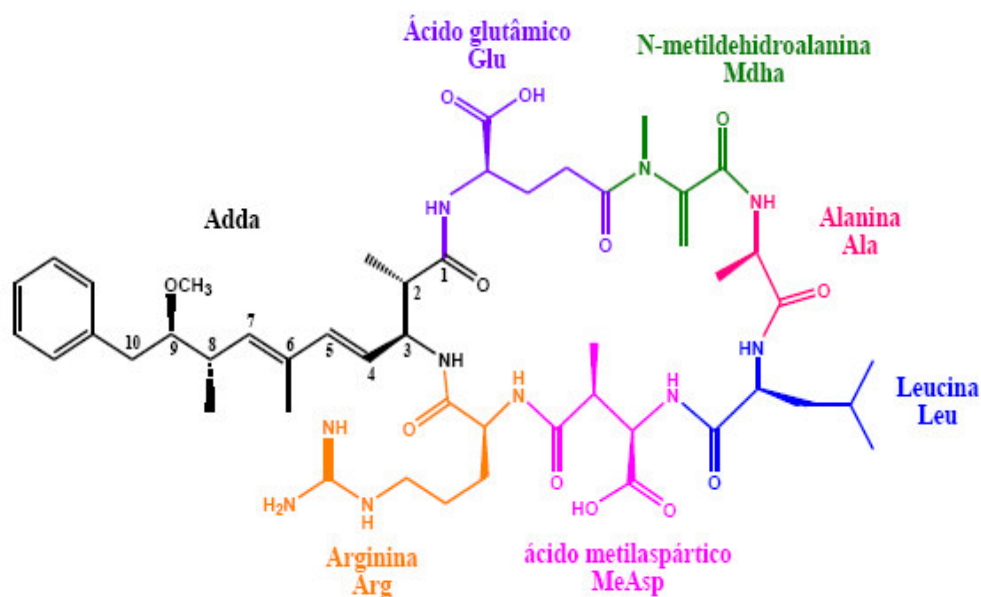
Como representantes dos peptídeos cíclicos estão as microcistinas, que são consideradas poluentes naturais em ambientes aquáticos, podendo também caracterizar a poluição de origem antropogênica (NUNES, 2005). Com base em seus efeitos toxicológicos, as microcistinas são classificadas como hepatotoxinas, uma vez que causam sérios danos em tecidos hepáticos, tais como alterações citoesqueléticas das células e consequente morte por hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (CORDEIRO DE ARAÚJO, 2014).

Entre todas as cianotoxinas, as microcistinas (MCs) são as mais frequentemente estudadas devido à sua ampla distribuição e alta toxicidade. Mais de 80 análogos estruturais de MCs foram identificados, sendo a microcistina-LR (MC-LR) que possui os aminoácidos leucina e arginina, a mais frequente e a mais tóxica, apresentando uma LD50 de 50µg/Kg de peso corporal, em ratinhos expostos intraperitonalmente. (WU *et. al*, 2016; KAASALAINEN ET AL, 2012)

3.2 Microcistina-LR

A microcistina-LR (MC-LR) é uma molécula classificada como hepatotoxina, composta por sete aminoácidos, com peso molecular entre 0,9 a 1,0 kDaltons (LOPES, 2011) (Figura 1). De acordo com WU *et. al*, 2016; existem 3 áreas sujeitas a oxidação em microcistinas: a ligação dupla na metade MDHA; a ligação dupla conjugada na metade de ADDA (aminoácido único das microcistinas); e ainda a cadeia lateral que varia consoante os aminoácidos. Segundo esses autores, dentre esses aminoácidos variantes, apenas as cadeias da arginina e a tirosina são potencialmente vulneráveis à oxidação.

Figura 1. Fórmula estrutural da MC-LR.



Fonte: LOPES, 2011.

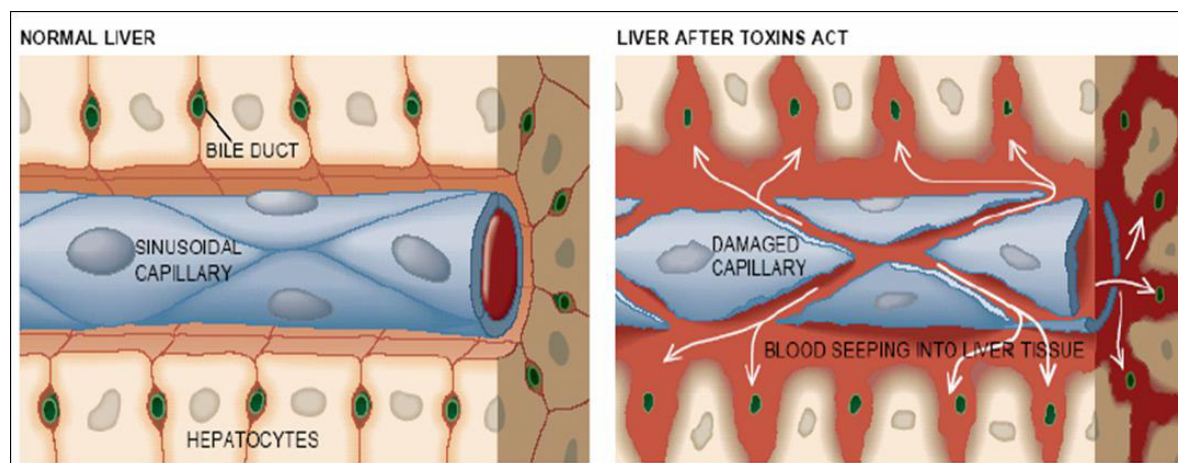
Esta hepatotoxina é a toxina peptídica mais investigada, pelo fato de estar frequentemente presente em florações de cianobactérias e ser a mais tóxica das microcistinas (LOPES, 2011; CÂMPAS *et. al.*, 2005; HARADA e TSUJI, 1998). Essas florações ocorrem em rios, lagos, lagoas e reservatórios no mundo inteiro e estão associadas à estagnação de água, temperatura e eutrofização das águas (DAWSON, 1998; HARADA 1990; SHORT e EDWARDS, 1990; WATANABE *et. al.*, 1996).

A MC-LR é liberada quando as cianobactérias morrem ou são destruídas. As pessoas são expostas a essas toxinas com mais frequência através da ingestão de água potável ou durante atividades de lazer, quando a água é ingerida (LOPES, 2011; GROSSE *et. al.*, 2006).

3.2.1 Contaminação por MC-LR

A toxicidade da MC-LR tem como órgão alvo o fígado, devido à inibição de proteínas fosfatases causando desmontagem de proteínas do citoesqueleto, esses danos levam a bolhas e arredondamento dos hepatócitos (Figura 2). Os danos estruturais nos hepatócitos e a consequente perda de adesão célula-célula provocam danos à estrutura hepática e colapso das sinusóides hepáticas. O fígado torna-se cheio de sangue. Na intoxicação aguda por microcistina, a morte é devido ao choque hemorrágico (BISCHOFF, 2001).

Figura 2- Imagem do efeito inibidor das microcistinas nas células hepáticas.



Fonte: Google imagens

De acordo com ALVERCA *et. al* (2009), a MC-LR pode promover o surgimento de tumores hepáticos devido à inibição das PP1A e PP2A. A formação de tumores está provavelmente associada às mudanças morfológicas nos hepatócitos, devido à hiperfosforilação de citoqueratinas e de outras proteínas estruturais (LOPES, 2011; BISCHOFF, 2001).

Além do fígado, já foi relatado que a MC-LR pode acumular-se e causar dano nos rins, coração e embriões de *Carassius auratus* e *Zebra fish* (ZENG *et. al*, 2014; LI *et. al*, 2011; QIU *et. al*, 2009; ZHANG *et. al*, 2008). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que MC-LR pode acumular-se no cérebro de peixes e mamíferos (ZHAO *et. al*, 2015; LI *et. al*, 2012), indicando a neurotoxicidade desencadeada por MC-LR. Um dos primeiros relatos que associaram a intoxicação por MC-LR à neurotoxicidade, foi a morte de 50 pacientes de uma unidade de hemodiálise em Caruaru, em 1996, através da água de hemodiálise, e a intoxicação de 76 outros pacientes com sintomas agudos de neurotoxicidade (por exemplo,

surdez, zumbido, cegueira reversível) (SOARES *et. al*, 2006; MIKALSEN *et. al*, 2003). Assim, a toxicidade de MC-LR sobre múltiplos órgãos desperta interesse público amplo. Outros estudos demonstraram que o tratamento com baixa dose de MC-LR resulta em alterações degenerativas neuronais causando déficits de memória em ratos (LI *et. al*, 2012, DELGADO *et. al*, 2012). Anormalidades tem sido observada em *Silurus meridionalis* e *Jenynsia multidentata* expostos a MC-LR dissolvidos água (CAZENAVE *et. al*, 2008; ZHANG *et. al*, 2008), sugerindo que a MC-LR exercem fortes efeitos neurotóxicos em peixes.

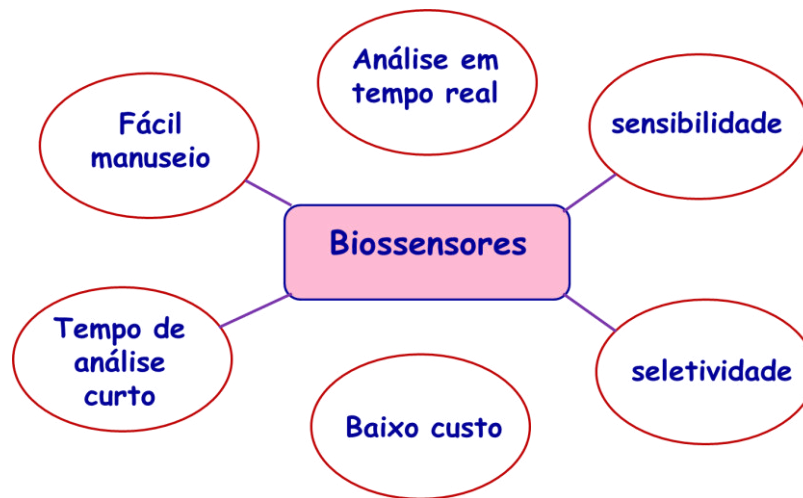
3.3 Biossensores

3.3.1 Biossensores enzimáticos

Apesar de várias técnicas de análise para detecção de microcistinas, tais como bioensaio, ELISA, HPLC e LC-MS já serem utilizadas, o desenvolvimento de biossensores abriu novas perspectivas, pois oferece a possibilidade de detecção rápida e precisa, além de alta reprodutibilidade e sensibilidade (LEBOGANG, 2014; SINGH *et. al*, 2012). Destaca-se ainda, a possibilidade desses aparatos virem a ser portáteis, além da sua miniaturização e rapidez de resposta (LEITE *et. al*, 2013). Os biossensores podem ser confeccionados para uso contínuo, em linhas no processo, ou como descartáveis. Portanto, representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas existentes (SILVA, 2011; WEI e WANG, 2015).

Sensibilidade, seletividade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso, custo baixo e robustez (Figura 3) são as características mais importantes perseguidas no desenvolvimento de sensores. Baixo custo e facilidade de uso são determinantes no desenvolvimento de versões comercializáveis para o público em geral.

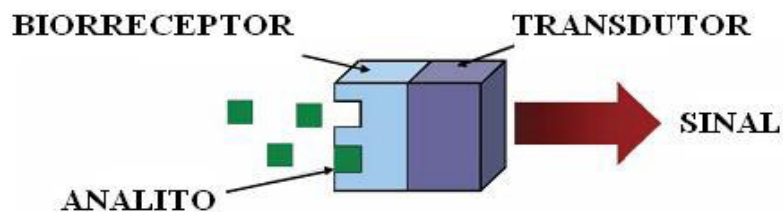
Figura 3. Características de um Biossensor.



Fonte : Nunes, 2005.

Biossensor é um dispositivo no qual o material de origem biológica, tais como enzima, organela, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor adequado (Figura 4) (RICCARDI, COSTA, YAMANAKA 2002). O biossensor apresenta como característica fundamental a capacidade de combinar a atividade seletiva entre diferentes substratos de um elemento de bioreconhecimento, sensível a um analito de interesse, sendo esse o motivo de as enzimas serem o elemento biológico mais utilizado na construção de biossensores (PEREIRA, 2013; ALFAYA & KUBOTA, 2008; DU *et. al*, 2008).

Figura 4- Representação de um Biossensor



Fonte: Google imagens

Dessa forma, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (SILVA, 2014), merecendo destaque os biossensores enzimáticos. Nesse tipo de biossensor, a reação enzimática é monitorada diretamente através de vários tipos de transdutores (eletroquímico, óptico, fototérmico, amperométrico) (Figura 5) (SILVA, 2011; PATEL, 2002).

Figura 5. Materiais e técnicas empregadas na construção de Biossensores.

MATERIAL BIOLÓGICO	GRANDEZA DETECTADA	TRANSDUTOR
ANTICORPO	ELÉTRONS	
ANTÍGENOS	ÍONS	POTENCIOMÉTRICO
CÉLULAS		AMPEROMÉTRICO
ENZIMAS		CONDUTIMÉTRICO
MEMBRANAS		ENFET
ORGANELAS	CALOR	CALORIMÉTRICO
ORGANISMOS	MASSA	
TECIDOS	ABSORBÂNCIA	PIEZELÉTRICO
	LUZ	ÓPTICO

Fonte: LIMA e NUNES,2007.

O transdutor amperométrico emprega a medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensível, proporcional à concentração do analito. No biossensor catalítico, a enzima adequada imobilizada na superfície do eletrodo, catalisa a reação dos substratos e o monitoramento da corrente elétrica poderá ser efetuado devido à formação dos produtos ou consumo de reagente. (RICCARDI, COSTA, YAMANAKA, 2002).

3.4 Enzimas

Enzimas são proteínas conhecidas por seu extraordinário poder catalítico e possuem um elevado grau de especificidade em relação aos seus substratos (MANKIEWICZ *et. al*, 2003), aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições adequadas de temperatura e pH. As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações bioquímicas através da interação física entre reagentes e produtos (BRIAND, J *et. al*, 2003).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com as reações que catalisam (MELO,2008). A principal característica que diferencia uma reação catalisada por uma enzima é que ela ocorre no sítio ativo das enzimas, sendo a molécula que se liga ao sítio ativo, denominada substrato. O complexo enzima-substrato (Figura 6) é fundamental para a ação das enzimas, é o ponto inicial no tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e para descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos associados (MARTINS, 2010; JAYARAJ; ANAND; RAO, 2006).

Figura 6. Representação da formação do complexo enzimático.



Fonte: AUTORA.

As enzimas têm sido muito utilizadas em diversas aplicações: bioquímica, farmacêutica, bioanalíticas, biomédicas e industriais (SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015). Nas últimas décadas, têm sido exploradas também na construção de biossensores altamente seletivos para determinados tipos de analitos, incluindo os poluentes ambientais.

Várias enzimas têm sido imobilizadas em diferentes transdutores para aplicação em biossensores (BERNARDI, 2011). Entre as enzimas utilizadas para a construção de biossensores dedicado à análise de contaminantes ambientais, a enzima acetilcolinesterase (AChE) é a mais comumente utilizada (NUNES *et. al*, 2014).

3.4.1 Acetilcolinesterase

As acetilcolinesterases (AChEs) (Figura 7) são enzimas da classe das hidrolases, sendo que a hidrólise do seu substrato natural, o neurotransmissor acetilcolina, se processa formando o complexo enzima-substrato, produzindo posteriormente a molécula de colina e a enzima acetilada, que se hidrolisa rapidamente a ácido acético, liberando então a enzima livre. Este é o processo fundamental para transmissão do impulso nervoso nos organismos humanos e nos animais (BRASIL, 2011).

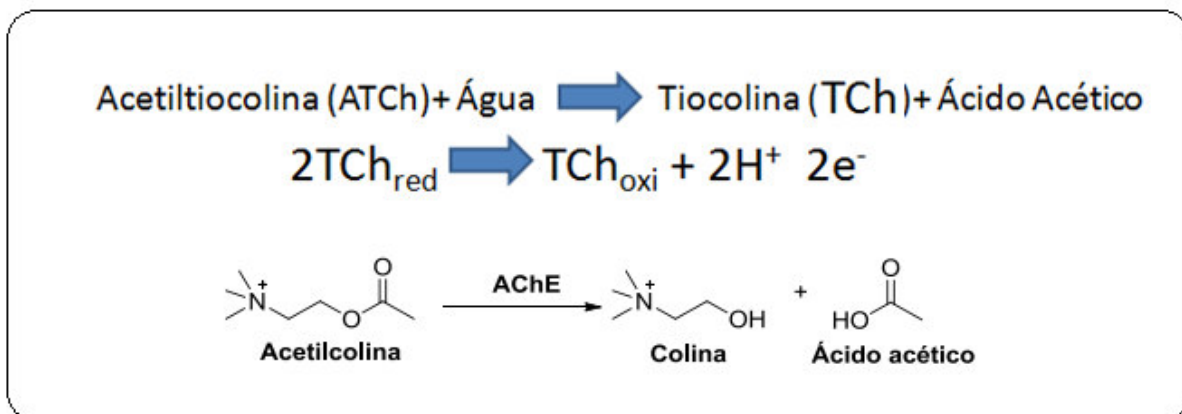
Figura 7. Fórmula tridimensional da acetilcolinesterase.



Fonte: GOOGLE IMAGENS.

Biossensores eletroquímicos baseados na inibição da AChE têm mostrado resultados satisfatórios para análise de contaminantes ambientais (WANG *et. al*, 2015; LIU & LIN, 2006; MULCHANDANI, MULCHANDANI & KANEVA, 1998). Quando AChE é imobilizada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, as suas interações com o substrato acetiltiocolina (ATCh), produzem o produto eletroativo tiocolina, e a inibição do sistema enzimático pode ser monitorada pela medição da corrente resultante da oxidação da tiocolina (WANG *et. al*, 2015; GONG, WANG & ZHANG, 2009). As reações que ocorrem na superfície do biossensor com a enzima acetilcolinesterase são resumidas na Figura 8.

Figura 8. Reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima AChE.



Fonte: Autora.

3.4.2 Atividade enzimática

Atividade enzimática é a habilidade com que a enzima se liga ao substrato. Essa habilidade pode ser afetada por fatores como a presença de inibidores, ou ativadores, pH e temperatura. Esses fatores podem aumentar, diminuir ou até mesmo suprimir a velocidade da reação catalítica (FONSECA, 2014; AZEVEDO, 2014; ALVERCA, *et. al*, 2009).

A unidade de atividade enzimática, U, é estabelecida através da medida da velocidade de reação a partir de uma quantidade de substrato consumido (ou produto formado), em uma unidade de tempo. Geralmente é definido como quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de substrato por minuto em pH e temperatura adequada para cada tipo de enzima (LONG *et. al*, 2009).

Um grande número de outras definições de unidade de atividade tem sido usados. Uma nova unidade internacional para atividade enzimática é recomendada pela *Enzyme Commission* denominada Kat que é definida como a quantidade de enzima que transforma 1 mol por segundo de substrato, a 25°C. A nova unidade está de acordo com as dimensões das constantes de velocidade em cinética química, sendo expressa também em termos de seus submúltiplos, mili (m), micro (μ) e nano (n) katals. Assim, 1 kat é igual a 6×10^7 unidades de atividade ou a 6×10^7 μ mol/min de substrato. O kat não é usado frequentemente, embora seja uma unidade recomendada pelo Sistema Internacional de Unidade (SINGH, S., *et. al*, 2012).

Estudos publicados por vários pesquisadores (WU, 2016; KIST e BOGO, 2015; FRITSCH, KIST, BOGO, 2011) demonstraram que as Microcistinas-LR (MC-LR) podem aumentar a atividade das enzimas AChE. Portanto, no presente trabalho, a enzima AChE foi

utilizada no desenvolvimento de biossensores para detecção da presença de MC-LR em amostras de água.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório do Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.1 Soluções e Reagentes

A Microcistina-LR (MC-LR) (pureza $\geq 95\%$), assim como as enzimas acetilcolinesterase extraída de enguia elétrica (ACHE)(EE), acetilcolinesterase do eritrócito bovino (EB); acetilcolinesterase geneticamente modificada (*Drosophila melanogaster* (ACHE) (GM)), e butirilcolinesterase (BChE) extraída eritrocito humano e os reagentes: iodeto de butirilcolina (BTChI), cloreto de acetiltiocolina (ATChCl) e 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO).

Para a etapa de imobilização enzimática, os seguintes reagentes foram empregados: glutaraldeído (Fluka Chemie, Basel, Suíça), hidroxietilcelulose (HEC) (Fluka Chemie), soroalbumina bovina (BSA) (Biochemical BDH Lim, Poole, Inglaterra), os mediadores TCNQ (tetracianoquinodimetano – Aldrich Co, Steinheim, Alemanha) e ftalocianina de cobalto (CoPC) (Sigma); e grafite ultrapuro (Sigma-Aldrich, Brasil).

A solução tampão fosfato (PBS, pH 7,2) foi preparada pela combinação de KH_2PO_4 $0,1 \text{ molL}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ molL}^{-1}$, ambos da Merck. Em PBS pH = 7,2, foram preparadas as soluções de 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ e dos substratos cloreto de acetiltiocolina (ATChCl) e iodeto de butiriltiocolina (BTChI), ambos 10 mmolL^{-1} , tendo sido estas posteriormente armazenadas em geladeira.

A solução estoque de MC-LR $2,5 \text{ mgmL}^{-1}$ (ou $2,5 \cdot 10^6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$) foi preparada por acréscimo de 2 mL de água deionizada no próprio frasco (contendo 5mg de MC-LR). As soluções de trabalho ($5 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$) foram preparadas por diluição de água destilada a 0,04 mL (40 μL) da solução estoque, gerando volume final de 20 mL .

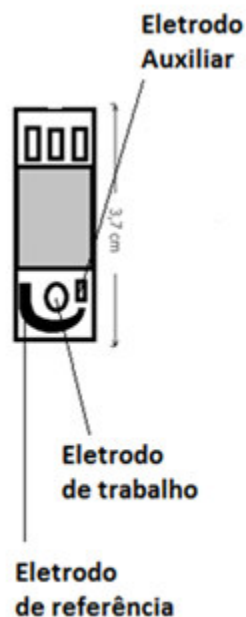
As soluções de AChE, para imobilização no eletrodo de trabalho foram diluídas diretamente no frasco, com PBS (pH 7,2), a partir de soluções-estoque, preparadas pela dissolução do pó da enzima em solução de NaCl 0,9 % (m/v). As soluções de trabalho foram preparadas mediante diluição de solução-estoque em PBS (pH 7,2).

4.2 Equipamentos e Acessórios

As medidas eletroquímicas usando os biossensores foram feitas em um potenciostato/galvanostato (Micro-AUTOLAB Tipo III, Methrom, Países Baixos) e para as medidas espectrofotométricas, realizadas para determinação da atividade enzimática, foi empregado um espectrofotômetro UV/Vís (Biospectro SSP-220, Madison, EUA), antes da imobilização da enzima.

Foram utilizados sensores contendo tres eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl), um eletrodo auxiliar (de grafite) e um eletrodo de trabalho contendo tetracianoquinodimetano (TCNQ) como mediador (Figura 9) e, contatos elétricos feitos com o potenciostato através de um conector apropriado.

Figura 9. Biossensor serigrafado de três eletrodos: Trabalho (grafite contendo a enzima AChE, a macroalga e o mediador TCNQ); Ag/AgCl (referência) e grafite (auxiliar)



Fonte: SILVA, 2014.

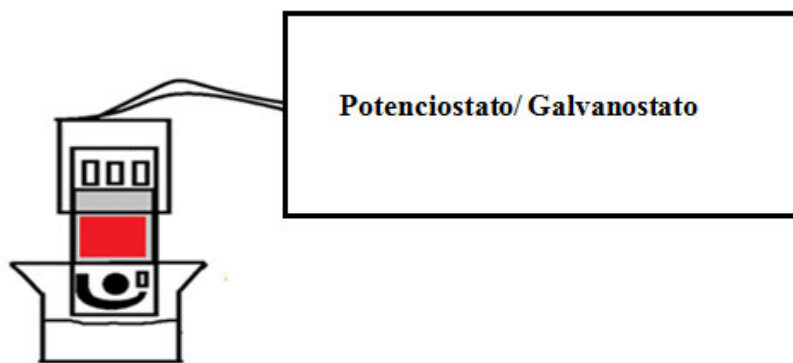
Para Caracterização físico-química das amostras ambientais, foi empregado o analisador multiparâmetro (U22-Series, Horiba), previamente calibrado.

4.3 Ensaio de Ativação da Enzima Livre pela MC-LR

A ativação relativa da AChE, devido a presença da MC-LR, foi testada inicialmente com a enzima livre em solução contendo tampão fosfato em quantidades descritas na Tabela 1. Os sensores foram inicialmente mergulhados em solução contendo tampão fosfato, as enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) e seus substratos cloreto de acetiltiocolina (ATChCl) e Iodeto de butiriltiocolina (BTChI) respectivamente, medindo-se o sinal da corrente I_0 por cronoamperometria, a 100mv. Em seguida, os sensores foram lavados com tampão fosfato e incubados em solução contendo tampão fosfato, enzima e substrato, nas mesmas concentrações iniciais, e também MC-LR, sendo então registrada uma nova corrente I_1 , no caso maior que a inicial (Figura 10).

Depois de verificada a melhor enzima, em função da sua maior ativação, esta foi empregada na avaliação da interação com a MC-LR, na construção dos biossensores e em todas as etapas seguintes.

Figura 10. Solução contendo o sensor serigrafado mergulhado a uma solução cotendo tampão fosfat (pH 7,2) com substrato ATChCl e enzima AChE (EE) livre.



Fonte:Autora

Tabela 1. Esquema analítico para verificar a resposta da enzima AchEna presença e na ausência da Microcistina.

Enzima	PBS (μL) pH-7,2	Substrato (μL)	MC-LR (μL)	T min	Enzima (μL)
----	4000	800	----	10	200
BchE	4000	800	----	10	200
BchE	3950	800	50	10	200
AchE	4000	800	---	10	200
AchE	3950	800	50	10	200
AChE -22	4000	800	----	10	200
AChE-22	3950	800	50	10	200
AChE-80	4000	800	----	10	200
AChE-80	3950	800	50	10	200
AChE-41	4000	800	---	10	200
AChE-41	3950	800	50	10	200
AChE13-42	4000	800	----	10	200
AChE13-42	3950	800	50	10	200
AChE-45	4000	800	---	10	200
AChE-45	3950	800	50	10	200

BChE =Butiril Colinesterase, AChE= Acetil Colinesterase, AChE com numerações de 22, 80, 41, 13-42 e 45 = Geneticamente Modificadas, PBS = Solução tampão fosfato, T=tempo em Minutos.

4.4 Estudo da Interação da Enzima AChE(EE) com o Substrato e com a MC-LR

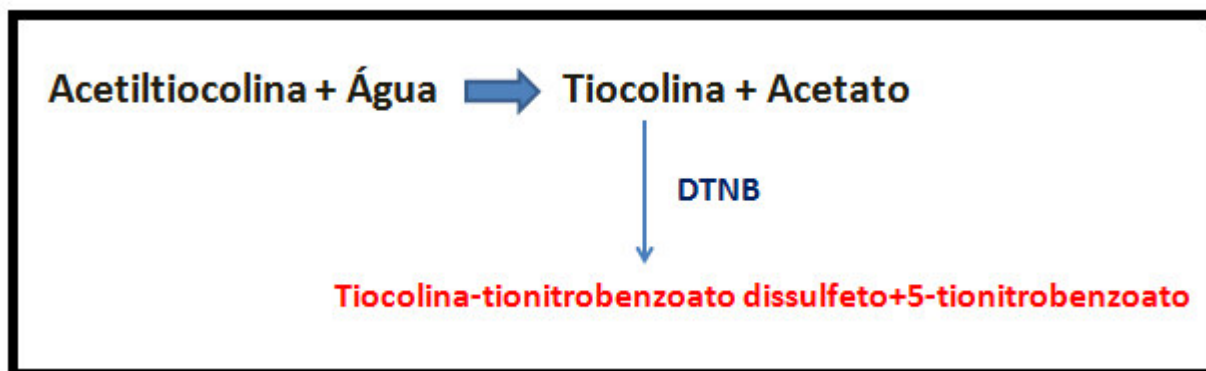
Foram realizadas análises cronoamperométricas observando a interação da enzima AChE (EE) livre com o substrato, na presença da MC-LR, sendo esta diluída em diversas concentrações. Ao final, uma curva analítica foi traçada a partir das médias das correntes obtidas em relação as diversas concentrações da MC-LR.

4.5 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da enzima foi medida espectrometricamente antes de cada imobilização. Empregou-se a metodologia cinética de ELMAN (1961) modificada por NUNES *et. al* (2014), sendo assim resumida: 50 μL da enzima a ser analisada, e misturado a 200 μL de 5,5 - ditiobis (2-acido nitrobenzoico) (DTNB) $2,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, 350 μL de solução tampão fosfato (PBS) pH=7,2 e, por último, 200 μL de solução do substrato adequado, isto é, cloreto de acetiltiocolina (ATChCl) $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ quando se emprega a enzima, AChE e iodeto de butiriltiocolina, para enzima BChE, em uma célula espectrofotométrica. A hidrólise do substrato (ATChCl), catalisada pela enzima, produziu a tiocolina (TCh) que reagiu posteriormente com o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) [DTNB] (Figuras 11 e 12), ocasionou a formação de complexo amarelo que absorve em 412 nm. Monitorou-se a reação

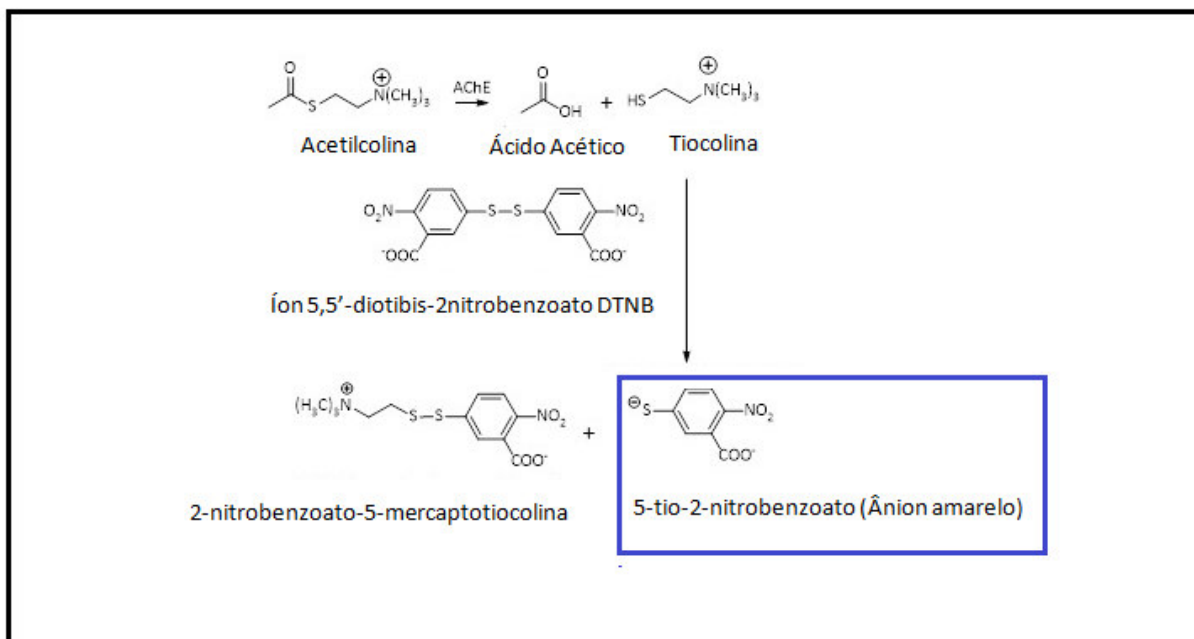
pela medida da absorbância em função do tempo, seguindo a lei de Beer, para crescentes concentrações do produto formado. Medidas espectrofotométricas do branco foram feitas sem a presença da enzima.

Figura 11. Reação da acetiltiocolina até a formação do composto 5-tionitrobenzoato (Método de Elman).



Fonte: Autora

Figura 12- Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato.



Fonte: Autora adaptado de : Cavancante *et. al.*, (2016)

A absorvância foi calculada segundo a reação: $\mathbf{Abs}_{412} = \mathbf{Abs}_E - \mathbf{Abs}_B$.

Onde:

\mathbf{Abs}_{412} : diferença entre as médias das absorvâncias da enzima (\mathbf{Abs}_E) e do branco (\mathbf{Abs}_B), medidas a um comprimento de onda de 412 nm.

Em seguida, foi calculada a concentração da enzima expressa em mmolL^{-1} pela equação de Lambert-Beer:

$$\mathbf{A} = \boldsymbol{\varepsilon} \times \mathbf{b} \times \mathbf{c} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

\mathbf{A} : diferença entre as médias das absorvâncias da enzima e do branco;

$\boldsymbol{\varepsilon}$: absorbitividade molar em unidades de $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$;

\mathbf{b} : comprimento do caminho da amostra, isto é, o comprimento do caminho que a luz tem que atravessar na cuba ou qualquer recipiente onde esteja a solução, dado em cm;

\mathbf{c} : concentração do elemento que absorve, na solução, expressado em mmolL^{-1} .

A concentração calculada da enzima foi multiplicada por 800 (em relação a $800\mu\text{L}$ que é o volume da cubeta utilizada nos ensaios espectrofotométrico) e dividida por $10^6\mu\text{L}$, obtendo as miliunidades existentes em uma solução de 1:10 e da solução *stock*.

4.6 Estudo da Cinética Enzimática da AChE na Presença e Ausência de MC-LR

Para o estudo cinético, empregou-se a metodologia cinética de ELLMAN (1961) com uma modificação no volume da enzima para $32\mu\text{L}$ e no volume final para $500\mu\text{L}$. Foram combinados 7 tubos com diferentes concentrações do substrato na ausência do ativador conforme Tabela 2, e na presença do ativador (Tabela 3) os valores das absorvâncias (\mathbf{Abs}_{412}) foram medidos em cada um desses tubos, onde \mathbf{Abs}_{412} : diferença entre as médias das absorvâncias da enzima (\mathbf{Abs}_E) e do branco (\mathbf{Abs}_B), medidas a um comprimento de onda de 412 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 2. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR

Tubos	[S] (mmol.l.⁻¹)	ATChCl (μL)	AChE (μL)	DTNB (μL)	PBS (μL)
1	0,4	20	32	125	323
2	0,5	25	32	125	318
3	0,75	37,5	32	125	305,5
4	1,00	50	32	125	293
5	1,25	62,5	32	125	280,5
6	1,50	75	32	125	268
7	2,00	100	32	125	243
Branco	0,00	0,0	32	125	343

[S] =Concentração do Substrato, ATChCl= Cloreto de Acetilcolina,
AChE=AcetilColinesterase,PBS= Tampão Fosfato .

Tabela 3. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR

Tubos	[s] (mmol.l.⁻¹)	ATCCI (μL)	AChE (μL)	MC-LR	DTNB (μL)	PBS (μL)
1	0,4	20	32	50	125	273
2	0,5	25	32	50	125	268
3	0,75	37,5	32	50	125	255,5
4	1,00	50	32	50	125	243
5	1,25	62,5	32	50	125	230,5
6	1,50	75	32	50	125	218
7	2,00	100	32	50	125	243
Branco	0,00	0,0	0,0	0,00	125	293

[S] =Concentração do Substrato, ATChCl= Cloreto de Acetilcolina,
AChE=AcetilColinesterase,PBS= Tampão Fosfato.

Após a tomada da absorbância, foi determinada a concentração da enzima expressa em mmol.L^{-1} , em cada tubo, pela equação 2 .

Por fim calculamos a velocidade da reação (equação 2)

$$\text{Equação 2} \quad C = \left(\frac{5X C}{10^4} \right) \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$V = \left(\frac{C}{1\text{min}} \right) \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

A partir da concentração encontrada, em mmol.L^{-1} , foi empregada no cálculo da concentração correspondente a $500 \mu\text{L}$ (volume do ensaio) como o ensaio foi realizado em 1 minuto, logo o valor encontrado, $\text{mmol.L}^{-1}\text{min}$, equivale à velocidade da reação enzimática.

4.6.1. Estudo cinético da AChE envolvendo os valores da velocidade inversa ($1/V$)

proporcional ao inverso da concentração do substrato. ($1/S$.)

Após encontrarmos as absorbâncias, calcularmos as concentrações do absorvente e as médias da velocidade em $\text{mmol.L}^{-1}\text{min}$, fizemos os cálculos da velocidade inversa diretamente proporcional ao inverso da concentração de acordo com as tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR (envolvendo velocidade inversa $1/V$)

Tubo	[s]	1/[s]	ATChCl μL	Abs ₄₁₂	Concentração em mmol.L^{-1}
1	0,4	2,5	20	0,423	0,031
2	0,5	2,0	25	0,5032	0,037
3	0,75	1,33	37,5	0,5848	0,043
4	1,00	1,00	50	0,6392	0,047
5	1,25	0,8	62,5	0,6936	0,051
6	1,50	0,66	75	0,8568	0,063
7	2,00	0,5	100	0,9112	0,067
Branco	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00

[s]=Concentração do Substrato em mmol.L^{-1} , 1/[s]= Inverso da Concentração do substrato em mmol.L , ATChCl= Cloreto de Acetilcolina.

Tabela 5. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR (envolvendo velocidade inversa 1/V)

Tubos	[s]	1/[s]	ATChCl em μL	Abs₄₁₂	Concentração em mmol.L^{-1}
1	0,4	2,5	20	0,6528	0,048
2	0,5	2,0	25	0,680	0,050
3	0,75	1,33	37,5	0,7344	0,054
4	1,00	1,00	50	0,7616	0,056
5	1,25	0,8	62,5	0,8296	0,061
6	1,50	0,66	75	0,8704	0,064
7	2,00	0,5	100	0,9240	0,068
Branco	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00

[s]=Concentração do Substrato em mmol.L^{-1} , 1/[s]= Inverso da Concentração do substrato em mmol.L , ATChCl= Cloreto de Acetilcolina.

4.7 Preparo e Otimização de uso dos Biossensores

4.7.1. Preparo dos sensores

O preparo dos biossensores foi realizado pelo procedimento de imobilização da enzima por ligação cruzada com o glutaraldeído. Uma pasta enzimática foi preparada a partir da adição dos reagentes apresentados na Tabela 6, a uma mistura obtida previamente pela adição de 100 μL de solução de HEC (3%*m/v*) a 100 mg de grafite, seguida de homogeneização.

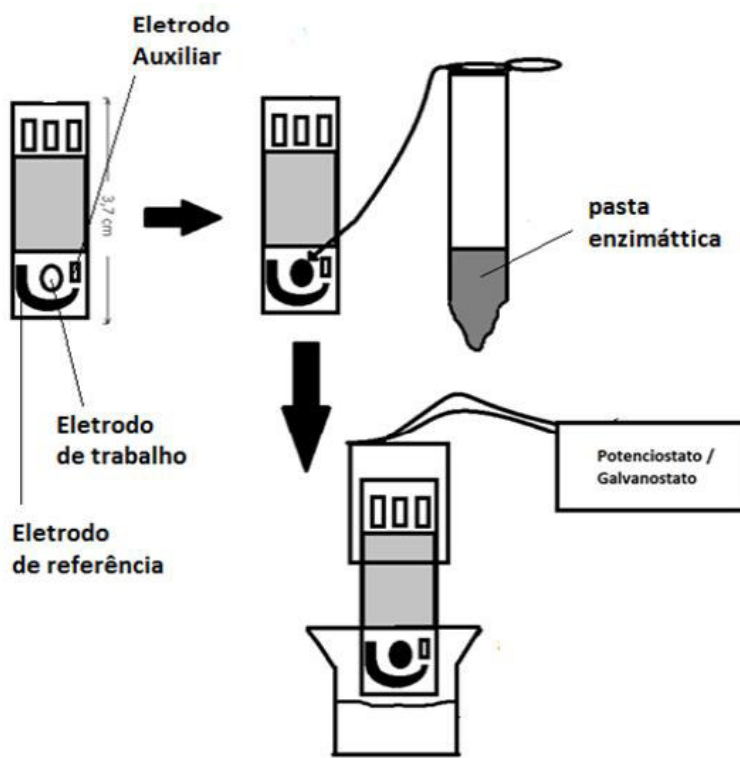
Tabela 6. Reagentes utilizados no preparo da pasta enzimática a ser aplicada no eletrodo de trabalho do biossensor

REAGENTE ADICIONADO^a	VOLUME ADICIONADO	PROPORÇÃO FINAL NA PASTA ENZIMÁTICA, APÓS HOMOGENEIZAÇÃO
Solução trabalho da enzima AChE	90 μL (volume determinado em função da atividade relativa da AChE na solução de trabalho)	Atividade relativa final: 102 mU/g da pasta
Solução de glutaraldeído a 25 % (m/v)	60 μL	16,5 % (m/m)
Solução de BSA a 3,2% (m/v)	10 μL	2,8 % (m/m)

^aAdição feita a uma mistura de grafite e hidroxietilcelulose
AChE: Acetilcolinesterase; BSA: Soroalbumina Bovina.

Em seguida, depositou-se manualmente 2 mg da pasta sensível na região de trabalho composto de grafite e contendo os mediadores tetracianoquinodimetano (TCNQ) ou fitalocianina de cobalto (CoPC) (Figura 13). Como os eletrodos podem conter os dois mediadores eletroquímicos, o TCNQ ou CoPC, os sensores foram previamente testados por voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (VC) para se verificar o seu potencial de trabalho, uma vez que o mediador TCNQ origina potenciais em torno 100 mV e o mediador CoPC gera potenciais em torno de 400mV. O biossensor foi levado à refrigeração a 4°C durante 24h. Tempo e temperaturas ideais para fixação da enzima na superfície do eletrodo (MENDONCA *et. al*, 2012; NUNES *et. al*, 2001).

Figura 13. Aplicação da pasta sensível de AChE (EE) no eletrodo de trabalho do sensor.



4.7.2 Otimização dos Parâmetros Operacionais

Foram realizados testes envolvendo voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica para avaliar o potencial de trabalho e escolha do mediador eletroquímico, os mediadores eletroquímicos testados foram: tetracianoquinodimetano (TCNQ) e ftalocianina de cobalto (CoPC) com a finalidade de se observar quais desses mediadores geravam potenciais mais baixos. Segundo NUNES *et. al* (2014), o potencial de trabalho baixo é mais vantajoso para o processo anódico pois impede a oxidação de possíveis espécies interferentes existentes nas amostras.

Foi avaliado o efeito do pH sobre a atividade da enzima AChE (EE) numa faixa de valores de pH entre 6,6 a 8,8, observando-se em quais desses valores a corrente permanecia mais estável.

As condições operacionais foram otimizadas de modo que originassem valores de corrente mais próximos a 200 nA, uma vez que trabalhar com correntes próximas a 200 nA descartam a possibilidade de o sinal de corrente ser confundido com ruídos (NUNES *et. al*, 2014; MENDONÇA *et. al*, 2012). Assim, foram testadas combinações de quatro concentrações de substrato ATChCl (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mmolL⁻¹), três valores de carga enzimática (0,404; 2,02 e 4,04 mU/eletrodo), tendo sido então realizados, em triplicata, os ensaios cronoamperométricos, ainda em ausência do ativador MC-LR.

Também foram testados os tempos de corrida cronoamperométrica de 30 e 55s, e verificada a estabilização da corrente nas diferentes concentrações do substrato nesses dois tempos.

Para os testes de precisão, foram realizadas 10 medidas cronoamperométricas com o mesmo sensor e com sensores diferentes, de forma a se determinar a reprodutibilidade e a repetibilidade, em termos de desvio padrão relativo, nessas condições.

4.7.3 Otimização do tempo de incubação

Antes dos testes de ativação com a enzima AChE imobilizada, foram realizados testes para definir o melhor tempo de incubação com a MC-LR, ou seja, a partir de que tempo de incubação poderíamos obter um melhor aumento da corrente.

Inicialmente, foi registrado o sinal obtido por meio da medida cronoamperométrica a 100 mV do biossensor imerso em solução de substrato (ATChCl 2,5mmolL⁻¹) e tampão fosfato pH=7.2. Logo após, o biossensor foi lavado e seco e colocado em incubação por 2, 5, 10 e 15 min em uma solução contendo o inibidor. Após a incubação, o eletrodo foi novamente lavado e seco, medindo-se, então, o sinal da atividade enzimática com o substrato. Observou-se então, qual tempo de incubação gerava melhor sinal de corrente.

4.8 Ensaio de Ativação da Enzima AChE imobilizada e Sensibilidade dos Biossensores

Foram realizadas medidas de voltametria de pulso diferencial, voltametria cíclica e cronoamperometria, a fim de se avaliar o aumento da corrente por ação das MC-LR em biossensores. A porcentagem de ativação foi determinada pelo aumento da corrente, sendo esta proporcional à concentração da MC-LR e determinada pela fórmula:

$$\text{Equação- 3} \quad \text{AR (\%)} = \frac{(I - I_0) \times 100}{I}$$

Onde:

AR(%) = ativação relativa;

I₀ = intensidade de corrente antes da ativação enzimática;

I = intensidade de corrente após ativação enzimática.

Foram construídas curvas de ativação relativa percentual relacionando a concentração da MC-LR e a ativação relativa percentual AR(%), para biossensores e enzimas livres em solução. Os testes foram feitos por leituras cronoamperométricas em concentrações crescentes de MC-LR (0,5; 2 ; 4; 8 e 40 e 100 µgL⁻¹), similarmente à faixa de concentração adotada por CÂMPAS *et. al*, (2005) e GATANANTE, ESPIN, MARTY (2015) quando estes exploraram a inibição da fosfatase, ao invés da ativação da acetilcolinesterase. A sensibilidade do método foi avaliada pelo cálculo dos limites de detecção e de quantificação, diretamente da curva analítica (ativação enzimática *versus* conc. MC-LR).

4.9 Ensaios de Recuperação em Água Deionizada

Para avaliar a exatidão do método de detecção da MC-LR pelo biossensor, foram efetuados ensaios de recuperação em amostras de água deionizada. As amostras foram fortificadas com as seguintes concentrações finais de MC-LR: 0,5; 0,8; 1,0, 2,0 e 4,0 μgL^{-1} , e deixadas em repouso por 2h, após esse tempo, procederam-se os testes de ativação. Foi registrada a corrente após a reação com substrato e, posteriormente, o biossensor foi lavado e mergulhado em solução com a MC-LR durante 10 min. O sinal eletroquímico foi novamente tomado e a ativação relativa foi então determinada. Em seguida, o biossensor foi mergulhado na amostra fortificada, procedendo-se a ativação de modo semelhante ao realizado utilizando o padrão. A porcentagem de recuperação foi obtida pela razão entre a resposta do ensaio com a amostra e a resposta do ensaio com a solução padrão, segundo a equação que segue. Os níveis de fortificação assemelham-se aos utilizados por CASSINI, ANTUNES E KELLER (2015) e por SANCHES *et.al* (2007). Os ensaios de recuperação foram feitos em triplicata para cada nível de fortificação.

$$\text{Equação- 4} \quad \% \text{ Recuperação} = \left(\frac{\text{Resposta da amostra}}{\text{Resposta do padrão}} \right) \times 100$$

4.10 Monitoramento da MC-LR em Ambiente Aquático Empregando os Biossensores

Foram coletadas amostras do Rio Bacanga, foram selecionados 7 diferentes pontos, estrategicamente distribuídos em todo o seu percurso, em São Luis-MA. contemplando áreas com e sem interferência da maré, bem como pontos com menor ou maior interferência antropogênica. As amostras de água foram armazenadas em frascos de polietileno, hermeticamente fechados, e mantidos a 4 °C até o momento das análises. A Tabela 7 apresenta informações sobre os pontos amostrais, bem como seu georreferenciamento.

Tabela 7. Informações sobre os pontos tomados para amostragem em diferentes pontos do Rio Bacanga

Amostras	COORDENADAS		LOCALIDADE
	S	W3	
A1	02° 32'50.0"	44° 18'16.1"	Localizada a 50 metros da população Ribeirinha com palafitas e Barcos de pescadores.
A2	02°32'52.1"	44°18'17.2"	Distante 300 metros da margem da barragem do Bacanga localizada no centro do Rio, na região do Anel Viário .
A3	02°32'51.3"	44°18'18.5"	Localizada a 50 Metros da barragem do. bacanga, próxima a avenida dos portugueses no estuário
A4	02° 32'53.3"	44° 18'27.4"	Local mais distante da barragem próximo a um conjunto de casas brancas com uma grande varanda, e outras de alvenaria.
A5	02°33'07.0"	44°18'35.5"	Lugar localizado na entrada do Igarapé, as margens esquerda do Rio Bacanga.
A6	02°33'02.4"	44°18'41.9"	Localizado próxima a antiga Fábrica, onde uma chaminé serve como referência.
A7	02°34'02.5"	44°18'42.0"	Ponto de referência próxima a ultima curva direita do Igarapé, ponto sem população Ribeirinha visível

Coletas realiadas no Rio Bacanga-São Luis-MA- entre os dias 19 e 20 de junho de 2016.
Bioma: Litoral.

Para caracterização físico-química das amostras de água, foram determinados, os seguintes parâmetros: pH e salinidade. As análises foram realizadas, tendo sido empregado o analisador multiparâmetro (U22-Series, Horiba), previamente calibrado.

Em seguida, as amostras foram analisadas pelo biossensor otimizado, mediante ensaios de ativação da AChE após incubação do biossensor em cada amostra. O aumento da intensidade de corrente serviu de base para o cálculo da ativação relativa percentual (AR%), foi um indicador da presença da MC-LR.

4.11 Ensaios de Recuperação em Amostras de Água: Estudo do Efeito da Matriz

As amostras de água coletadas no Rio Bacanga que não apresentaram valores de Ativação Relativa percentual (AR%) e nem de Inibição relativa percentual (IR%), foram fortificadas com concentrações crescentes de MC-LR de 0,5; 0,8; 1,0; 2 e 4 μgL^{-1} e deixadas em repouso por 24 h. Após esse tempo, procederam-se aos testes de ativação para compararmos com os valores da AR% da curva contendo o padrão, em processo semelhante ao descrito na no item 4.10. Isso foi feito para se observar se os outros componentes das águas naturais seriam capazes de alterar a resposta enzimática

4.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas do presente trabalho foram realizadas aplicando o teste t de Student empareado em um nível de 95% de probabilidade (CALLEGARI, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Ativação Inicial da Enzima Livre em Solução

Dados da ativação relativa percentual obtidos após as leituras cronoamperométricas com as enzimas AChE e BChE testadas, revelaram que a enzima, AChE (EE), foi também aquela em que mais se destacou, tomando-se como base uma atividade relativa percentual, AR% maior que 10% (Tabela 8). As etapas seguintes foram realizadas utilizando-se essa enzima.

Tabela 8. Valores da ativação relativa percentual observados com as diferentes enzimas colinesterases testadas

Enzima	AR (%)	I	I₀
AChE (GM)(80)	4,11	300,00	287,67
AChE (GM)(13-42)	4,65	350,00	333,72
AChE(GM)(45)	5,27	400,00	378,92
AChE (GM)(22)	8,29	327,82	300,64
AChE (EB)	10,6	498,40	445,56
AChE (EE)	30,7	450,00	311,83
BChE	15,3	4005,5	339,22

AChE= Acetilcolinesterase; GM=geneticamente modificada; EB=Eritrócito Bovino; EH= Eritrócito Humano, EE=;enguia elétrica, BChE=Butirilcolinesterase; n=3, AR(%) =Ativação relativa percentual; I= corrente final; I₀ = Corrente Inicial.

Ativadores enzimáticos modificam a taxa de uma reação na qual eles não são substratos. São geralmente moléculas ou íons, podendo também ser outras enzimas. A sua ação pode ser reversível ou irreversível. Se ligados covalentemente, são irreversíveis. Os ativadores aceleram as taxas da reação enzimática por promoverem o estado ativo do substrato ou da enzima acelerando a transferência de elétrons. (BON, FERRARA e CORVO, 2008)

5.2- Resultados dos Testes das Atividades Enzimáticas

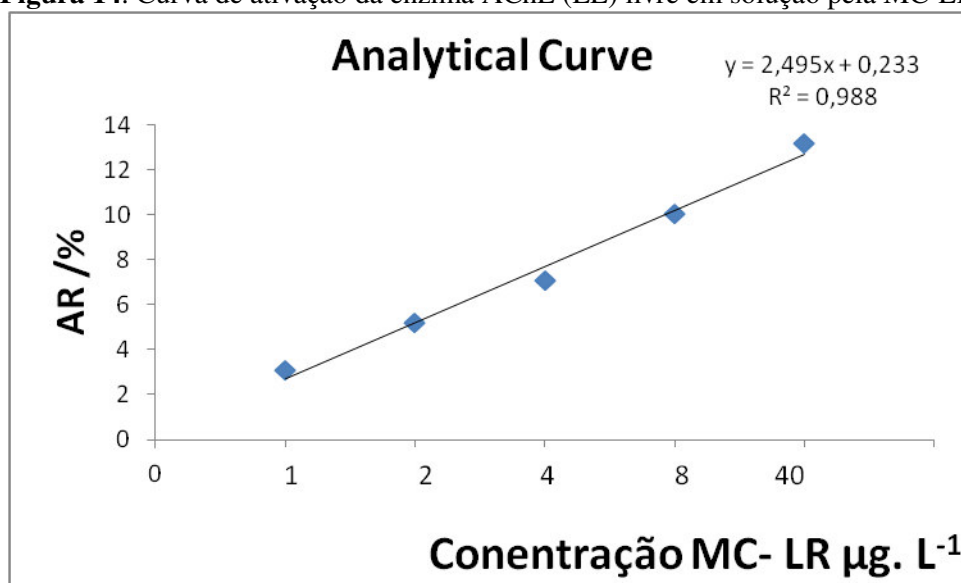
Os resultados dos ensaios espectrofotométricos com as enzimas AChE (EE) mostraram que a enzima AChE (EE) foi a que apresentou aos melhores valores de atividade enzimática com seguintes atividades específicas: 102 mU/mL e 0,408 mU/Eletrodo. Que significa as miliunidades da enzima por mL de solução bem como a miliunidades por eletrodo (quantidade a ser fixada na superfície do eletrodo).

Uma vez que os cálculos da atividade enzimática foram feitos baseados em uma faixa preestabelecida de 50 mU/mL a 200 mU/mL observou-se que os valores aqui encontrados estão dentro da faixa considerada como ótima para atividade enzimática, e revelou uma boa interação ente enzima e substrato (MENDONÇA, 2012).

5.3 Interação da Enzima AChE(EE) com o Substrato em presença da MC-LR

A curva analítica foi traçada a partir das médias das correntes obtidas por medidas cronoamperométricas, avaliando-se a interação da enzima AChE(EE) com o substrato e com a MC-LR, sendo esta diluída em diversas concentrações, tal curva comprovou o aumento da corrente proporcional a concentração da MC-LR (Figura 14).

Figura 14. Curva de ativação da enzima AChE (EE) livre em solução pela MC-LR

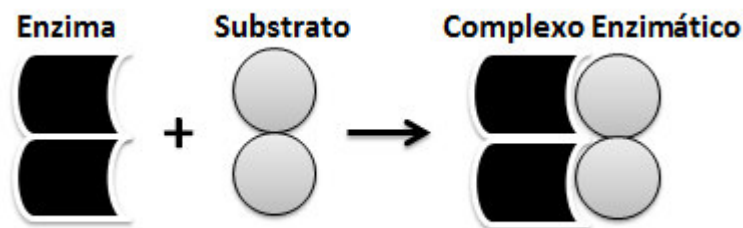


5.4 Estudo Cinético de Ativação Enzimática

A absorbância do ensaio em branco encontrada foi igual a zero e para todos os outros ensaios, os valores da absorbância cresceram de forma proporcional à concentração do substrato.

Segundo Bon, Ferrara e Corvo (2008), ativadores enzimáticos comportam-se como catalisadores que auxiliam na ligação enzima-substrato, auxiliando ainda no transporte de elétrons no caso das reações de oxi-redução (Figura 15).

Existem fatores que afetam as reações enzimáticas atuando no mecanismo cinético dessas reações, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, pela modificação na estrutura dos sítios das diferentes enzimas e, conseqüentemente, alterando a atividade catalítica, entre eles, presença ou ausência de ativadores (CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M,2003; LONG, F.,M, 2009)

Figura 15. Representação da formação do complexo enzimático.

Fonte: SILVA, 2014.

Pode-se observar, através da relação concentração do substrato e velocidade da reação nas Tabelas 9 e 10, que a velocidade da catalise da enzima AChE foi consideravelmente maior do que sem a MC-LR; pode-se então afirmar que a MC-LR é um ativador da enzima AChE, pois agiu sobre a atividade enzimática aumentando a velocidade da reação de catálise do substrato ATChCl.

Tabela 9. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR

Tubos	[S]Mmol.L ⁻¹	Abs ₄₁₂	Concentração em mmol.L ⁻¹	Velocidade em mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹
1	0,4	0,423	0,031	1,55.10 ⁻⁵
2	0,5	0,5032	0,037	1,85. 10 ⁻⁵
3	0,75	0,5848	0,043	2,15.10 ⁻⁵
4	1,00	0,6392	0,047	2,35. 10 ⁻⁵
5	1,25	0,6936	0,051	2,55. 10 ⁻⁵
6	1,50	0,8568	0,063	3,15. 10 ⁻⁵
7	2,00	0,9112	0,067	3,35. 10 ⁻⁵
Branco	0,00	0,00	0,00	0,00

[S]Mmol.L⁻¹ = Concentração do Substrato Abs₄₁₂ = Absorbância em 412 nm

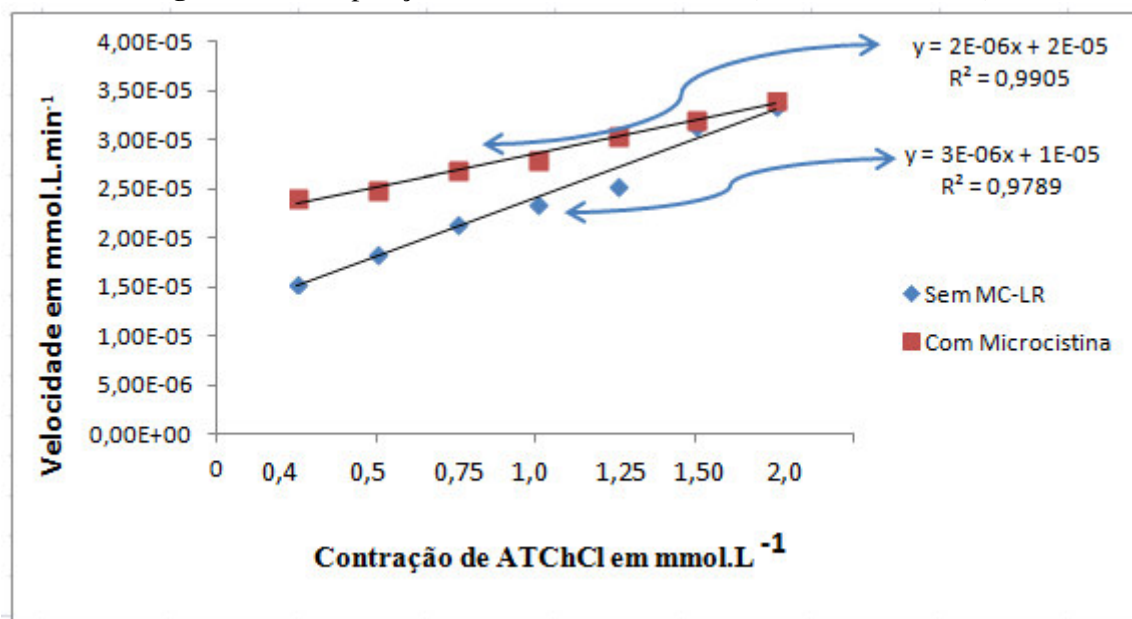
Tabela 10. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR

Tubos	[s]mmol.L ⁻¹	Abs ₄₁₂	Concentração em mmol.L ⁻¹	Velocidade em mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹
1	0,4	0,6528	0,048	2,4.10 ⁻⁵
2	0,5	0,680	0,050	2,5. 10 ⁻⁵
3	0,75	0,7344	0,054	2,7.10 ⁻⁵
4	1,00	0,7616	0,056	2,8.10 ⁻⁵
5	1,25	0,8296	0,061	3,05. 10 ⁻⁵
6	1,50	0,8704	0,064	3,2. 10 ⁻⁵
7	2,00	0,9240	0,068	3,4. 10 ⁻⁵
Branco	0,00	0,00	0,00	0,00

[S]Mmol.L⁻¹ = Concentração do Substrato Abs₄₁₂ = Absorbância em 412 nm

Observou-se ainda que os valores das absorbâncias obtidas cresceram proporcionalmente a concentração do substrato, assim como a concentração do produto e a velocidade da reação, até um determinado ponto. Tal efeito está de acordo com LEHNINGER (1989), que afirma que a velocidade da reação enzimática cresce de forma proporcional à concentração do substrato até um ponto no qual a velocidade não se modificará muito, mesmo que sejam adicionadas quantidades crescentes de substrato havendo, pois, um efeito de saturação. Tal efeito acontece quando todas as enzimas estão encaixadas em seus substratos. Logo, no presente experimento a partir da concentração de 2mmolL^{-1} , observamos que as absorbâncias para os ensaios na presença e ausência de MC-LR tornaram-se próximas, assim como a velocidade da reação enzimática para ambos os casos. Essa característica pode ser melhor observada através das curvas representadas pela Figura 16.

Figura 16. Sobreposição das curvas de velocidade (com e sem MC-LR).



Através da Figura 15, observa-se também que há um ponto de encontro para as curvas de velocidade com e sem MC-LR, a partir da concentração 2mmolL^{-1} .

A fim de verificar o comportamento acima descrito sobre a estabilidade da velocidade enzimática, a partir de uma determinada concentração, foram adicionadas 2 concentrações complementares acima de 2mmolL^{-1} ($2,5$ e $3,0 \text{mmolL}^{-1}$) e calculadas as absorbâncias, a concentração do produto e velocidade da reação (em triplicata), segundo as Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR com dois novos pontos

Tubos	[s]	Abs ₄₁₂	Concentração em mmol.L ⁻¹	Velocidade em mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹
1	0,4	0,423	0,031	1,55.10 ⁻⁵
2	0,5	0,5032	0,037	1,85. 10 ⁻⁵
3	0,75	0,5848	0,043	2,15.10 ⁻⁵
4	1,00	0,6392	0,047	2,35. 10 ⁻⁵
5	1,25	0,6936	0,051	2,55. 10 ⁻⁵
6	1,50	0,8568	0,063	3,15. 10 ⁻⁵
7	2,00	0,9112	0,067	3,35. 10 ⁻⁵
8	2,5	0,9114	0,067	3,35. 10 ⁻⁵
9	3,0	0,9111	0,0669	3,345.10 ⁻⁵
Branco	0,00	0,00	0,00	0,00

[S]Mmol.L⁻¹= Concentração do Substrato Abs₄₁₂ = Absorbância em 412 nm

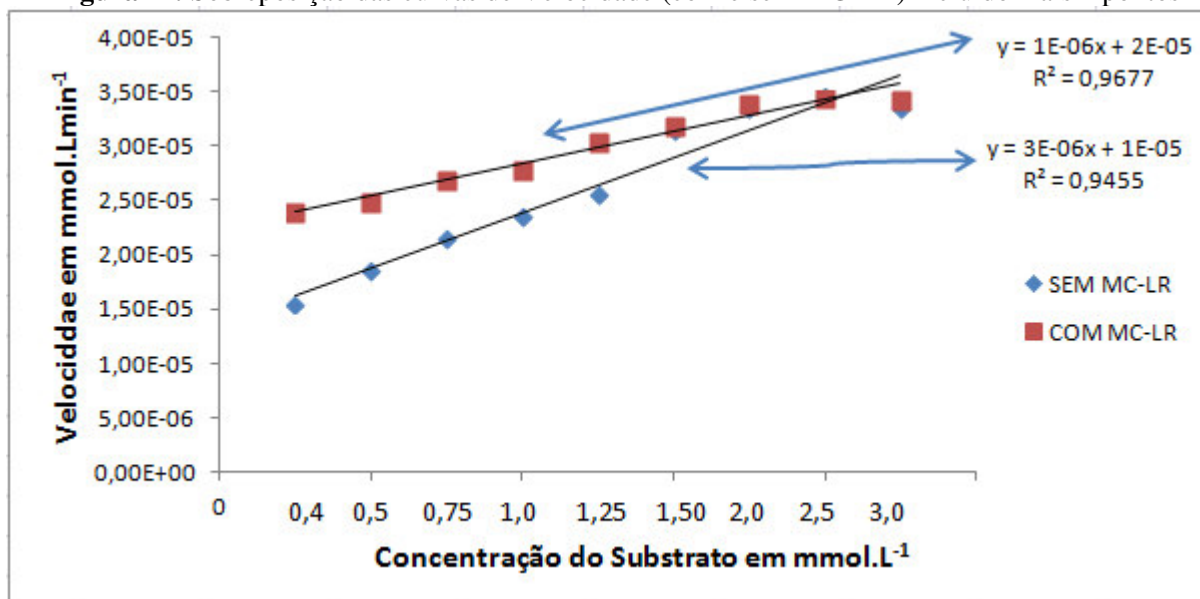
Tabela 12. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR com dois novos pontos

Tubos	[s]	Abs ₄₁₂	Concentração em mmol.L ⁻¹	Velocidade em mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹
1	0,4	0,6528	0,048	2,4.10 ⁻⁵
2	0,5	0,680	0,050	2,5. 10 ⁻⁵
3	0,75	0,7344	0,054	2,7.10 ⁻⁵
4	1,00	0,7616	0,056	2,8.10 ⁻⁵
5	1,25	0,8296	0,061	3,05. 10 ⁻⁵
6	1,50	0,8704	0,064	3,2. 10 ⁻⁵
7	2,00	0,9240	0,068	3,4 10 ⁻⁵
8	2,5	0,9241	0,067	3,45. 10 ⁻⁵
9	3,0	0,9221	0,0669	3,445.10 ⁻⁵
Branco	0,00	0,00	0,00	0,00

[S]Mmol.L⁻¹= Concentração do Substrato Abs₄₁₂ = Absorbância em 412 nm

Através dos dados das Tabelas 11 e 12, verificou-se que a partir da concentração de 2mmolL⁻¹, mesmo em concentrações crescentes do substrato não há uma variação da absorbância e conseqüentemente da velocidade, o que pode ser também representado através da Figura 17.

Figura 17. Sobreposição das curvas de Velocidade (com e sem MC-LR) incluído mais 2 pontos



5.4.1 Dados da cinética da AChE por interação com a MC-LR à partir da velocidade inversa

Fazendo-se os cálculos da velocidade inversa ($1/V$) proporcional a concentração inversa ($1/[S]$) do substrato obtivemos os dados apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Estudo cinético da AChE na ausência de MC-LR envolvendo velocidade inersversa

Tubo	[s]	1/[s]	ATChCl em μL	Abs ₄₁₂	Cocentração em mmol.L^{-1}	Velocidade em mmol.L.min	1/V
1	0,4	2,5	20	0,423	0,031	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^4$
2	0,5	2,0	25	0,5032	0,037	$1,85 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^4$
3	0,75	1,33	37,5	0,5848	0,043	$2,15 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^4$
4	1,00	1,00	50	0,6392	0,047	$2,35 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^4$
5	1,25	0,8	62,5	0,6936	0,051	$2,55 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^4$
6	1,50	0,66	75	0,8568	0,063	$3,15 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^4$
7	2,00	0,5	100	0,9112	0,067	$3,35 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^4$
Branco	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00

[s]=Contentração do Substrato em mmol.L^{-1} , 1/[s]= Inverso da Concentração do subatrato em mmol.L , ATChCl= Cloreto de Acetilicolina, 1/V=Inverso da Velocidade m mmol.L.min

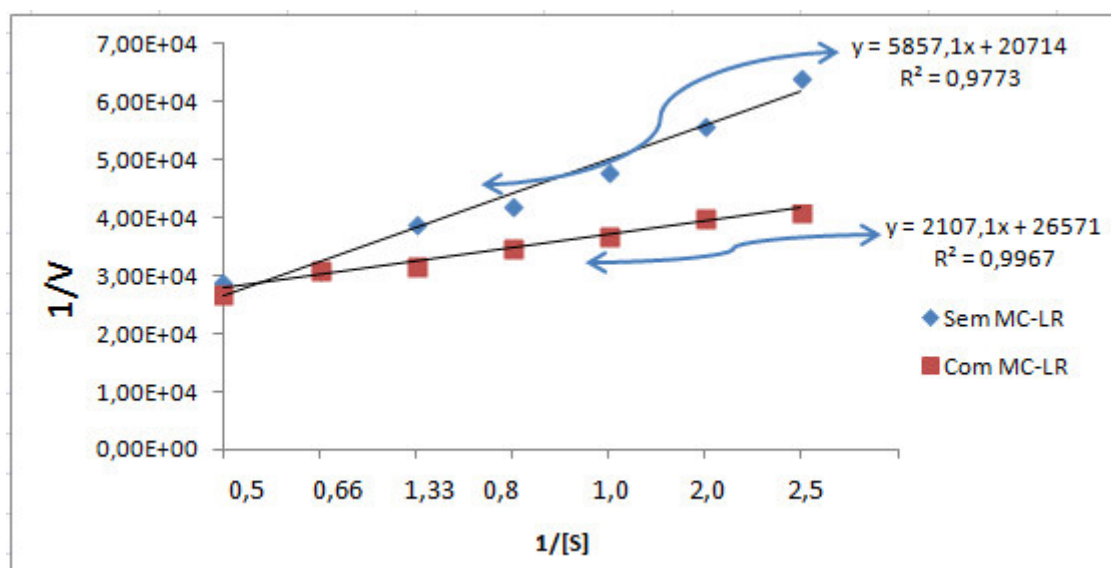
Tabela 14. Estudo cinético da AChE na presença de MC-LR envolvendo velocidade inversa

Tubos	[s]	1/[s]	ATChCl em μL	Abs ₄₁₂	Cocentração em mmol.L^{-1} ;	Velocidade em mmol.L.min	1/V
1	0,4	2,5	20	0,6528	0,048	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^4$
2	0,5	2,0	25	0,680	0,050	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^4$
3	0,75	1,33	37,5	0,7344	0,054	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$3,7 \cdot 10^4$
4	1,00	1,00	50	0,7616	0,056	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^4$
5	1,25	0,8	62,5	0,8296	0,061	$3,05 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^4$
6	1,50	0,66	75	0,8704	0,064	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^4$
7	2,00	0,5	100	0,9240	0,068	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$2,94 \cdot 10^4$
Branco	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00

[s]=Contentração do Substrato em mmol.L^{-1} , 1/[s]= Inverso da Concentração do substrato em mmol.L , ATChCl= Cloreto de Acetilcolina, 1/V=Inverso da Velocidade m mmol.L.min

A partir das Tabelas 13 e 14, verificou-se que no estudo cinético da AChE de acordo com a velocidade inversa (1/V), a velocidade decresceu de forma proporcional ao inverso da concentração do substrato (1/[S]) colocando-se em ordem crescente, observamos que as velocidades tem pontos semelhantes na concentração inicial, como observada na Figura 18.

Figura 18. Sobreposição das curvas da cinética enzimática na presença e ausência de MC-LR relacionando os valores do inverso da velocidade 1/V e o inverso da concentração do substrato 1/[S].



Notou-se através das curvas representadas na Figura 15 que há uma sobreposição da curva sem MC-LR em relação a curva com MC-LR, como já era esperado para esse tipo de gráfico, uma vez que envolve a velocidade inversa de ambas.

5.4.2 Cálculo da constante cinética da velocidade

Através dos valores acima obtidos com o estudo cinético, foi calculado o valor da constante da cinética enzimática, através da equação de Michaelis-Menten (LEHNINGER,1989).

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Constante de Michaelis

Equação- 5

A partir dos seguintes valores:

$$V_0 = 2,9 \cdot 10^4 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$V_{\max} = 6,4 \cdot 10^4 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Tem-se que:

$$K_m = 2,41$$

Segundo LEHNINGER (1989), valores de K_m próximo à concentração final do substrato, indicam uma curva de atividade enzimática linear e demonstram uma excelente interação entre enzima e substrato.

Através dos dados obtidos no estudo cinético observamos que a MC-LR aumenta a atividade enzimática da AChE, funcionando como um ativador para essa enzima, os dados foram obtidos a níveis de absorvância e valores da velocidade da reação, através de curvas relacionando velocidade da reação na presença e ausência da MC-LR, observamos valores maiores de velocidade na presença dessa hepatoxina.

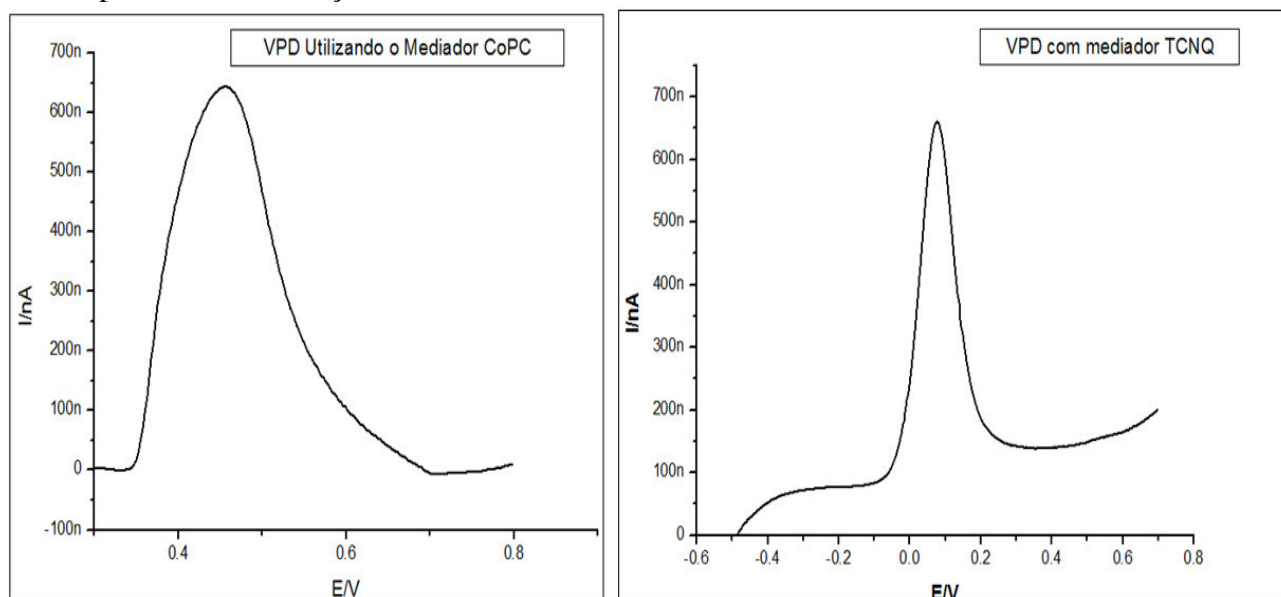
5.5 Otimização do biossensor

5.5.1 Escolha do mediador eletroquímico e potencial de trabalho

Testes de caracterização eletroquímica revelaram que, utilizando o mediador tetracianoquinodimetano (TCNQ), em pH 7,2, foi possível realizar as medidas de corrente a um potencial mais baixo, como se pode perceber na Figura 19. Observou-se ainda que o potencial de trabalho (gerado pelo mediador CoPC (500 mV *versus* Ag/AgCl) foi muito maior em relação ao potencial utilizando o mediador TCNQ (100 mV *versus* Ag/AgCl).

Esse resultado concordou com o reportado por MENDONÇA *et. al* (2012). A utilização de valores menores de potencial de trabalho é preferível, uma vez que eliminam a influência por outros componentes da matriz (Nunes,2008)

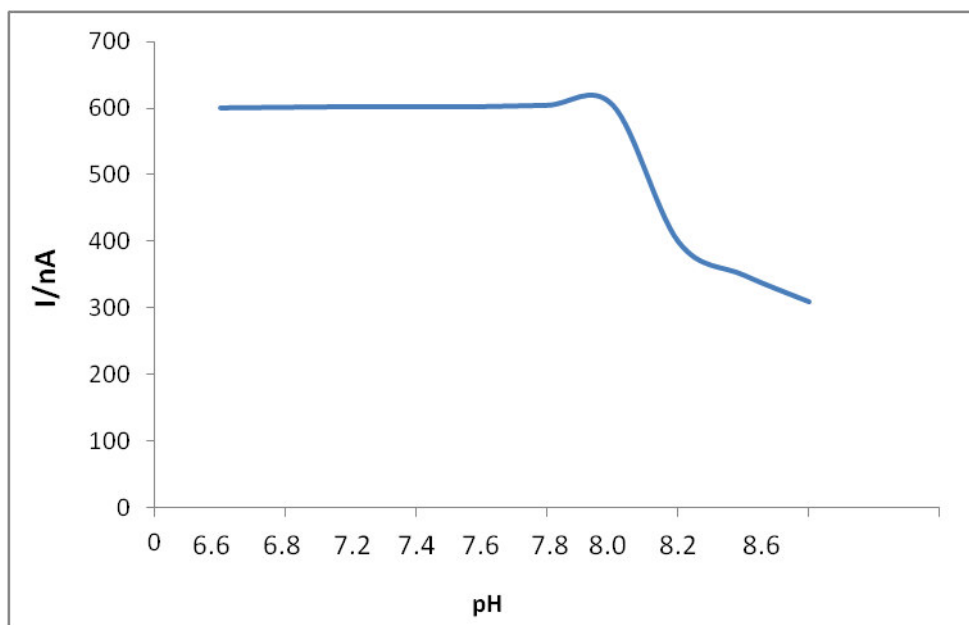
Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial gerado nos testes de otimização do sistema empregando biossensores, modificados com CoPC e TCNQ. Sensores modificados com CoPC e TCNQ respectivamente, em solução tampão fosfato, contendo o substrato ATChCl. Condições operacionais: tempo de estabilização: 3s; tempo de modulação: 0,05s; intervalo entre medidas: 0,1s; amplitude da modulação: 0,05055V. Velocidade de varredura 25mV s^{-1} .



5.5.2-Variação da corrente em função do pH

A intensidade da corrente avaliada por cronoamperometria a um potencial de trabalho de 100mv permaneceu estável entre valores de pH 6,6 e 7,8 (Figura 20). Em meio básico, observou-se uma redução da corrente, fato esse já explicado na literatura como estando relacionado à desnaturação da AChE em valores distintos de neutralidade (MELO, 2008). Optou-se, assim, por fixar o valor de pH em 7,2, por ser este mais utilizado em pesquisas com biossensores à base de AChE e por reduzir as interferências eletroquímicas que possam estar contidas na solução (NUNES *et. al*, 2014; MENDONÇA *et. al*, 2012).

Figura 20. Variação da corrente em função do pH.



A atividade enzimática é função direta das estruturas terciária e quaternária da enzima. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima, como aquecimento, alteração do pH do meio e outros, modifica também a estrutura do sítio ativo, diminuindo suas propriedades catalíticas (MELO, 2008; LEHNINGER, 1989).

5.5.3 Otimização da concentração do substrato e da carga enzimática no eletrodo de trabalho do biossensor

Após otimização do potencial de trabalho descrita anteriormente, combinou-se a concentração do substrato mais adequada à melhor carga enzimática e calculamos as médias de correntes geradas por essas combinações. Através do teste t Student, foi determinado, a 95% de probabilidade, o limite de confiança, o t crítico e o t calculado para cada uma das médias e foi possível estabelecer uma comparação e observar se as médias das correntes estão dentro de um intervalo de confiança (CALLEGARI, 2003).

As médias de intensidade de corrente obtidas, bem como uma comparação dessas médias pelo teste t de Student, a precisão expressa pelos coeficientes de variação e a exatidão pelos intervalos de confiança são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Otimização da concentração do substrato e da carga enzimática no eletrodo de trabalho do biossensor

[ATChCl] mmol.L ⁻¹	Carga Enzimática mU/Eletrodo	Corrente obtida I/nA	IC (nA)	CV %
2,5	0,408	220	217,54—262,43	2
2,5	2,04	400	364,83—435,17	3,35
2,5	4,08	500	464,58—534,42	1,2
2,0	0,408	150	144—155,8	2,35
2,0	2,04	350	344—356,34	2,72
2,0	4,08	400	375,12—424,87	5
1,5	0,408	140	115,13—164,87	7,14
1,5	2,04	300	287—312,43	1,18
1,5	4,08	400	375—424,87	2,5
1.0	0,408	100	75—124,87	10
1.0	2,04	300	266,97—333,03	4,42
1.0	4,08	450	461,97—483,03	2,95

*ATChCl =Substrato mU/Eletrodo =Carga Enzimática I/nA=Corrente nanoampers CV%= Coeficiente de variação LC=Intervalo de confiança n=3. *Otimização visando a obter intensidade de corrente próxima a 200 nA.

Em geral, os dados apresentados na Tabela 15 demonstraram boa precisão nas medidas, com coeficientes de variação abaixo de 20%, considerados aceitáveis para esse tipo de estudo, de acordo com SKOOG (2005). Além disso, observa-se que cada média está enquadrada em um intervalo de confiança relativamente pequeno.

Como dito anteriormente, é importante trabalhar com correntes próximas a 200 nA pois esse valor de corrente descarta a possibilidade de o sinal ser confundido com um possível ruído ruído. (NUNES *et. al*, 2014; MENDONÇA *et. al*, 2012). Podemos notar que a combinação que originou corrente mais próxima a 200n/A foi a concentração de 2,5mmol.L⁻¹ de ATChCl e a carga enzimática de 0,408 mU/Eletrodo (Tabela 16). Portanto, tais condições foram fixadas para as etapas seguintes do trabalho.

Mediante aplicação do teste t de Student empareado em um nível de 95% de probabilidade, foram feitas comparações estatísticas das combinações da concentração do substrato *versus* carga enzimática que resultaram em valores de corrente mais adequados. (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação entre as médias das intensidades corrente obtidas nos testes de otimização concentração do substrato *versus* carga enzimática

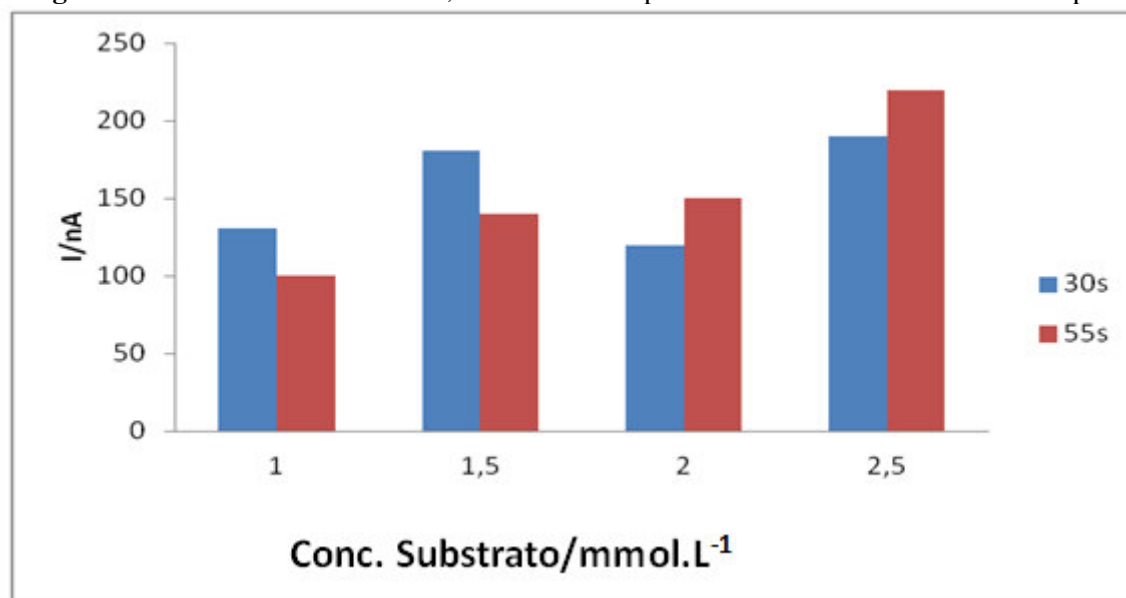
[ATChCl] mmol.L ⁻¹	Carga Enzimática mU/Eletrodo	Corrente obtida I/nA
2,5	0,408	220 a
2,0	0,408	150 b
1,5	0,408	140 b
1,0	0,408	100 c

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste t de Student em um nível de 95% de confiança. n=3.

5.5.4. Estabilidade da corrente, obtida cronoamperometricamente em diferentes tempos

Ao comparar os tempos de corrida cronoamperométrica, foi possível concluir que para o tempo de 55s, houve uma maior linearidade da corrente à medida que a concentração do substrato aumentou em comparação com o tempo de 35s (Figura 21). O tempo utilizado para a finalização das medidas foi então fixado em 55s.

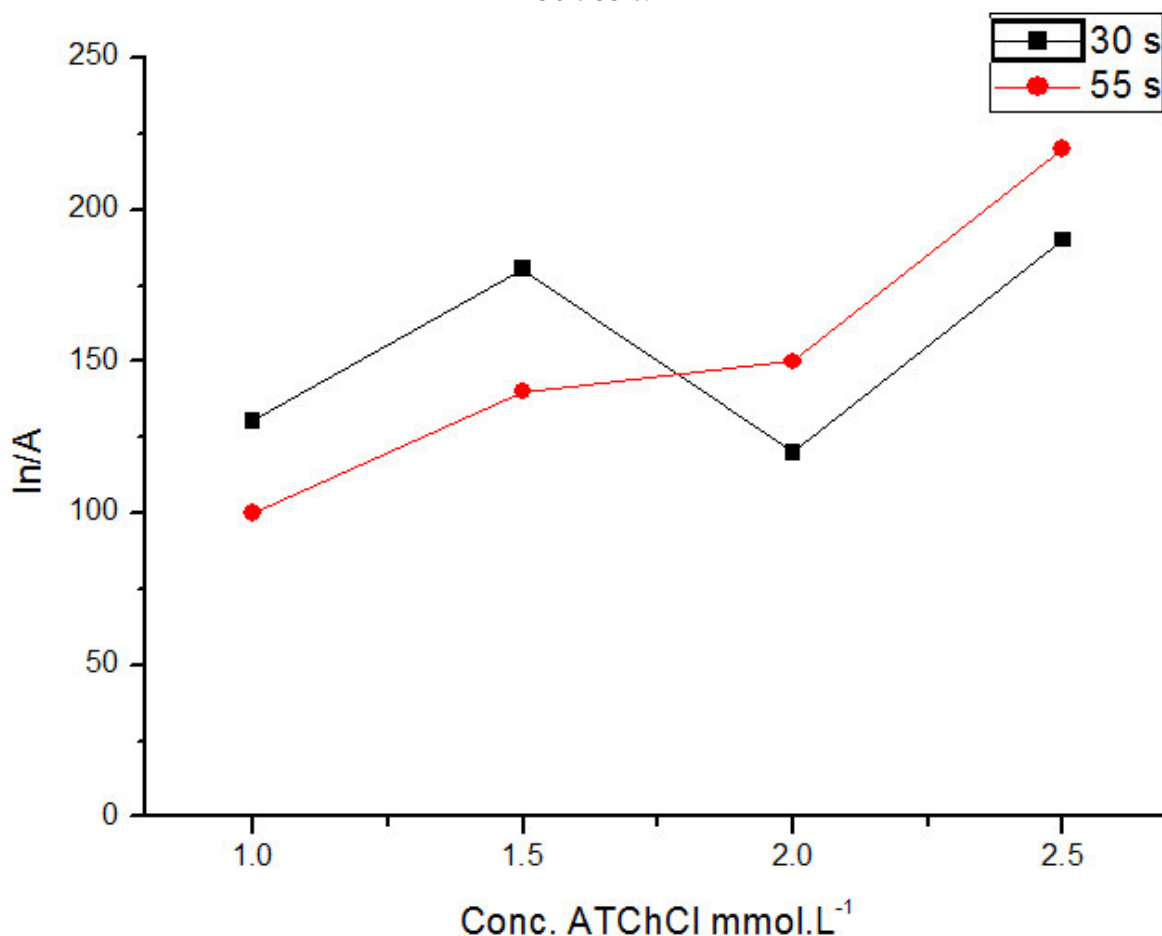
Figura 21. Estabilidade da corrente, obtida cronoamperometricamente em diferentes tempos.



Testes empregando enzima AChE (EE), mediador TCNQ, pH=7,2.

Tal estabilidade pode ser melhor observada através das curvas representadas na Figura 22

Figura 22. Curvas de estabilidade da corrente, obtidas cronopotametricamente em nos tempos de 30 e 55 s.



Testes empregando enzima AChE (EE), mediador TCNQ, pH=7,2.

5.6 Testes de Precisão

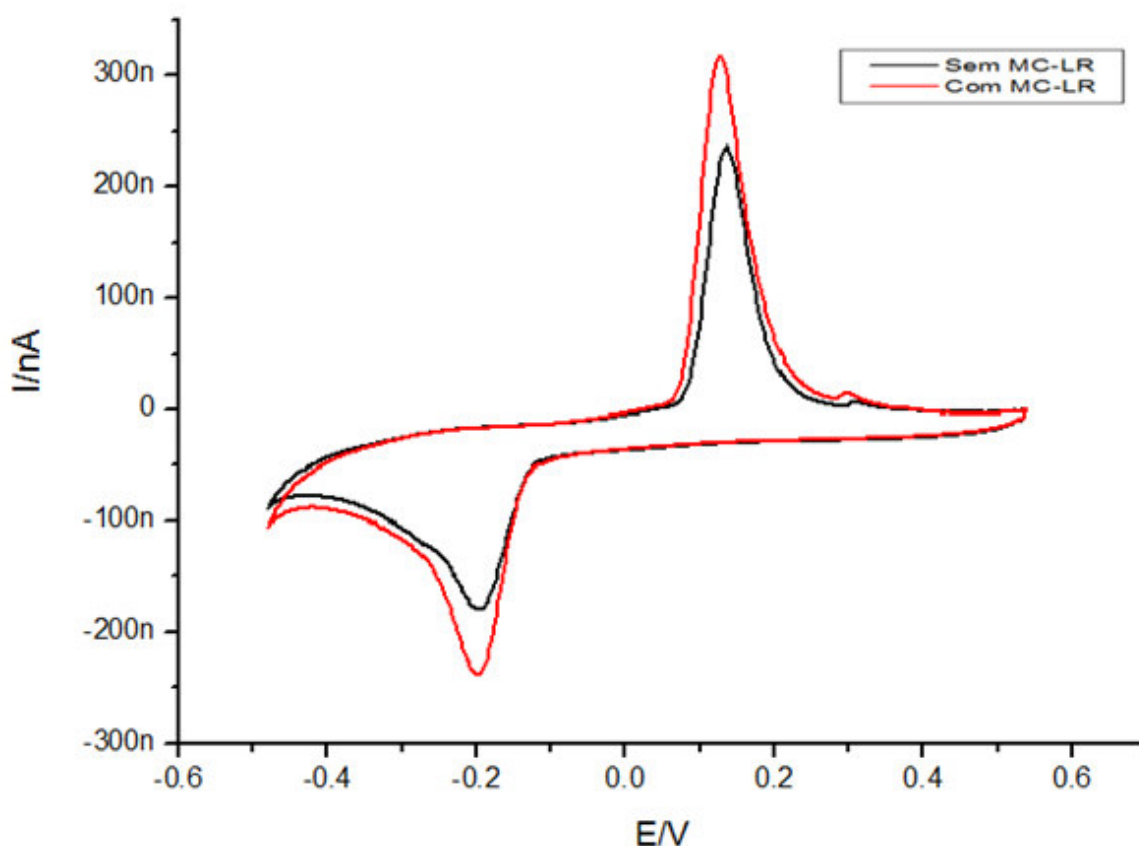
Nos testes de precisão, os resultados de estabilidade encontrados foram: CV= 8,32%, n=10, para ensaios com o mesmo sensor e CV= 9,33%, n=10 para ensaios com sensores diferentes, tais valores de coeficiente de variação são considerados estatisticamente adequados para esse tipo de protótipo, indicando que o biossensor é preciso (LI, 2013; WANG, 2011).

Biossensores utilizando enzima PP1A e PP2A para detectar tal analito demonstraram CV variando de 8,40 % a 9,50%, demonstrando assim que os biossensores desenvolvidos no presente trabalho estão em concordância ou são mais precisos que os que têm sido desenvolvidos na literatura (LIU e SUN, 2015; CÂMPAS *et. al*, 2005; GATANANTE, ESPIN e MARTY, 2005; LEFEBVRE, 2000).

5.7 Ativação da enzima AChE(EE) imobilizada e sensibilidade do biossensor

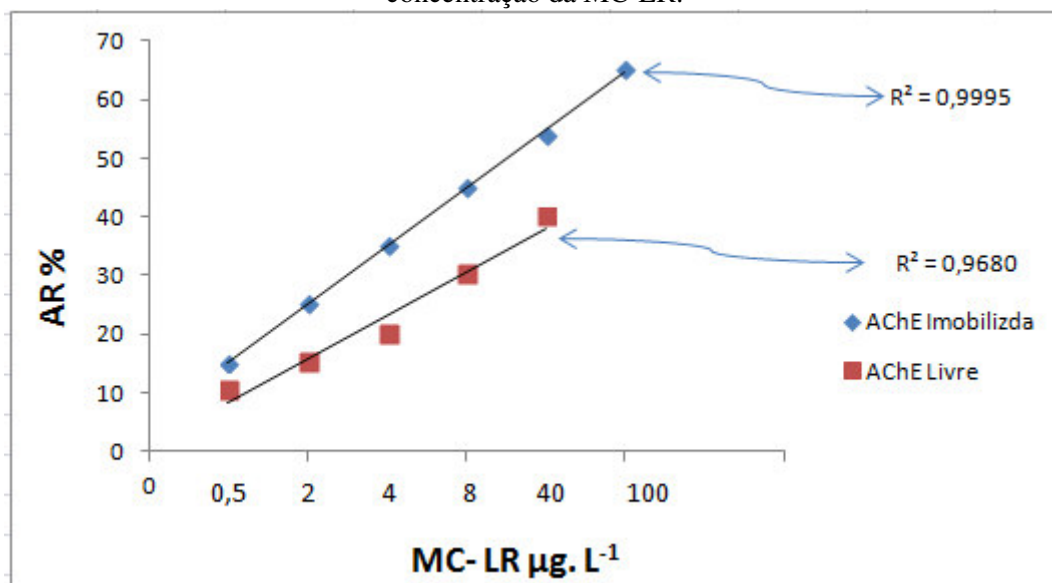
A ativação enzimática causada pela MC-LR, sobre a enzima AChE(EE), foi demonstrada inicialmente pelos testes empregando voltametria de pulso diferencial, quando os ensaios foram realizados em presença desse contaminante. Ao se utilizar a voltametria cíclica (Figura 23), confirmou-se tal comportamento.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor à base de AChE (EE), na ausência e na presença da MC-LR- Condições operacionais: mediador eletroquímico: TCNQ; [ATChCl] = 2,5 mmolL⁻¹; pH = 7,2; tempo de corrida cronamperométrica: 55s. Condições operacionais: tempo de estabilização: 2 s; número de scans: 2; velocidade de varredura: 100mVs⁻¹.



As curvas de ativação relativa percentual relacionando concentração do analito e aumento da corrente, tanto para enzimas livres em solução quanto para biossensores, demonstraram um aumento da (AR%) proporcional ao aumento da concentração do analito, como podemos ver na Figura 24.

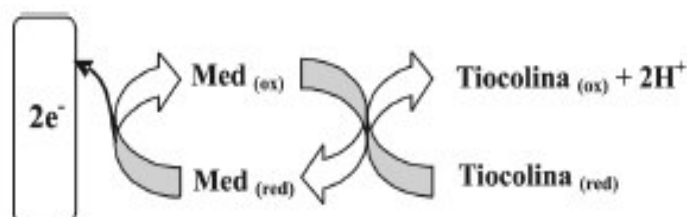
Figura 24. Sobreposição das curvas de ativação relativa (AR) para a enzima AChE(EE), proporcional a concentração da MC-LR.



Comparando-se as duas curvas de ativação, observa-se que aquela obtida com a enzima imobilizada apresentou melhor coeficiente de correlação linear. Resultado semelhante foi encontrado por GATANANTE, ESPIN e MARTY (2005), onde a proteína fosfatase (PP1A) foi inibida pela MC-LR em concentrações variando de 0,1 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os autores testaram a proteína fosfatase livre e também imobilizada em um biossensor serigrafado, cujo eletrodo de trabalho continha carbono e o mediador TCNQ e verificou-se que a proteína imobilizada mostrou melhores resultados de correlação estatística.

No caso do biossensor, o valor de ativação pode ser obtido pelo contato direto da enzima com o medidor eletroquímico na região de trabalho do eletrodo impresso, uma vez que o processo de imobilização permite esse contato. A presença do mediador no eletrodo de trabalho permite uma rápida transferência de elétrons, estando este ainda ligado diretamente à enzima, o que facilita o processo de captação e medida da corrente elétrica gerada (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

Figura 25. Detecção direta da tiocolina, utilizando mediador eletroquímico



Fonte: MARQUES e YAMANAKA, 2008.

A Tabela 17 fornece uma comparação em relação à performance e a sensibilidade dos ensaios de ativação utilizando a enzima livre ou imobilizada.

Tabela 17. Sensibilidade dos ensaios de ativação da AChE (EE) livre e imobilizada, pela MC-LR

Método	Curva	R ²	Faixa de trabalho μgL ⁻¹	LD μgL ⁻¹	LQ μgL ⁻¹
Enzima livre	Y = 3,22x + 15,53	0,968	0,5 a 40	0,62	2,07
Enzima imobilizada	Y = 3,9996x + 43,53	0,9995	0,5 a 100	0,27	0,91

LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação; n = 3.

A maior sensibilidade comprovada por menores valores de LD e LQ, foi observada para a enzima imobilizada. Essa maior sensibilidade também pode ser consequência do contato do mediador e eletroquímico com a enzima AChE. NUNES *et. al* (2008) em um estudo desenvolvido com enzimas AChE e BChE, utilizando biossensores serigrafados modificados com CoPC, obtiveram resultados com alta sensibilidade e boa seletividade em diferentes matrizes analisadas, com limites de detecção de 0,657 e 0,452 mmolL⁻¹, para os analitos carbaril e carbofuram, respectivamente. Neste caso, os autores exploraram a inibição enzimática para detecção desses inibidores. Utilizando o mesmo princípio da inibição relativa da AChE por agentes anticolinesterásicos, BUCUR *et. al* (2006) construíram um biossensor de elevada sensibilidade a um pesticida carbamato; o sensor foi construído com pasta de carbono modificada com TCNQ. Assim como no presente trabalho o potencial aplicado foi de 100mV_{vs}Ag/AgCl, e os autores obtiveram limites de detecção menores e mais precisos na presença do mediador.

Biossensores utilizando enzima PP1A livre e imobilizada para detectar MC-LR como os desenvolvidos por Gatanante, Espin e Marty, (2015) que originaram valores de LD 0,93 μgL⁻¹ e 0,52μgL⁻¹ utilizando a enzima PP1A livre e imobilizada respectivamente, bem como o biossensor desenvolvido por (CÂMPAS *et. al*, 2005) utilizando a enzima PP2A que apresentou LD 0,90 μgL⁻¹ assim, os biossensores desenvolvidos no presente trabalho mostraram-se mais sensíveis que os já descritos na literatura para detecção de MC-LR.

Além disso, no presente trabalho, o princípio empregado foi o da ativação enzimática, ainda bem pouco explorado no campo dos biossensores. Como em todo trabalho envolvendo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para detecção de contaminantes controlados, a sensibilidade é o parâmetro mais importante, além é claro da seletividade. O Ministério da Saúde, através da Portaria n° 2914, de 12 de dezembro de 2011, estabeleceu o valor de 1μgL⁻¹

como a concentração máxima admitida de microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público. Logo, o limite de detecção encontrado para o biossensor desenvolvido no presente trabalho utilizando a enzima AChE imobilizada, pode ser considerado excelente para o controle de resíduos do poluente MC-LR, uma vez que são menores do que valor máximo permitido pela legislação brasileira.

5.8 Exatidão do método

Os ensaios de fortificação resultaram em índices de recuperações variando entre 77,3 e 105,5% (Tabela 18). Tanto esses valores quanto os coeficientes de variação podem ser considerados adequados para a metodologia utilizando biossensores, pois se considera aceitável coeficiente de variação em torno de 20% para amostras em níveis traços, bem como recuperações na faixa de 70-120% (NUNES, 2011).

Tabela 18. Recuperações médias obtidas utilizando o biossensor otimizado*

Conc. MC-LR adicionada (μgL^{-1})	Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)
0,5	83,3	13,8
0,8	73,3	4,3
1,0	105,5	2,5
2,0	95	5,5
4,0	92	2,5

*Fortificação em água deionizada. n = 3.

5.9 Monitoramento da MC-LR em águas naturais utilizando o biossensor otimizado

A Tabela 19 mostra os valores de ativação da AChE, mediante uso de biossensores nos pontos amostrados no Rio Bacanga. Em geral, esses valores podem ser considerados baixos, pois encontram-se abaixo de 10%. Nesse trabalho, considerar-se-á o valor de 10% de ativação como sendo o limite, abaixo do qual se pode considerar o ambiente ainda não impactado pela presença de MC-LR. Isso posto, igualmente ao limite de 10% de inibição para a detecção de pesticidas inibidores das AChEs (SKLÁDAL, 1991).

Tabela 19. Ativações relativas determinadas nas amostras de água coletadas em diferentes pontos do Rio Bacanga, em São Luis, MA, utilizando o biossensor otimizado

AMOSTRA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
ATIVAÇÃO							
DIRETA (AR%)	0	0	0	0	0	1,51%	4%

Curiosamente, foi observada, em vez de ativação, uma **inibição** de 50% da atividade enzimática no ponto A3. Tal efeito pode estar relacionada à presença de pesticidas na água naquele ponto, ou mesmo outros inibidores, como metais pesados (SILVA, 2016), uma vez que a área apresenta pouca interferência da maré, mas sofre na realidade elevada interferência humana, em virtude da localização de moradias, presença de áreas de plantio, etc. Foi observada também uma ativação relativa percentual AR (%) de 4 % no ponto A7, área sem interferência da maré e reduzida interferência humana, o que indica possivelmente um início ainda insignificante de geração de MC-LR pelas cianobactérias presentes. Contudo, faz-se necessário um estudo mais detalhado para estabelecer a origem da inibição no ponto A3 e ativação no ponto A7.

Uma grande parte do Rio Bacanga é ocupada pelas construções e residências de tijolos e de taipa, bares e aterros para futuras ocupações. Logo, a ocupação desordenada, sem planejamento, associada à falta de aplicação dos dispositivos legais constantes na legislação ambiental vigente, ocasionaram significativas alterações do referido rio até os dias atuais, implicando ainda na presença de organofosforados afetando assim, o ecossistema local (COSTA *et. al*, 2014).

5.10 Resultados da caracterização Físico-Química das Amostras Ambientais

A Tabela 20 apresenta os valores de pH e salinidade das amostras coletadas no Rio Bacanga.

Tabela 20. Caracterização das amostras em valores de pH e salinidade

	pH	Salinidade
A₁	7,11	2,22%
A₂	7,0	1,95%
A₃	4,37	1,90%
A₄	5,5	1,95%
A₅	6,30	1,96%
A₆	7,05	0,125
A₇	7,11	0,50%

Verifica-se que as amostras A₁, A₂, A₅, A₆ e A₇ apresentam pH dentro da faixa considerada estável para a acetilcolinesterase. A amostra A₃ apresentou pH abaixo da faixa de estabilidade para a acetilcolinesterase pH < 6,9 o que pode ter contribuído para gerar inibição relativa e não ativação relativa. A amostra A₄ também apresentou pH abaixo da faixa de normalidade da acetilcolinesterase, porém em outros trabalhos como os de (SILVA,2016; SILVA, 2011; SANTOS e ZANELLO,2016) esse valor não contribuiu para gerar inibição relativa percentual, concordando com o presente trabalho, onde não houve inibição nem ativação relativa percentual, o que indica ser uma área sem contaminação aparente.

O ponto A₅ apresentou o pH 6,90, ou seja, dentro da faixa aceitável para a AChE, e não apresentou IR% nem AR%, conseqüentemente também parece estar livre de contaminação.

Os pontos A₆ e A₇ apresentaram uma ativação relativa percentual, porém abaixo de 10%, mas pode indicar a presença ainda diminuta de microcistina-LR. O pH 7,05 e 7,11,

respectivamente, descartam a possibilidade de inibição gerada pelo excesso de H^+ , uma vez que são valores ótimos para a catálise da AChE.

A legislação brasileira não dispõe a cerca dos valores de salinidade adequados, no entanto, alguns autores como SANTOS (2009) e VIDAL *et. al* (2005), relatam que este parâmetro resulta das características mineralógicas da região. As regiões A₂, A₃, A₄ e A₅ apresentaram valores de salinidade semelhantes (em torno de 1,9%), tendo a região A₃ apresentado inibição relativa diferindo das demais regiões que não tiveram nenhum tipo de atividade sobre a enzima AChE, demonstrando assim que a salinidade não influenciou significativamente nos resultados obtidos.

5.11 Fortificação e recuperação das amostras ambientais

Antes da realização de cálculos de recuperação das amostras A₁, A₂, A₄, A₅, foram encontrados os valores de ativação relativa percentual para cada nível de fortificação em triplicata. Os valores das médias das ativações relativas para cada amostra e para cada nível de fortificação estão representados na Tabela 21.

Tabela 21. Ativações relativas geradas pela fortificação das amostras ambientais

MC-LR	A ₁	A ₂	A ₄	A ₅
$\mu\text{g.L}^{-1}$	AR%	AR%	AR%	AR%
0,5	9,10	10,5	8,8	9,7
0,8	12	11	10	11,8
1,0	22,1	22,8	17	22,3
2,0	20,5	19,5	19	20
4,0	22	22,5	20	27,25

5.11.1 Recuperação das amostras ambientais

As Tabela 22 mostra os resultados oriundos dos testes de recuperação das amostras A₁, A₂, A₄ e A₅ em cada nível de fortificação.

Tabela 22. Recuperações obtidas nas amostras de água A₁, A₂, A₄, A₅ coletadas no Rio Bacanga, em São Luis-MA.

MC-LR $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperação AR %			
	A ₁	A ₂	A ₄	A ₅
0,5	84,1	87,5	73,3	80,83
0,8	80	73,3	66,6	76,6
1,0	100,45	103,6	77,27	101,36
2,0	97,6	92,8	90,4	95,2
4,0	88	90	80	90,1

Os pontos apresentaram bons valores de recuperação. O ponto A₄ apresentou valores mais baixos que 70% para a concentração de 0,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, porém para os outros níveis de fortificação os valores estão dentro da faixa aceitável. Pois se considera aceitável coeficiente de variação em torno de 20% para amostras em níveis traços, bem como recuperações na faixa de 70-120 (NUNES *et. al*, 2001). Esses valores mais baixos no ponto A₄ parecem estar relacionado ao pH da amostra menor que 6,9.

Podemos observar a relação entre as recuperações obtidas em água deionizada e as recuperações obtidas nas amostras A₁, A₂, A₄, A₅ através das curvas representadas nas figuras 26 a 28.

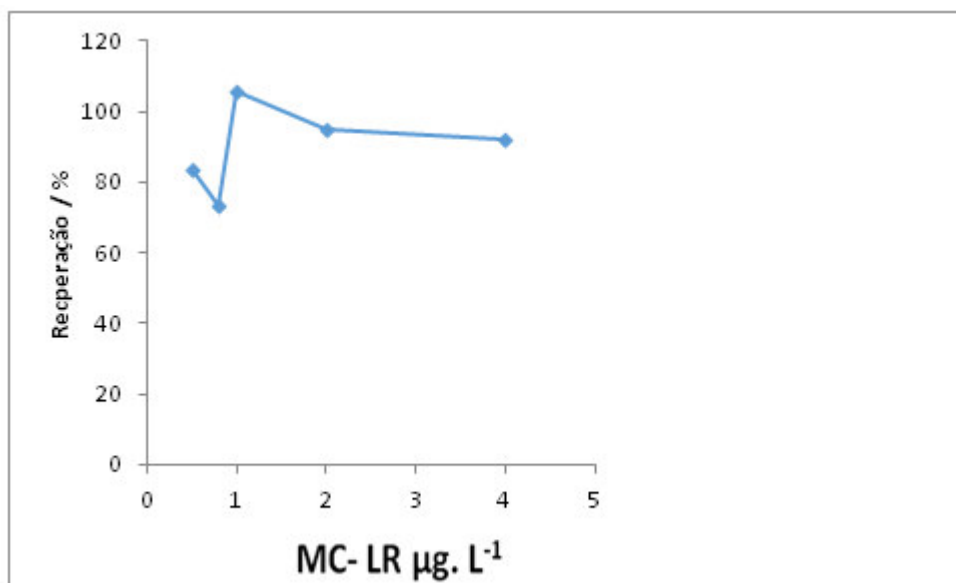
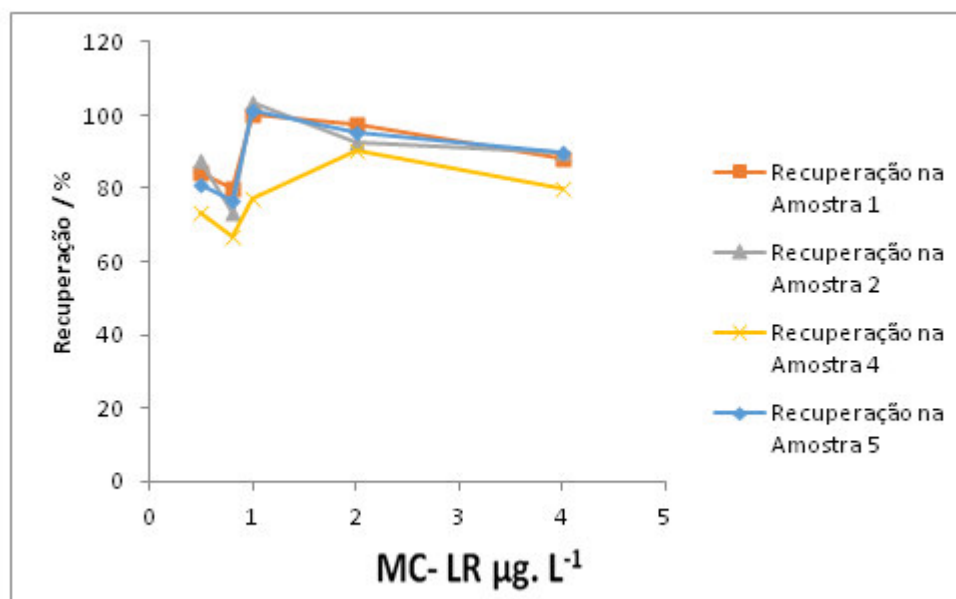
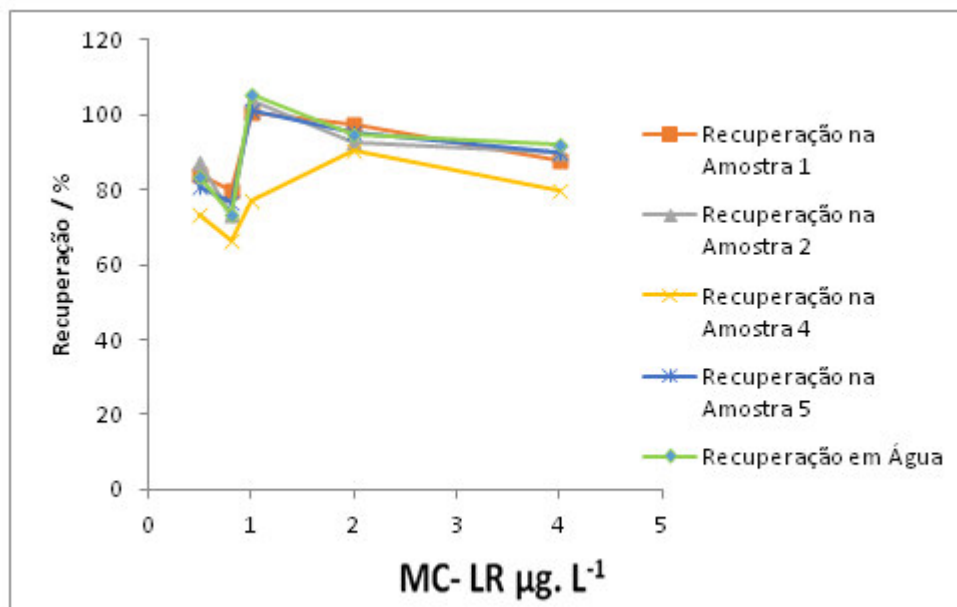
Figura26-Recuperações Obtidas em Água deionizada**Figura27-Recuperações Obtidas nas Amostras A₁,A₂,A₄,A₅**

Figura27-Sobreposição das Recuperações Obtidas com água deionizada e nas Amostras A₁,A₂,A₄,A₅ .



Pelas figuras 26 a 28, observou-se que não houve grandes variações nas recuperações obtidas nas amostras e na água deionizada, com exceção da amostra A₄ que apresentou valores menores de AR% como já discutido anteriormente. Isso pode ser gerado pelo seu pH menor que 6,9. Os resultados demonstram assim, pouca influência das propriedades da matriz da amostra sobre o processo envolvido na medida do sinal analítico.

Em trabalho realizado por Silva, (2016), com biossensores enzimáticos à base de Acetilcolinesterase para detecção de pesticidas, os autores observaram insignificante efeito matriz de águas subterrâneas também. Já a pesquisa realizada por FAYAD et. al,(2007) com cromatografia líquida para detecção de microcistinas, encontraram menores valores de recuperação em amostras coletadas em rio comparados aos valores de recuperação usando água deionizada dopada com o padrão de MC-LR.

Com base na literatura, pode-se considerar o método de detecção baseado no uso do biossensores aqui desenvolvido, um método de elevada exatidão.

6-CONCLUSÃO

O presente estudo objetivou desenvolver biossensores amperométricos à base da AChE para detecção de microcistinas, para desenvolvimento desse biossensor algumas condições operacionais, tais como potencial de trabalho, mediador eletroquímico, pH do meio e concentração do substrato, foram otimizadas. Utilizando o mediador tetracianoquinodimetano (TCNQ), em pH 7,2, foi possível realizar as medidas de corrente a um potencial de trabalho relativamente baixo (100 mV). Os ensaios de ativação enzimática revelaram que todas as enzimas testadas foram ativadas na presença da MC-LR, sendo que a enzima AChE-EE apresentou melhores resultados de AR % (>10 %), tendo sido obtidos valores de AR % diretamente proporcionais à concentração da MC-LR.

Os testes utilizando enzimas imobilizadas na superfície da região de trabalho de eletrodos impressos demonstraram melhores resultados do que aqueles realizados com a enzima livre em solução, uma vez que a imobilização da enzima AChE em contato direto com o mediador TCNQ conferiu ao biossensor um excelente desempenho, no que tange à sensibilidade e à velocidade das respostas cronoamperométricas, além de adequadas estabilidade e reprodutibilidade. Além disso, biossensor mostrou-se preciso coeficiente de variação (CV ~ 8,3%) e sensível limite de detecção e quantificação (Ld e LQ de 0,27 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,66 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente).

O biossensor desenvolvido foi empregado na detecção de microcistinas-LR em águas naturais, coletadas no Rio Bacanga, São Luis-MA. Foram obtidas adequadas recuperações médias, comprovando a eficiência na detecção destes contaminantes em amostras reais. Ressalta-se que nas áreas analisadas não foram observadas alterações que pudessem comprometer a qualidade dos ecossistemas.

De modo geral, o biossensor construído demonstra ser uma opção inovadora, já que opera por ativação enzimática na detecção de MC-LR. O biossensor é adequado para monitoramento ambiental, sendo ainda economicamente viável, em comparação com o custo envolvido na construção de biossensores à base de proteína fosfatase já descritos na literatura.

Esse trabalho representa uma contribuição à Química Ambiental, bem como aos órgãos oficiais de controle da saúde pública, já que os biossensores aqui desenvolvidos permitem detectar a presença de microcistinas em tempo real e com a compatibilidade exigida para esse tipo de avaliação. É, pois, uma contribuição com a qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, 2008, 25, 5, 835-841.

ALVERCA, E. et al, Morphological and ultrastructural effects of microcystinLR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line, **Toxicol**, 2009, 54, 3, 283.

AZEVEDO, S. M. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Consequências para a Saúde Pública. **Medicina On - Line**, 2014,1, 3, 1-16.

BERNARDI, J. C. Auto-organização no desenvolvimento de sensores, biossensores e modelos de membrana para aplicação em nanomedicina. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BISCHOFF, K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment, **Veterinary and Human Toxicology**, 2001, 43,5, 294 .

BON, E.P.S. ; FERRARA, M.A. ; CORVO, M. L. Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicação E Mercado. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2008, 369–385.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 39.

BRIAND, J. ; JACQUET, S. ; BERNARD, C. ; HUMBERT, J. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary research**, 2003, 34, 361–377.

BURCUR, B.; FOUNIER, D. ; DANET, A; MARTY, J-L; Biossensores basead on highly sensitive acetylcholinesterase for enhanced insecticides detection. **Analytica Chimica Acta** 2006, 115-121

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. Engenharia enzimatica, Lidel, 2003, 20 – 30.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed. 2003,80-95.

CAMPÀS, M. et al. Towards the protein phosphatase-based biosensor for microcystin detection. **Biosensor & Bioelectronics**, 2005, 20, 1520.

CASSINI, P.; WAGNER.; ANTUNES.P.; KELLER.R. Validação de Método Analítico livre de acetonitrila para análise de Microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, 2013, 36, 8, 1208-1213.

CAZENAVE, J. ; NORES, M.L.; MICELI, M.; DÍAZ, M.P.; WUNDERLIN, D.A.; BISTONI, M.A. Changes in the swimming activity and the glutathione-S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. **Water Research**. 2008, 42, 1299-1307.

CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. Produção e liberação de microcistinas em ritmo circadiano em *Microcystis aeruginosa* -Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012. 52 f. : il.

COSTA, L. G. F.; FURTADO, M.; C. M.; SILVA, J. F. ; SILVA, F. M. V. Simpósio de Geomorfologia/Regional Conference on Geomorphology. 2014

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**. 1998, 16, 1998, 953-962.

DELGADO, L.; CHARLES, P.; GLUCINA, K.; MORLAY, C. The removal of endocrine disrupting compounds, pharmaceutically activated compounds and cyanobacterial toxins during drinking water preparation using activated carbon--a review.- **Brazilian Journal of Biology**., 2015, 75, 2, 85-90.

DU, D.; WANG, M.; CAI, J.; TAO, Y.; TU, H.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing. **Analyst**, 2008, 133, 1790-1795.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**., 1961, 7, 88-95.

FAYAD, P.B. ;ROY-LACHAPELLE ,A. ; DUY, S.V. ; PRÉVOST, M. ; SAUVÉ. S.On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of cyanotoxins in algal blooms. **Toxicon**. 2015, 15;108:167-75

FONSECA, A. M: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- São Paulo, 2014. 112 f.

FRITSCH, R.S. ; KIST.L.W. ; BOGO , M.R. XII Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 03 a 07 de outubro de 2011.

GATANANTE, G. ; ESPIN, L. ; MARTY, J.L. Sentitive biosensor based on recombinant PP1a for microcystin Detection.**Biosensors and Bioelectronics**, 2015,67 , 700–716.

GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au– polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, 2009, 24, 2285- 2288.

GROSSE, Y. et al, "Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins", **Lancet Oncology**, 2006,7, 8, 628.

HARADA, K. et al, Structural determination of geometrical-isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by 2-Dimensional NMR spectroscopic techniques, **Chemical Research in Toxicology**,1990, 3, 473.

HARADA K.; TSUJI, K., Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment, **Journal of Toxicology-Toxicology Review**, 1998, 17, 385.

JAYARAJ, R.; ANAND, T.; RAO, P. V. L. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. **Toxicology**, 2006, 220, 36-146.

KAASALAINEN, U.; FEWER, D.P.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2012, 109, 5886-5891.

KAYA, K. Toxicology of Microcystins. **Toxic Microcystis**. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio,1996, 175-202.

KESTWAL, R. M.; BAGAL- KESTWAL, D.; CHIANG, B-H. Fenugreek hydrogel agarose composite entrapped gold nanoparticles for acetylcholinesterase based biosensor for carbamates detection. **Analytica Chimica Acta**. 2015, 886, 143–150.

KIST.L.W.; BOGO, R.M . Salão de Iniciação Científica –PUCRS, 05 a 08 de outubro de 2015

LEAL, A.C. Soares,M.C.P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2004,37,2

LEBOGANG, L. Capacitive sensing of microcystin variants of *Microcystisaeruginosa* using a gold immunoelectrode modified with antibodies, gold nanoparticles and polytyramine.**Analytica Chimica Acta**, 2014,826, 69-76.

LEFEBVRE, K.; POWELL, C. G.; DOUCETTE,J.; SILVER,P.; MILLER.P.;HUGHES, M. ; SILVER ,R. ; Tjeerdema d- Domoic acid-producing diatoms: probable cause of neuroexcitotoxicity in California sea lions-**Marine Environmental Research**,2000, 50, 485-488.

LEITE, C. M.; VERBINNEN, R.T.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S Desenvolvimento de biossensoresamperométricos à base de enzimas acetilcolinesterase geneticamente modificadas contendo uma macroalga estuarina para a detecção do inseticida paration metílico.**Cadernos de pesquisa**, 2013, 19, 128-137.

LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. ed. 5 São Paulo: Sarvier, 1989. Cap. 9.

LI, G.; CAI, F.; YAN, W.; LI, C.; WANG, J.; 2 . A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Toxicological Sciences**.2012, 127, 485-495.

LI, G., CHEN, J., XIE, P., JIANG, Y., WU, L., ZHANG, X., . Protein expression profiling in the zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the microcystin-LR. **Proteomics**, 2011. 11,10, 2003-2018.

LI, Y.; BAI, Y.; HAN, G.; LI. M. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2013,185, 706– 712.

LIMA.R.B. ; NUNES.G.S. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da aldeído desidrogenase e otomização do Biossensor. **Química Nova**, 2007, 30, 1, 9-17.

LIU .J. ; SUN. Y. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. **Toxicol Lett.** 2015 , 2, 236, 1, 1-7.

LONG,F.M. ; HE, A.N.; ZHU, H.C. ; SHI,M. Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples, Biosens. **Bioelectronica**, 2009, 24, 8, 2346-2351.

LOPES, I. C. Estudo eletroquímico e eletroanalítico da microcistina-LR e avaliação in situ da sua interação- Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa, 2011126f.

MAGALHÃES, V. F.; SOARES. R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin contamination in fish from Jacaré Paguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, 2001 ,39, 1077.

MANKIEWICZ,J.; TARCZYNSKA,M.; WALTER, Z.; ZALEWSKI. M. Natural toxins from cyanobacteria. **Acta Biologica Cracoviensia**, 2003, 2, 9-20.

MARQUES, P. R. B.; Yamanaka, O.H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova** **Química Nova**, 2008,31, 7, 1791-1799.

MARTINS.C.A. Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória- Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) -Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória . Espírito Santo, 2010.75f.

MELO, A, F; DESENVOLVIMENTO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS.. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.2008.75f.

MENDONÇA, C. D.; VERBINNEN, R. T.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Construção de biossensores amperométricos à base da enzima acetilcolinesterase contendo macroalga de ambiente

estuarino para a detecção do agente anticolinesterase paration metílico. **Caderno de Pesquisa**,2012, 19, 128-137, 2012.

MIKALSEN, B.; BOISON, G.; SKULBERG, O.M.;FASTNER, J.; DAVIES, W.; GABRIELSEN, T.M., Rudi, K., Jakobsen, K.S., 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in microcystis strains. **Journal of Bacteriology**,2003, 185, 2774-2785.

MULCHANDANI, P.; MULCHANDANI, A.; KANEVA, I.; CHEN, W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode, **Biosensors & Bioelectronics**,1998, 14, 77–85.

NUNES, G.S.; MONTESINOS, T.; MARQUES, P.B.O.; FOURNIER, D.; MARTY, J. L. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster* **Analytica Chimica Acta**,2001, 434, 1, 1-8.

NUNES, G. S. et al. Determinação de resíduos de inseticidas carbamatos em alimentos infantis utilizando biossensores amperometricos à base de enzimas acetilcolinesterase mutantes. **Acta Toxicológica Argentina**,2005,13, 2, 1-7.

NUNES, G. S. ; BADEA, M. ; MEDEL, M.L. ; NOGUER, T. ; MARTY, J. L. . Ultrasensitive biosensors for the detection of insecticide residues in fruit juices. **Bulletin of Transilvania University of Brasov**, 2008. 1, 29-36.

NUNES, G.S.; LINS, J.A.P.; SILVA, F.G.S.; ARAUJO, L.C.; SILVA, F.E.P.S.; MENDONÇA, C.D.; BADEA, M.; HAYAT, A.; MARTY, J.-L. **Design Chemosphere**, 2014, 111, 623–630.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurementof analytes implicated in food safety: a review. **Treds in Analytical Chemistry**, 2002, 21, 96-114.

PEREIRA, N. M. Desenvolvimento e aplicação de um biossensor à base da enzima acetilcolinesterase empregando NTCPM/CoTSPc para a determinação de pesticidas organofosforados. Dissertação de Mestrado, Diamantina, 2013. 80f.

QIU, T., XIE, P., LIU, Y., LI, G., XIONG, Q., HAO, L., LI, H. The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. **Toxicology**, 2009, 257, 86-94.

RICCARDI, C.S., COSTA, P.I., YAMANAKA, H. Imunossensores amperométricos. **Química Nova**, 2002, 25, 2, 316-320.

SANCHES, S.M.; VIEIRA, E.M.; PRADO, E.L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico- **Eclética Química**, 2007, 32, 4, 43-48.

SANTOS, J. M. M. Índice de qualidade de água subterrânea aplicado em área de aquíferos cristalinos com uso agrícola: Bacia do Rio São Domingos – RJ. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, 2009. 115f.

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

SHORT, S. B.; EDWARDS, W. C., Blue-green algae toxicosis in Oklahoma, **Veterinary Human Toxicology**, 32: 558, 1990

SKLÁDAL, P. Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. **Analytica Chimica Acta**, 1991, 252, 11-15.

SKOOG e WEST e HOLLER et al. Fundamentos de Química Analítica. 1 ed. Cengage learning, 2005.

SILVA, L. M. C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. 80f.

SILVA, F. G. S. Biossensores seletivos para detecção de pesticidas anticolinesterases em águas e alimentos. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2014.

SILVA, F.G.S.-Aliação da qualidade de solos e águas subterrâneas no Estado do Maranhão, em relação a alguns parâmetros físico-químicos e também à presença de pesticidas organofosforados - Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química 2016.72 f.

SINGH, S.; SRIVASTAVA, A.; OH, H.M.; AHN, C.Y.; CHOI, G.G.; ASTHANA, R.K. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. **Toxicon**, 2012, 60, 878–894.

SOARES, R.M.; YUAN, M.; SERVAITES, J.C.; DELGADO, A.; MAGALHÃES, V.F.; HILBORN, E.D.; Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Toxicol*, 2006, 21, 95-103.

VIDAL, L. ; CANALS, A. ; KALOGERAKIS, N. ; N.PSILLAKIS. **Journal of Chromatography**. 2005, 1089, 25–30.

WANG, J.; YOKOKAWA, M.; SATAKE, T.; SUZUKI, H. A micro IrOx potentiometric sensor for direct determination of organophosphate pesticides. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 2015, 220, 859–863.

WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H.; **Toxic Microcystis. Boca Raton – FL: CRC Press; 1996.**

WEI, M.; WANG, J. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 2015, 211, 290–296.

WU, Q.A.C. ; WEI, Y. B. ; LIU, C.A. ; LI, LIA, C. ; YU, L.A. ; ZHAO ,S.D. ; LI, G.A. ; Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo- **Environmental Pollution**, 2016, 213, 793-800.

ZENG, C.; SUN, H.; XIE, P.; WANG, J.H.; ZHANG, G.R.; CHEN, N.; YAN, W.; LI, G.Y. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, 2014, 149, 25-32.

ZHANG, X.; XIE. ; P.; LI. ; D.; SHI, Z.; Haematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. **Toxicol**, 2008, 49, 1150-1157

ZHAO, S.J.; LI, G.Y.; CHEN, J., 2015. A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring. **Journal of Proteomics**, 2015, 114,197-213.