

Desenvolvimento de um biossensor baseado em enzimas esterases de buriti immobilizadas em hidroxinitrato de zinco lamelar

Anelisse B. da Silva¹ (IC), Adriene M. Barboza¹ (PG), Ailton J. Terezo¹ (PQ), Fernando J. Quites¹ (PQ), Marilza Castilho¹ (PQ)*.

*mcterezo@ufmt.br

¹ UFMT- Universidade Federal do Mato Grosso . GENMAT- Grupo de Eletroquímica e novos Materiais, Departamento de Química, Campus Cuiabá.

Palavras Chave: biossensor, buriti, suporte lamelar.

Abstract

Biossensor based on buriti esterase immobilized on lamellar zinc hydroxide

This work describes the development of a new enzymatic biosensor by the physical adsorption of buriti esterase on lamellar support.

Introdução

Os biossensores baseados em enzimas da classe das esterases demonstram perspectivas quanto ao seu emprego para a análise de medicamentos anticolinesterásicos, baseado na resposta inibitória da atividade catalítica destas enzimas. Os hidroxissais lamelares são comumente utilizados como matrizes inorgânicas¹, e podem expandir seu espaço interlamelar com a imobilização de enzimas, melhorando suas propriedades físico-químicas e biológicas². Desta forma, foi utilizado o hidróxido de zinco lamelar como material de suporte para a imobilização do extrato enzimático das sementes do buriti, a fim de estabilizar e prover seu uso na construção de biossensores. O buriti, *Mauritia vinifera* está presente em várias regiões do Brasil, inclusive no cerrado mato-grossense, e sua semente apresenta elevado teor lipídico³, sendo selecionada como fonte natural de esterases. Neste trabalho o extrato da semente do buriti, foi imobilizado utilizando hidroxinitrato de zinco lamelar como suporte na construção do biossensor.

Resultados e Discussão

A atividade enzimática do extrato foi determinada por meio da hidrólise do *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA), catalisada pela enzima em tampão fosfato pH 7,0, apresentando um valor de 5,35 U (unidades de enzima por mL). Os biossensores foram preparados a partir de uma pasta de carbono contendo 52,9/5,9/11,8/29,4 (%m/m) pó de grafite/nanotubo de carbono (NTCs)/extrato enzimático imobilizado no suporte/nujol, respectivamente. A resposta do biossensor foi otimizada para o substrato *p*-NFA em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol L⁻¹ (0,1 mol L⁻¹ de NaCl, pH 7,0), por voltametria de onda quadrada (VOQ). Na superfície do biossensor a enzima esterase hidrolisa a quebra do substrato *p*-NFA formando o *p*-nitrofenol (*p*-NF), e este é reduzido eletroquimicamente em -0,9 V, como mostrado no voltamograma e mecanismo de redução da Fig 1(A). A eficiência da imobilização do extrato enzimático

(Fig.1A), bem como a incorporação dos componentes na pasta (Fig.1B) demonstra a melhora na resposta do biossensor para o substrato *p*-NFA.

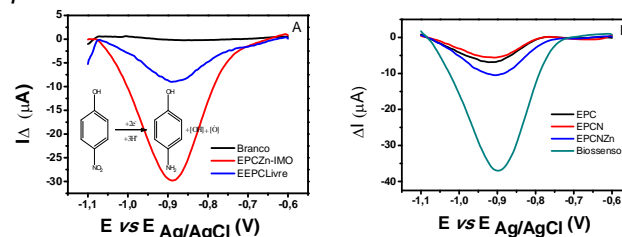


Figura 1. VOQ (A) branco, biossensor com enzima livre e enzima imobilizada (B) sensores EPC (pasta de carbono), EPCN (pasta de carbono e NTCs), EPCNZn (eletrodo de pasta de carbono, NTCs e suporte), Biossensor (pasta de carbono, NTCs, 0,5 U no suporte). Solução de *p*-NFA 5,0x10⁻⁴ molL⁻¹, tampão PBS.

Para a otimização da resposta do biossensor para o substrato *p*-NFA, vários parâmetros foram avaliados, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros otimizados da resposta do biossensor.

Parâmetros	Faixa investigada	Melhor resposta
pH	6,0 . 8,0	7,0
Frequência (Hz)	10,0 . 100,0	70,0
Amplitude de pulso (mV)	10,0 . 120,0	120,0
Incremento de potencial (mV)	1,0 . 5,0	2,0
Potencial de acúmulo (V)	-0,2 . -0,6	-0,4

Estudos de repetibilidade (N=10) mostraram um DPR de 6,08%. A estabilidade da resposta do biossensor para o substrato está sendo avaliada, e para as primeiras quatro semanas a resposta permaneceu dentro dos limites de controle estatístico.

Conclusões

O extrato enzimático foi imobilizado com sucesso no hidroxissal lamelar e associado aos NTCs levou a um eficiente biocatalizador. Estudos estão em andamento para a aplicação do biossensor na análise de fármacos anticolinesterásicos.

Agradecimentos

FAPEMAT (Processo n° 156587/2014), CNPq, CAPES.

¹ DEMEL, J.; et al *J. Phys. Chem.*, 2014, 118, 27131

² Quites, F.J. et. al. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 459, 194

³ Ribeiro, B. D. Dissertação de Mestrado- UFRJ-RJ, 2006.