UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

***Desenvolvimento de Métodos Analíticos em
Sistemas de Soluções em Fluxo Empregando
Polifenol Oxidase Naturalmente Imobilizada
Sobre Tecidos Vegetais***

ANTONIO WILLIAM OLIVEIRA LIMA

Tese de Doutorado

LÚCIO ANGNES

Orientador

ÁREA: QUÍMICA ANALÍTICA

SÃO PAULO
1998

“Desenvolvimento de Métodos Analíticos em Sistemas de Soluções em Fluxo Empregando *Polifenol Oxidase* Naturalmente Imobilizada Sobre Tecidos Vegetais”

ANTONIO WILLIAM OLIVEIRA LIMA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Prof. Dr. LÚCIO ANGHES

IQ - USP

(Orientador e Presidente)

Profª. Dra. SILVIA HELENA PIRES SERRANO

IQ - USP

Profª. Dra. IOLANDA DA CRUZ VIEIRA

UFSCar

Prof. Dr. KOSHUN IHA

ITA

Prof. Dr. MARIO CÉSAR UGOLINO DE ARAÚJO

UFPB

SÃO PAULO
17 DE JUNHO DE 1998

À minha AMA (Amada, Mulher e Amante)

Cristina Paiva de Sousa

Aos meus filhos presentes

Carissa, Cristine e Paulo José

Aos meus filhos ausentes mas sempre presentes

William Jº, Rebeca, Samantha, Shirley e Sheila

Aos meus pais

Francy e Antonio (in memoriam)

À Deus (tudo é possível)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Para aqueles que tentaram e não conseguiram atrapalhar-me.

Aos colegas de Laboratório.

Aos companheiros e camaradas da Biblioteca Central (Bene, Lau e Elias).

Às minhas amigas biblioteconomistas Adriana, Magda e Moema pelas contribuições e ajuda em livros e em referências bibliográficas.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP).

Aos Profs. Drs. Maria Encarnacion Suarez Iha, Jivaldo Matos e ao velho bom de guerra Luiz Pitombo que me convenceram a fazer este doutorado (como gostam de entrevistar).

À CAPES/PICD e ao Departamento de Tecnologia Química e Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (DTQA/CT/UFPb).

Aos Profs. Rui Oliveira Macedo (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB), Humberto Cordeiro de Melo, Walter Moreira Maia Jr., Artur Raimundo Diniz de Andrade e Raimundo Nonato Bezerra Granja (todos do DTQA/CT/UFPb), pelas substituições em nossas disciplinas.

Aos Profs. Drs. Jorge Masini (IQ/USP) e Jairo Pedrotti (Universidade Mackenzie) pelas críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Valberes B. Nascimento da Universidade Federal Rural de Pernambuco por permitir utilizar a fruta do coqueiro da baía como fonte enzimática para o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

Ao meu valete Eric Vidsiunas, companheiro de jornada e de injeções.

Ao Jailton e Francisco (Setor de Reprografia do IQ/USP) que com competência e paciência reproduziram esta tese.

Ao amigo Renato Camargo Matos (queria ter um filho assim).

Ao Prof. Paulo José de Sousa, Sra. Maria Dalva Paiva de Sousa, Dione Paiva de Sousa e Vítor Batista Paiva de Sousa pelo apoio e carinho imensuráveis aos meus filhos.

Ao Prof. Dr. Koshun Iha (você sabe o motivo).

Ao Prof. Dr. **Lúcio Angnes** que teve a audácia de me aceitar como seu orientando.

RESUMO

Esta tese apresenta o desenvolvimento de metodologias analíticas em sistemas de solução em fluxo com detecção amperométrica e espectrofotométrica explorando a utilização de tecidos vegetais como fonte enzimática para a biocatálise de reações. Desempenhos satisfatórios foram obtidos com a utilização do mesocarpo fibroso do coco (*Cocus nucifera*, L.) e com a casca e/ou polpa de frutos da palmeira leque (*Latania* sp), fontes de *polifenol oxidase*.

Uma metodologia, simples e rápida, para a determinação dos parâmetros bioquímicos da *polifenol oxidase* foi desenvolvida ao longo do presente trabalho com a enzima naturalmente imobilizada no tecido do coco, pela eliminação das etapas de extração e de purificação e associando-se análise em fluxo e espectrofotometria. Parâmetros cinéticos importantes como o efeito do pH, a constante de Michaelis-Menten (K_m), a velocidade máxima (V_{max}), a energia de ativação (E_a) e os parâmetros térmicos (valores D , z e Q_{10}) foram determinados utilizando como substrato o catecol. A atividade relativa junto a diferentes substratos e o efeito de inibidores foram também avaliados.

Aplicações envolvendo estes tecidos vegetais em reatores empacotados (associados com FLA) ou incorporados em eletrodos de pasta de carbono (medidas realizadas em batelada) para a determinação de produtos fenólicos como catecol, fenol e dopamina, inibidores da atividade enzimática como o sulfito, bem como para a quantificação do conteúdo de água, demonstram a sua versatilidade. Os produtos fenólicos foram quantificados com boa sensibilidade (na faixa de $\mu\text{mol L}^{-1}$) pela redução amperométrica das respectivas quinonas, produzidas pela oxidação enzimática. Aplicações com amostras reais, dentre as quais água de rio e resíduos de uma fábrica de papel puderam ser implementadas.

A determinação do conteúdo de água em meio aquo-restrito explorou a estimulação, pela água, da atividade catalítica da *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco na presença de catecol. Esta propriedade foi utilizada para a determinação rápida e reprodutível do conteúdo de água em amostras comerciais de álcool, utilizando acetonitrila como carregador.

A quantificação de sulfito baseou-se no seu efeito inibidor sobre a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada em relação à catálise oxidativa do catecol. Diversos interferentes comumente presentes em amostras de vinho foram também investigados.

Durante este trabalho, foi desenvolvida uma simples e interessante maneira de conservar o mesocarpo fibroso do coco como fonte de *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada. O tecido desta fruta foi desidratado e moído. O pó deste tecido, estocado a mais de dois anos à temperatura ambiente, ainda apresenta boa atividade enzimática.

ABSTRACT

The development of analytical methodologies exploring plant tissues as enzymatic source for biocatalysis of many reactions is presented in this thesis. Amperometry and spectrophotometry was associated with flow analysis for analytical purposes and for biochemical characterization of naturally immobilized polyphenol oxidase. Good performance was achieved with tissues from the fruits of two palm trees: the fibrous mesocarp of green coconut fruits, *Cocos nucifera*, L., and the skin and the pulp of green fruits from *Latania* sp. Both tissues are very effective in the biotransformation of *o*-diphenols to the corresponding *o*-quinones.

A simple, fast, and new methodology for the determination of the biochemical parameters of the *polyphenol oxidase* naturally immobilized on the fibrous tissue was developed (eliminating the extraction and purification of enzymes) by association of flow injection analysis and spectrophotometry. For coconut tissue, kinetic parameters like pH effect, Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum rate (V_{max}), activation energy (E_a) and thermal parameters (D , z and Q_{10} values) on catechol biotransformation were determined. Also the response for several substrates as too for various inhibitors was explored.

Amperometric quantification of phenolic compounds was made using the vegetal tissue in form of packed reactors (associated with FIA) or incorporated in carbon paste electrodes (measurements in batch). Very good response for catechol, phenol and dopamine was registered for this compounds, with very high sensitivity ($\mu\text{mol L}^{-1}$ range). Applicability to real samples as for river water and for a paper plant waste water was verified.

The same amperometry-FIA system was employed for enzymology in non-aqueous medium. The activity of the *polyphenol oxidase* contained in coconut tissues are strongly dependent of water. The strategy involves the stimulation by the content of water on the biocatalytic activity of the enzyme in the presence of catechol substrate. This strategy was used for the determination of water content in alcohol samples, in medium of dry acetonitrile.

The inhibition of the enzymatic activity produced by many compounds can be explored for an indirect quantification of the inhibitor. A flow injection amperometric procedure was developed

for the determination of sulphite ion based in its inhibitory effect on the activity of *polyphenol oxidase* on the oxidation of catechol. The effect on the bioreactor performance of potential interferents commonly present in wine samples were also investigated.

During this work, it was developed a simple and interesting way to preserve coconut tissue. The mesocarp of this fruit can be dried and grounded. These tissues still with very good activity after more than two years in “shelf temperature”.

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

A - ampère

cal - caloria

D - tempo de redução decimal ou tempo para reduzir de 10 vezes, em unidade de tempo

D_1 e D_2 - valores de **D** correspondentes às temperaturas **T_1** e **T_2**

DIECA - dietil-ditiocarbamato de sódio

DOPA - dihidroxí fenilalanina

E_a - Energia de ativação de uma reação

EIS - eletrodo íon seletivo

EPC - eletrodo(s) de pasta de carbono

EPCBM - eletrodo(s) de pasta de carbono biologicamente modificado(s)

EPCQM - eletrodo(s) de pasta de carbono quimicamente modificado(s)

FIA - Análise por injeção em fluxo

I - corrente

K_m - constante de Michaelis-Menten

log P - coeficiente de partição em um sistema bifásico

MFC - mesocarpo fibroso do coco

NADH - forma reduzida do NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídio)

POD - *peroxidase*

PPO - *polifenol oxidase*

Q_{10} - quociente entre as velocidades de reação entre duas temperaturas (uma temperatura 10° C mais baixa e a outra 10° C mais alta)

r - coeficiente de correlação

R - constante dos gases

S - substrato

STF - solução tampão fosfato

V - volt

v/v - volume/volume

Vis - visível

V_{max} - velocidade máxima

v_o - velocidade inicial

z - intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de uma transformação

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
1. Cinética Enzimática.....	7
1.1 Tempo de Reação.....	11
1.2 Efeito do pH Sobre a Ionização do Sítio Ativo.....	12
1.3 Efeito da Temperatura.....	12
1.4 Efeito da Força Iônica.....	18
1.5 Efeito de Ativadores.....	18
1.6 Efeito de Inibidores.....	19
1.6.1 Inibição Reversível.....	19
1.6.1.1 Inibição Competitiva.....	19
1.6.1.2 Inibição Não Competitiva.....	20
1.6.1.3 Inibição Incompetitiva.....	20

1.6.2 Inibidores Irreversíveis.....	20
2. Reações Enzimáticas Dependentes do Oxigênio.....	20
2.1 A Reatividade do Oxigênio.....	21
2.2 Polifenol Oxidase.....	22
2.2.1 Sinonímia.....	23
2.2.2 Ocorrência.....	23
2.2.3 Bioquímica.....	24
2.2.3.1 As Reações Catalisadas.....	24
2.2.3.2 Substratos.....	25
2.2.4 pH Ótimo de Atividade.....	26
2.2.5 Temperatura Ótima de Atividade.....	26
2.2.6 Estabilidade Térmica.....	28
2.2.7 Ativadores.....	29
2.2.8 Inibidores.....	30
2.2.8.1 Inibidores que Atuam Primariamente Sobre a Enzima.....	30
2.2.8.2 Compostos que Reagem com os Produtos da Re- ação ou Substratos.....	31
3. Biossensores.....	31
3.1 Considerações Iniciais.....	31
3.2 Desenvolvimento Histórico.....	32
3.3 Estrutura de um Biossensor.....	32
3.3.1 Transdutores Biológicos.....	34
3.3.2 Transdutores Físicos.....	35
3.3.2.1 Biossensores Potenciométricos.....	35

3.3.2.2 Biossensores Amperométricos.....	37
3.4 Evolução dos Eletrodos Enzimáticos.....	39
3.5 Sensores Enzimáticos.....	41
3.5.1 Biossensores Tissulares.....	41
3.5.1.1 Mecanismo de Resposta dos Biossensores Tissulares.....	45
3.5.1.2 Biossensores Baseados em Folhas.....	47
3.5.1.3 Biossensores Baseados em Flores.....	47
3.5.1.4 Biossensores Baseados em Bulbos e Inflorescência.....	47
3.5.1.5 Biossensores Baseados em Tubérculos / Raízes.....	48
3.5.1.6 Biossensores Baseados em Sementes e Grãos.....	48
3.5.1.7 Biossensores Baseados em Frutas.....	48
4. Características Operacionais e Limitações dos Biossensores.....	49
4.1 Tempo de Resposta.....	49
4.2 Vida Útil dos Biossensores Tissulares.....	50
4.3 Técnicas de Imobilização.....	50
4.4 Características Desejáveis de um Biossensor.....	50
5. Eletrodos de Pasta de Carbono.....	51
6. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos.....	55
6.1 Reações Enzimáticas em Meio Não-Aquoso.....	55
6.2 Fatores que Controlam a Atividade Enzimática em Solventes Orgânicos.....	57
6.2.1 Água.....	57
6.2.2 Solvente.....	59
6.2.3 pH e Alteração da Especificidade Enzimática.....	61
6.2.4 Estabilidade Térmica de Enzimas em Solventes Não-Aquosos.....	62

6.3 Aplicações Analíticas de Enzimas em Meios Não-Aquosos.....	63
6.3.1 Eletrodos Enzimáticos de Fase Orgânica.....	65
6.3.2 Análises em Bateladas.....	68
6.3.3 Reatores Enzimáticos que Operam em Sistemas Analíti- cos em Fluxo.....	68
III. MATERIAIS E MÉTODOS	70
1. Fontes Vegetais da Enzima.....	71
2. Soluções e Reagentes.....	71
3. Avaliação dos Parâmetros Cinéticos e Térmicos da <i>Polifenoloxidase</i> Natural- mente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco.....	72
3.1 Análise em Fluxo Contínuo com Detecção Espectrofotométrica.....	72
3.2 Limpeza do Sistema.....	72
3.3 Espectro de Absorção Molecular Uv-Visível	74
3.4 Efeito do pH na Atividade da <i>Polifenoloxidase</i>	74
3.5 Efeito da Temperatura na Atividade da <i>Polifenoloxidase</i>	74
3.6 Determinação da Atividade <i>Polifenoloxidase</i>	74
3.7 Efeito da Concentração de Substrato.....	75
3.8 Especificidade da <i>Polifenoloxidase</i> a Alguns Substrato.....	75
3.9 Efeito de Inibidores na Atividade da <i>Polifenoloxidase</i>	75
4. Determinação de Catecol e Outros Compostos Fenólicos, Conteúdo de Água e Sulfito.....	75
4.1 Análise Por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica.....	75
4.2 Reatores Empacotados.....	77
4.3 Procedimentos.....	77

4.4 Experimentos em Batelada.....	77
IV. TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....	79
IV.1 Determinação das Características Bioquímicas de <i>Polifenol Oxidase</i>	
Naturalmente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco Empregando	
Análise em Fluxo Contínuo com Detecção Espectrofotométrica.....	80
1. Introdução.....	81
2. Resultados e Discussão.....	83
3. Conclusões.....	102
IV.2 Bioreatores Tissulares para a Quantificação de Catecol Utilizando	
Sistemas em Fluxo com Detecção Amperométrica.....	103
IV.2.1 Utilização da <i>Polifenol Oxidase</i> Naturalmente Imobilizada no	
Mesocarpo Fibroso do Coco (<i>Cocos nucifera</i>, L.).....	104
1. Introdução.....	105
2. Resultados e Discussão.....	107
3. Conclusões.....	116
IV.2.2 Utilização da <i>Polifenol Oxidase</i> Naturalmente Imobilizada em	
Frutos da Palmeira Leque (<i>Latania</i> sp)	118
1. Introdução.....	119
2. Resultados e Discussão.....	119
IV.2.3 Biossensor Tissular para a Determinação do Conteúdo de	
Água em Meio Aquo-Restrito.....	132
1. Introdução.....	133
2. Resultados e Discussão.....	134
3. Conclusões.....	138

IV.2.4 Determinação Amperométrica de Sulfito Usando <i>Polifenol Oxidase</i> Naturalmente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco em Fluxo.....	139
1. Introdução.....	140
2. Resultados e Discussão.....	141
V. CONCLUSÕES.....	148
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	151
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
CURRICULUM VITAE.....	165

I. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas altamente especializadas, capazes de favorecer as reações químicas com extraordinária eficiência catalítica e elevado grau de especificidade por seus substratos. As peculiaridades deste comportamento tornam as enzimas reagentes de vital importância na natureza e de extensa aplicação prática na análise química.

A primeira utilização de enzimas como reagentes de rotina foi realizada por Setter em 1951. Desde então, sua utilidade como reagente analítico, não tem encontrado limite. O desenvolvimento de instrumentação e a crescente pesquisa neste âmbito têm possibilitado a solução de problemas analíticos em áreas tão diversas como a biotecnologia, meio ambiente, diagnósticos clínicos e no controle de processos químicos.

Alguns fatores têm contribuído para novas aplicações no uso de enzimas dentre as quais, podem ser destacadas, o melhor conhecimento de suas propriedades, a obtenção de sistemas enzimáticos com maior resistência à degradação e maior capacidade de catalisar as reações desejadas e, mais recentemente, o planejamento (com o auxílio de sistemas computadorizados) e a construção de novas enzimas têm desempenhado papel marcante neste campo.

Os biossensores associam tais aspectos com os conhecimentos gerados em áreas como química, física, biologia, tecnologia de membranas e microeletrônica. Um biossensor é constituído por um componente bioquímico (que converte o analito em uma nova substância ou modifica alguma propriedade física) e o físico, capaz de relacionar a concentração do analito em um sinal eletrônico, ótico ou similar, mensurável. Tal associação tem sido explorada, principalmente, de duas maneiras distintas: (1) na forma de eletrodos enzimáticos, onde a enzima encontra-se em íntimo contato com o eletrodo (imobilizada em sua superfície ou fazendo parte do material do eletrodo) e (2) na forma de reatores enzimáticos onde a enzima encontra-se imobilizada (naturalmente ou não) em um reator posicionado nas proximidades ao transdutor, geralmente associado a um sistema em fluxo.

A técnica de análise por injeção em fluxo (FIA), nos últimos anos, tem incorporado o uso de enzimas como ferramenta analítica para a determinação de numerosos compostos. Esta associação apresenta algumas propriedades ímpares advindas da seletividade proporcionada pelos biocatalisadores e as vantagens inerentes dos sistemas por injeção em fluxo, dentre as quais destacam-se rapidez, economia de reagentes e melhor reprodutibilidade.

Os sensores biocatalíticos que utilizam tecidos vegetais e que envolvem *oxidases* estão, particularmente, relacionados com transdutores eletroquímicos onde uma etapa de transferência de elétrons participa do ciclo natural da enzima redox. Estes materiais biocatalíticos oferecem uma alternativa para os biossensores baseados em enzimas isoladas ou de células microbianas. Em casos favoráveis, os sensores baseados em enzimas naturalmente imobilizadas, por se encontrarem em seu ambiente natural, mostram propriedades analíticas advindas da considerável estabilização da atividade enzimática, baixo custo, simplicidade de construção e redução dos requerimentos de cofatores. Acrescente-se o aumento de sensibilidade e seletividade quando combinados com sistemas em fluxo.

O controle ambiental de poluentes orgânicos, tais como os compostos fenólicos em efluentes de águas residuais, tem proporcionado o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas, sensíveis e seletivas. Fenóis podem ser determinados amperometricamente mediante oxidação eletroquímica direta. Entretanto, esta técnica, devido a utilização de potenciais anódicos elevados, propicia inúmeras reações interferentes, aumento de corrente residual e de ruído, além do rápido envenenamento do eletrodo. Para contornar estes obstáculos, tem-se demonstrado, experimentalmente, que os biossensores baseados em enzimas (*polifenol oxidase* - PPO, *lacase*, *peroxidase*) e integrados com transdutores amperométricos podem ser empregados na determinação destes compostos. Estes biossensores operam em potenciais próximos de 0,0 V (vs Ag/AgCl) onde são menos susceptíveis às reações interferentes. Eletrodos biologicamente modificados com estas enzimas, isoladas e purificadas, ou com tecidos vegetais que as contenham, têm sido usados para a detecção de catecol e compostos relacionados.

Neste trabalho, novos biossensores tissulares para catecol são propostos. Pela primeira vez, o mesocarpo fibroso do coco (*Cocos nucifera*, L.) - MFC, fonte natural e rica de PPO, foi utilizado, em um reator empacotado, objetivando monitorar compostos fenólicos. A PPO do coco catalisa a oxidação do catecol a *o*-quinona, como produto primário. Esta *o*-quinona pode ser monitorada eletroquimicamente em um sistema em fluxo e a resposta amperométrica relacionada quantitativamente à concentração de catecol. Diversos aspectos foram estudados dentre os quais a otimização dos parâmetros experimentais incluindo a configuração do bioreator e da célula amperométrica. Um extenso estudo de interferentes, estabilidade e a aplicabilidade deste sensor foi realizado para mostrar limitações e outras possibilidades de utilização deste material tissular.

Uma outra alternativa para a determinação de compostos fenólicos é a utilização dos tecidos

dos das frutas de uma palmeira (*Latania* sp), conhecida como palmeira-leque. Estas frutas contêm elevado conteúdo de PPO e foram exploradas amperometricamente de duas maneiras: em eletrodos de pasta de carbono e em reatores empacotados associados com FIA. Experimentos em batelada mostraram boa sensibilidade, boa estabilidade e um amplo intervalo de linearidade. A sensibilidade obtida é rara para este tipo de sensor.

A caracterização bioquímica da PPO naturalmente imobilizada no MFC foi realizada associando-se fluxo contínuo e espectrofotometria. O procedimento proposto neste trabalho constitui-se em uma nova maneira, simples e rápida, para o monitoramento contínuo da atividade de enzimas naturalmente imobilizadas, eliminando etapas inconvenientes da purificação e obtendo-se resultados mais representativos tendo em vista que as enzimas encontram-se no seu ambiente natural, não havendo alterações típicas sofridas quando do seu isolamento e purificação. Parâmetros como pH ótimo, estabilidade térmica, perda de atividade com a temperatura, energia de ativação e Q_{10} foram calculados utilizando-se como substrato o catecol. A influência de substratos fenólicos nas atividades *monofenolase* e *catecolase* da PPO presentes nesse tecido bem como a sua seletividade foram também explorados.

O uso de biocatalisadores capazes de serem também empregados em solventes aquo-restritos representa uma outra oportunidade para ser desenvolvida com os biossensores amperométricos. Os esforços correntemente realizados são, provavelmente, justificados pelas vantagens advindas da possibilidade da análise de compostos que são insolúveis ou parcialmente solúveis em água mas solúveis em solventes não-aquosos. Biocatálise na fase orgânica possui, além do monitoramento de substratos hidrofóbicos, vantagens tais como, a eliminação da contaminação microbiana, a redução de reações secundárias, o aumento da termoestabilidade e a facilidade de imobilização de enzimas baseada na insolubilização destas em solventes orgânicos.

Várias enzimas têm demonstrado atividade em solventes aquo-restritos. Dentre estas, a PPO tem revelado a sua versatilidade como biocatalisador em meio não-aquoso. Desta maneira, um novo sensor para quantificar o conteúdo de umidade foi desenvolvido utilizando também o MFC. A estratégia envolveu a estimulação, pela água, da atividade biocatalítica da PPO, imobilizada naturalmente, na presença de catecol como substrato. Assim, modificações no conteúdo de água induziu a bioconversão do catecol a *o*-quinona, que foi detectada, amperometricamente, em baixos potenciais. Esta propriedade foi explorada para a determinação rápida e reprodutível do conteúdo de água em álcool, em meio de acetonitrila, em fluxo. Este novo sensor tissular pode ser uma alternativa atraente para a quantificação do conteúdo de água, facilitando as operações no controle de qualidade e no monitoramento de proces-

sos.

A atividade da PPO de algumas fontes é diminuída por um considerável número de substâncias tais como agentes complexantes, agentes redutores, íons inorgânicos e substratos fenólicos análogos. Assim, PPO naturalmente imobilizada no MFC, pode ser empregada para a detecção de sulfito, substância amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos para prevenir oxidações e crescimento de microrganismos. O método baseia-se na diminuição do sinal de corrente obtido quando da oxidação do catecol pela PPO na presença de quantidades crescentes de sulfito.

Nas seções seguintes, os desempenhos de reatores empacotados e de eletrodos de pasta de carbono com a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco e na casca/polpa de frutos da palmeira-leque, serão discutidos em maiores detalhes.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1 Cinética Enzimática

As proteínas que, especificamente e com muita eficiência, catalisam as reações químicas nos sistemas biológicos são chamadas de enzimas. Elas possuem eficiência catalítica extraordinária, em geral, muito maior que aquela dos catalisadores sintéticos; possuem um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, ainda, funcionam em soluções aquosas ou aquo-restritas em condições de temperatura ambiente e de pH próximo à neutralidade, minimizando as modificações dos compostos durante a análise.

Devido a sua elevada sensibilidade e especificidade, as enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas na medicina, nas indústrias química, farmacêutica, de alimentos e na agricultura. Estas características são também de grande utilidade na análise química para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e na sua própria quantificação em materiais biológicos.

O uso rotineiro de enzimas em análises tem alcançado maior proeminência nas últimas duas décadas, devido a sua maior disponibilidade em estado de pureza adequado a preços razoáveis e ao seu emprego em sistemas analíticos convenientes. O advento de instrumentação apropriada e de novas técnicas analíticas, associadas às características inerentes das enzimas, tornaram as análises enzimáticas fáceis, rápidas, reprodutíveis e melhor aproveitadas.

Enzimas têm sido utilizadas com propósitos analíticos de duas maneiras:

(a) medindo-se a conversão total de um composto (substrato) a um determinado produto em um intervalo de tempo curto, usando-se uma quantidade em excesso de enzima. A concentração do substrato pode ser calculada através do produto formado ou do substrato que não reagiu (método do equilíbrio)¹ e

(b) através da medida da velocidade da reação (método cinético)^{1,2}.

No método b, a velocidade inicial é determinada através da formação do produto ou consumo do substrato. Esta velocidade pode ser relacionada ao parâmetro sob estudo: a concentração de enzima, do substrato, do inibidor ou do ativador. As concentrações destes reagentes juntamente com o pH, a temperatura e o sistema tamponante influenciam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Assim, estes parâmetros devem ser controlados, especialmente no método cinético, para que os resultados sejam precisos. Para que as medidas de velocidade sejam proporcionais à concentração do substrato, do ativador ou do inibidor, a reação catalisada por enzima deverá ser de primeira ou pseudo-primeira ordem com relação à espécie em estudo. Nestes casos, a veloci-

de de reação é proporcional à concentração de somente um reagente. Exemplos de reações de pseudo 1ª ordem são a hidrólise de um éster em solução aquosa onde a água, como solvente, está presente em excesso em uma concentração virtualmente constante ou quando um reagente é continuamente regenerado.

A especificidade de uma enzima é determinada pela sua capacidade de combinar-se estereoespecificamente com um composto (substrato) e catalisar a conversão deste a um produto. Isto pode ser descrito por

onde, E é a enzima, S é o substrato, ES é o complexo não covalente (o complexo de Michaelis-Menten) e P é o produto da reação.

A enzima, neste caso, não se modifica durante a reação; k_1 , k_2 , k_{-1} e k_{-2} são constantes específicas para as reações indicadas. Frequentemente, k_{-2} é zero e pode ser ignorada na reação, especialmente quando as velocidades iniciais são empregadas. As velocidades de formação e dissociação do complexo não covalente - ES (equação 1) são descritas pelas equações (2) e (3), respectivamente quando as seguintes definições e suposições são assumidas:

$[E_o]$ - concentração total de enzima; $[E]$ - concentração da enzima livre; $[S_o]$ - concentração total de substrato (supõe-se que tal concentração é muito superior a $[E_o]$; assim, assume-se que $[S] = [S_o]$ no início das medidas); $[ES]$ - concentração do complexo não covalente; $[P]$ - concentração de produto ~ 0 ; valor zero para k_{-2} e comportamento Michaelis-Menten (definido a seguir) para todo o sistema enzimático.

A velocidade de formação de ES é

$$\frac{dES}{dt} = k_1 [E] [S_o] \quad (2)$$

enquanto a velocidade de dissociação de ES é

$$\frac{-dES}{dt} = k_{-1} [ES] + k_{-2} [ES] \quad (3)$$

No equilíbrio, quando $dES/dt = -dES/dt$,

$$k_1 [E] [S_o] = k_{-1} [ES] + k_{-2} [ES] = (k_{-1} + k_{-2}) [ES] \quad (4)$$

A concentração da enzima livre $[E]$ não pode ser medida experimentalmente, mas pode ser

relacionada com a $[E_o]$ utilizando-se a equação da conservação da massa:

$$[E] = [E_o] - [ES] \quad (5)$$

Substituindo-se a equação (5) na equação (4) obter-se-á,

$$k_o \{ [E_o] - [ES] \} [S_o] = k_1 [E_o] [S_o] - k_1 [ES] [S_o] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (6)$$

O rearranjo da equação resultará,

$$k_1 [E_o] [S_o] = (k_{-1} + k_2) [ES] + k_1 [ES] [S_o] = [ES] \{ k_{-1} + k_2 + k_1 [S_o] \} \quad (7)$$

Evidenciando-se $[ES]$,

$$[ES] = \frac{k_1 [E_o] [S_o]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S_o]} \quad (8)$$

Dividindo-se o numerador e o denominador por k_1 , obtém-se,

$$[ES] = \frac{[E_o][S_o]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S_o]} \quad (9)$$

Na equação (9) encontram-se no denominador várias constantes de velocidade. Estas são definidas como k_m . Assim,

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (10)$$

Esta constante k_m , é chamada de constante de Michaelis- Menten. A substituição da equação (10) na equação (9), resulta em

$$[ES] = \frac{[E_o][S_o]}{k_m + [S_o]} \quad (11)$$

Como dito anteriormente, geralmente, a concentração do complexo não covalente - ES não pode ser determinada experimentalmente. Assim, a sua concentração é inferida pela equação da velocidade de formação do produto:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 [ES] = v_o \quad (12)$$

onde v_o é a velocidade observada nas condições iniciais. Por combinação das equações (11) e (12) obtém-se,

$$v_o = \frac{k_2 [E_o][S_o]}{k_m + [S_o]} \quad (13)$$

Assim, a velocidade máxima, V_{max} , é obtida quando todos os sítios ativos da enzima estão combinados com o substrato. Desta maneira, $[S_o] = [ES]$. Nestas condições,

$$k_2 [ES] = k_2 [E_o] = V_{max} \quad (14)$$

e

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{k_m + [S]} \quad (15)$$

Para uma determinada $[E]$, a velocidade inicial (v_o) aumenta com a $[S]$, até que se atinja a V_{max} . Quando os valores medidos de v_o são traçados contra os valores correspondentes de $[S]$, comumente obtém-se um gráfico hiperbólico característico (Figura 1) mostrando que, em baixos valores $[S]$, a v_o da reação é diretamente proporcional à $[S]$ (cinética de 1ª ordem) e para valores maiores de $[S]$, a velocidade se aproxima assintoticamente de V_{max} , onde toda a enzima está na forma complexada/saturada (cinética de ordem zero). Assim, V_{max} é a velocidade de formação máxima do produto quando a enzima está saturada com o substrato e k_m a concentração de substrato $[S]$ necessária para que $v_o = 0,5 V_{max}$. k_m é independente da $[S]$ e da $[E]$ porém é afetada pela natureza específica do substrato e enzima, do pH, da temperatura e por inibidores. V_{max} é independente da concentração do substrato mas é influenciada pela natureza específica do substrato, pela concentração de enzima, pelo pH e temperatura, e por certos tipos de inibidores.

Figura 1. Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.

A equação (15) pode ser transformada algebricamente em formas que são mais úteis na determinação prática de k_m e V_{max} . A anamorfose mais empregada é o método de Lineweaver-Burk (também chamado de gráfico duplo-recíproco). Este método utiliza o fato de que o inverso da equação de uma hipérbole retangular é a equação de uma linha reta. Tomando-se o inverso da equação de Michaelis, obter-se-á a seguinte equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (16)$$

onde o intercepto no eixo das abscissas é igual a $-1/k_m$ e o intercepto no eixo das ordenadas é igual a $1/V_{max}$ (Figura 2).

Figura 2. Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk.

1.1 Tempo de Reação

O conceito de velocidade inicial implica que as velocidades das reações enzimáticas são determinadas no tempo zero. Experimentalmente isto é impossível. A maioria dos métodos enzimáticos adicionam a enzima como último reagente e empregam técnicas de homogeneização normais para atingir, o mais rápido possível, o equilíbrio da reação. O tempo de reação para a forma-

ção do produto ou a utilização do substrato é, muitas vezes, superior a 10 s. Assim, o tempo mínimo de reação desejável para a obtenção de v_0 seria de 2 - 3 min e na grande maioria dos casos de 2 - 10 min. Alguns sistemas automáticos permitem o estudo do início e do curso de várias reações catalisadas por enzima de forma tão detalhada que a formação e o destino de intermediários de transição podem ser seguidos. Além disto, há a minimização de perdas por desnaturação e de contaminação por microrganismos que podem degradar ou inserir no sistema outras enzimas.

1.2 Efeitos do pH Sobre a Ionização do Sítio Ativo

A concentração de H^+ afeta a velocidade de reação de inúmeras maneiras. O processo catalítico usualmente requer que a enzima tenha os grupos ionizáveis do sítio ativo disponíveis para interação com o substrato. Valores baixos ou elevados de pH podem causar a desnaturação das enzimas, visto que a estrutura cataliticamente ativa da molécula protéica depende do caráter iônico dos aminoácidos laterais. O pH no qual se tem máxima atividade enzimática é diferente para distintas enzimas e, freqüentemente, reflete a $[H^+]$ do ambiente onde a enzima foi obtida. Deve-se enfatizar que o pH ótimo é, muitas vezes, um parâmetro operacional dependente da natureza do substrato, tampão, tempo de reação, temperatura, natureza do cofator, entre outros. No uso de enzimas para análise não é necessário que a reação seja realizada no pH ótimo. Entretanto, é essencial que o pH, durante a reação, seja mantido constante e empregado sempre nas diversas determinações. Neste pH, a enzima deve ser razoavelmente estável e deve permitir uma velocidade de reação compatível ao sistema enzimático sob análise.

1.3 Efeito da Temperatura

A velocidade das reações catalisadas por enzimas são influenciadas pela temperatura e dois fatos se contrapõem. Primeiro, com o aumento da temperatura, um patamar máximo na velocidade é alcançado devido ao número de moléculas que ganham energia suficiente para ultrapassar a barreira energética e formar os produtos da reação e segundo, a elevação dessa temperatura, acarreta a diminuição da velocidade de reação devido a desnaturação da enzima.

Mesmo quando as concentrações dos reagentes são mantidas fixas, uma reação se realiza com diferentes velocidades a distintas temperaturas. Isto significa que a magnitude da constante de velocidade depende da temperatura. A relação entre o valor da constante de velocidade e a temperatura absoluta é definida pela equação de Arrhenius,

$$k = A e^{-E_a / RT} \quad (17)$$

onde, k = constante de velocidade, T = temperatura em K, R = constante dos gases, A é uma constante e E_a é uma segunda constante denominada “energia de ativação” da reação. A E_a é um obstáculo energético bastante real para a reação e cuja magnitude certamente determina a velocidade da reação.

A equação (17) pode ser também escrita sob forma logarítmica como

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (18)$$

ou

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2,303R} \cdot \frac{1}{T} \quad (19)$$

que mostra que o logaritmo da constante de velocidade é proporcional ao inverso da temperatura absoluta. Estas são as equações da linha reta obtidas ao traçar-se $\log k$ contra $1/T$. A inclinação desta linha é igual a $-\frac{E_a}{2,303R}$ (Figura 3); como $2,303R$ é igual a $4,576 \text{ cal mol}^{-1} \text{ grau}^{-1}$ o valor da E_a pode ser determinado a partir do gráfico de Arrhenius como sendo igual a $-(\text{inclinação} \times 4,576) \text{ cal mol}^{-1}$.

Figura 3. Determinação da energia de ativação de uma reação traçando-se $\ln k$ contra $1/T$ (K).

A equação de Arrhenius mostra a grande sensibilidade da velocidade de uma reação à variações de temperatura, pois, como a relação entre k e T é exponencial, uma pequena variação no valor de T provoca uma grande variação no valor de k e, portanto, uma grande variação na velocidade de reação. Do mesmo modo, a relação exponencial entre k e E_a explica porque uma variação aparentemente pequena da energia de ativação de uma reação refletir-se-á em uma grande alteração de sua velocidade. A relação é tal que uma ligeira diminuição de E_a provoca um considerável aumento no valor de k .

Muitas reações catalisadas por enzimas possuem E_a entre 6 000 e 12 000 cal mol⁻¹. Isto, em termos práticos, significa que a velocidade de reação aumentará de 1,41 a 2,0 vezes por cada incremento de 10° C na temperatura. Entretanto, esta relação só é mantida para um intervalo limitado, pois as enzimas em altas temperaturas são desnaturadas ocorrendo uma depleção da concentração efetiva do biocatalisador. Desta maneira, a velocidade de uma reação de inativação pode aumentar 100 vezes com um incremento de 10° C na temperatura. Por esta razão, as reações catalisadas por enzimas, para propósitos analíticos, devem ser restritas ao intervalo de temperatura onde a enzima é estável.

Outros parâmetros térmicos podem ser utilizados para demonstrar a influência da temperatura sobre a atividade enzimática tendo em vista que, nas reações enzimáticas, a velocidade de conversão é proporcional à concentração dos reagentes podendo ser descrita matematicamente da mesma maneira que uma reação química unimolecular ou bimolecular de primeira ordem.

Assim,

$$-\frac{dC}{dt} = kC \quad (20)$$

ou

$$\frac{dC}{C} = kdt \quad (21)$$

onde, C = concentração do reagente decomposto, k fator de proporcionalidade, $-dC / dt$ velocidade na qual a concentração diminui.

Integrando a equação (21) entre limites, concentração C_1 no tempo t_1 e concentração C_2 no tempo t_2 , tem-se:

$$-\int_{c_1}^{c_2} \frac{dC}{C} = k \int_{t_1}^{t_2} dt \quad (22)$$

$$-\ln C_2 - (-\ln C_1) = k(t_2 - t_1) \quad (23)$$

então

$$k = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1} = \frac{2,303}{t_2 - t_1} \log \frac{C_1}{C_2} \quad (24)$$

Esta última equação pode ser modificada para dar

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{C_0}{C} \quad (25)$$

ou

$$t = \frac{2,303}{k} \log \frac{C_0}{C} \quad (26)$$

onde C_0 = concentração inicial do reagente e C = concentração após um certo intervalo de tempo t de reação.

Para a inativação de enzimas pelo calor um tratamento similar pode ser aplicado. Assim, descrever-se-á a seguir as curvas de inativação térmica que relacionam o log do tempo de inativação em função da temperatura e definir-se-á os parâmetros que serão utilizados.

O primeiro destes parâmetros é o valor D ou valor de redução decimal que se define como o tempo necessário para inativar, a uma temperatura constante, 90% da atividade enzimática original ou, dito de maneira diferente, é o tempo requerido para a curva atravessar um ciclo logarítmico³. Para a curva de atividade enzimática após tratamento térmico (Figura 4), a representa atividade máxima da enzima sem que a mesma sofra desnaturação a uma determinada temperatura (comparável a C_0 na equação 26) e b representa a atividade enzimática remanescente (comparável a C na mesma equação) após um tempo t de aquecimento. Então:

$$t = \frac{2,303}{k} \log \frac{a}{b} \quad (27)$$

Se este tempo é representado por D (tempo de redução decimal ou tempo para reduzir de 10 vezes a atividade da enzima), a inclinação desta curva pode ser expressa como

$$\frac{\log a - \log b}{D} = \frac{1}{D} \quad (28)$$

Substituindo na equação geral de uma linha reta obtém-se,

$$\log a - \log b = \frac{1}{D} t \quad (29)$$

ou

$$t = D(\log a - \log b) = D \log \frac{a}{b} \quad (30)$$

em que t = tempo de aquecimento, D = tempo necessário para diminuir em 90 % a atividade enzimática em um sistema isotérmico, a = atividade enzimática inicial, b = atividade enzimática remanescente após um tempo t de aquecimento.

Figura 4. Atividade remanescente de uma enzima em função do tempo de aquecimento, à temperatura constante.

Comparando as equações (25) ou (26) com a equação (30), torna-se óbvio que

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (31)$$

Outro parâmetro relacionado com a resistência da enzima à temperatura é o valor “ z ”. O valor z representa o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de uma transformação. O valor z pode ser calculado utilizando os valores de D obtidos em diferentes temperaturas versus a temperatura em que a reação se verificou (Figura 5). Considerando qualquer parte desta curva, a inclinação pode ser expressa como se segue:

$$\frac{\log D_2 - \log D_1}{z} = \frac{1}{z} \quad (32)$$

e esta equação geral pode ser convenientemente escrita como se segue

$$\log D_2 - \log D_1 = \frac{1}{z}(T_1 - T_2) \quad (33)$$

onde, D_2 = valor D correspondente à temperatura T_2 e o tempo necessário para inibir ou destruir 90 % da atividade da enzima quando exposta à temperatura T_2 e D_1 = valor D correspondente à temperatura T_1 e o tempo requerido para inibir ou destruir 90 % da atividade da enzima quando exposta à temperatura T_1 . As temperaturas T_1 e T_2 normalmente são expressadas em graus Fahrenheit.

Figura 5. Resistência relativa de uma enzima em diferentes temperaturas.

Outra forma de representar a influência da temperatura sobre a velocidade de reação é o valor Q_{10} que corresponde ao quociente entre as velocidades de reação ao modificar a temperatura em 10° C:

$$Q_{10} = \frac{\text{ValorT}}{\text{ValorT} - 10^\circ \text{C}} \quad (34)$$

Na maior parte dos processos químicos o valor de Q_{10} situa-se no intervalo de 2 - 3. Este valor pode ser relacionado com a equação de Arrhenius da seguinte maneira:

$$Q_{10} = e^{10E_a/RT} \quad (35)$$

Em condições adequadas, a E_a é independente da temperatura enquanto Q_{10} varia com esta. A equação (35) comprova a assertiva realizada na fl. 15 acerca da duplicação da velocidade de uma reação e do aumento de 100 vezes na velocidade de uma reação de inativação quando do incremento de 10° C.

1.4. Efeito da Força Iônica

A presença de vários sais pode afetar a velocidade de reação através do deslocamento do equilíbrio de formação do complexo ativado ou pelas eventuais combinações com os reagentes. O primeiro é chamado efeito salino de primeira classe e pode ser calculado através da equação:

$$\log k = \log k_0 + z_A + z_B \mu + (k_A + k_B - k^*) \mu \quad (36)$$

onde, k = constante de velocidade de reação; k_0 = constante de velocidade na ausência de substâncias estranhas; z_A, z_B = carga dos íons A e B ; μ = força iônica; k_A, k_B, k^* = coeficientes empíricos de A, B e do complexo ativado, respectivamente.

O efeito salino de segunda classe se deve à diminuição da concentração efetiva de um dos reagentes devido a formação de íon complexo, de precipitado, ou ao deslocamento do equilíbrio iônico de um ácido ou base fraca envolvido na catálise.

1.5 Efeito de Ativadores

Ativadores são substâncias (cofatores) empregadas para ativar ou aumentar a eficiência de conversão da enzima. Os cofatores podem ser orgânicos (piridoxal fosfato ou NAD^+) ou inorgânico (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}). Algumas enzimas têm sua atividade reduzida na ausência de certos compostos (α -amilase na ausência de íons cloreto). A atividade de enzimas alostéricas pode ser aumenta-

da pela ligação de outros compostos (que não é o substrato), em diferentes locais do sítio ativo da enzima. Assim, sempre que a velocidade de uma reação enzimática é aumentada de uma maneira reprodutível por adição de um composto, a extensão deste incremento pode ser usada na determinação da concentração deste composto (ativador). O princípio desta determinação é demonstrado abaixo:

onde k_d é a constante de dissociação para o complexo $E * \text{Ativador}$.

1.6 Efeito de Inibidores

Um inibidor é qualquer composto que, quando adicionado a um sistema enzimático, diminui a velocidade de reação. As inibições de enzimas podem ser de dois tipos: reversíveis e irreversíveis. Inibidores reversíveis se ligam às enzimas através de ligações não covalentes. A diluição do complexo enzima-inibidor resulta na dissociação da ligação reversível e recuperação da atividade enzimática. Inibidores irreversíveis reagem com uma enzima de modo tal que a diálise subsequente não restaura sua atividade catalítica. Alguns inibidores irreversíveis atuam formando ligações covalentes com grupos específicos de enzimas.

1.6.1 Inibição Reversível

Três grupos de inibidores reversíveis podem ser distinguidos por seus efeitos característicos sobre a enzima e esta distinção pode ser realizada com o auxílio do gráfico dos valores de $1 / v_0$ versus $1 / [S]$. Estes grupos são:

a) Inibidores competitivos: alteram sua inclinação mas não mudam seu intercepto no eixo $1 / v_0$.

b) Inibidores não-competitivos: alteram tanto sua inclinação quanto o intercepto no eixo $1 / v_0$.

c) Inibidores incompetitivos (ou aparentemente competitivos): alteram seu intercepto no eixo v_0 mas não sua inclinação.

1.6.1.1 Inibição Competitiva

Este tipo de inibição ocorre quando o inibidor concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima e, em geral, a reação não ocorre enquanto o inibidor estiver ligado à enzima. Durante o tempo em que o inibidor ocupa o sítio ativo, a enzima não pode converter o substrato em produ-

tos. Os inibidores competitivos são, quase sempre, compostos cujas estruturas moleculares lembram a do substrato e combinam-se com a enzima para formar um complexo enzima-inibidor. O incremento da concentração do substrato diminui a probabilidade de se ligar uma molécula do inibidor com a enzima e assim, a reação apresentará um V_{max} normal. Entretanto, o valor aparente de k_m estará aumentado na presença do inibidor.

1.6.1.2 Inibição Não Competitiva

Inibição não competitiva ocorre quando o inibidor e o substrato se ligam em sítios ativos diferentes da enzima. O inibidor não competitivo pode se ligar tanto com a enzima livre como com o complexo ES , não permitindo assim que a reação ocorra. Neste tipo de inibição tem-se a diminuição da V_{max} da reação e não ocorre, geralmente, nenhuma interferência no valor de k_m da reação enzimática.

1.6.1.3 Inibição Incompetitiva (ou Aparentemente Competitiva)

Um inibidor incompetitivo também se liga a um sítio da enzima diferente daquele que se liga o substrato. Entretanto, um inibidor incompetitivo ligar-se-á apenas ao complexo ES (o inibidor não competitivo liga-se tanto à enzima quanto ao complexo ES).

1.6.2 Inibidores Irreversíveis

Inibidores irreversíveis são aqueles que se combinam com um ou mais grupos funcionais na molécula da enzima e que são essenciais para a sua atividade. A reação entre enzima e inibidor é progressiva, realizando-se a uma velocidade definida pela constante de velocidade desta reação de ligação irreversível.

2 Reações Enzimáticas Dependentes do Oxigênio

A redução sequencial do oxigênio (O_2) por um, dois ou quatro elétrons e a formação de espécies ativadas do oxigênio (H_2O_2) são catalisadas pelas *oxidases*. Ao contrário das *oxigenases* que catalisam a incorporação de um ou dois átomos de O_2 nas moléculas orgânicas (AH_2) com a simultânea quebra de uma dupla ligação carbono-carbono (reações 38, 39), as *oxidases* produzem a abstração de elétrons do substrato (AH_2) sem a adição de O_2 em AH_2 , atuando o O_2 molecular como aceptor de elétrons (reação 40).

2.1 A Reatividade do Oxigênio

As enzimas são necessárias para catalisar as oxidações biológicas, visto que o oxigênio, apesar de sua eletronegatividade (na tabela periódica encontra-se próximo ao flúor e, na diagonal, ao cloro), é pouco reativo frente aos compostos orgânicos. A lenta velocidade de oxigenação dos compostos orgânicos comparada com a da cloração é devida à alta energia de ativação necessária para ativar o estado tripleto do O_2 , em que se encontra normalmente. Neste estado, os dois elétrons desemparelhados têm spins paralelos, de tal forma que as restrições de spin dificultam a redução da molécula de O_2 . A presença de dois elétrons desemparelhados na molécula de O_2 se deve a existência de somente seis elétrons de valência em cada átomo de oxigênio, com a necessidade de que um elétron se coloque nos orbitais de igual energia $2p\pi$. As restrições de spin advindas do estado fundamental do O_2 podem ser superadas por uma das três formas seguintes: a) por adição de elétrons, de um em um; b) por coordenação com metais de transição e c) pelo deslocamento de um dos elétrons desemparelhados ($2\pi^*$) a um orbital de maior energia com inversão do spin para produzir o oxigênio singlete.

O oxigênio singlete não é um radical livre mas sim uma espécie altamente eletrofílica com dois orbitais moleculares vazios que pode reagir facilmente com grupos de densidade eletrônica alta, como por exemplo, as ligações duplas presentes nos carotenóides e nos ácidos graxos insaturados.

A redução univalente do oxigênio tripleto origina a formação do ânion radical superóxido, o ânion peróxido e subseqüentemente a dois ânions óxidos da água:

Na Tabela I estão indicados os potenciais redox para a formação das distintas espécies reduzidas do oxigênio. Devido a seus elétrons extras, as espécies reduzidas do oxigênio podem atuar também, teoricamente, como redutoras. Por exemplo, o radical superóxido reduz o ferricitocromo *c*, o nitroazul de tetrazólio ou o tetranitrometano. Por outro lado, esse radical é também um poderoso agente oxidante capaz de oxidar ascorbato, vitamina E, fenóis e sulfito.

TABELA I Potenciais redox para a redução do oxigênio.

O_2	+	e^-	$\longrightarrow$	O_2^*	$E_o = - 0,45 \text{ V}$				
O_2^*	+	e^-	$\longrightarrow$	H_2O_2	$E_o = + 0,98 \text{ V}$				
H_2O_2	+	H^+	+	e^-	$\longrightarrow$	H_2O_2	+	HO^*	$E_o = + 0,38 \text{ V}$
HO^*	+	H^+	+	e^-	$\longrightarrow$	H_2O	$E_o = + 2,33 \text{ V}$		

Fonte: George⁴.

Muitas enzimas implicadas na transferência de elétrons ao oxigênio ou aos peróxidos são metaloenzimas que podem conter um único e bem definido centro ativo ou múltiplos centros redox. A função como cofator dos metais presentes nessas enzimas está baseada em suas propriedades redox, na sua capacidade de doar elétrons para formar inúmeras ligações metal-oxigênio e em sua capacidade de formar quelatos. As metaloenzimas que contêm ferro ou cobre atuam, quase que exclusivamente, por transferência de um único elétron devido ao número limitado de estados de valência estáveis destes metais. As que possuem molibdênio, provavelmente as que contêm manganês e as flavinas dependentes, podem permitir a transferência de dois elétrons. As enzimas, como a *xantina oxidase*, que têm múltiplos centros redox ativos com molibdênio, flavinas e dois grupos Fe-S, requerem seis elétrons para a redução completa mesmo que possam existir estados intermediários de oxidação durante a aceção e a doação de elétrons pela enzima.

O acúmulo de informações proveniente de estudos espectroscópicos⁵ de metaloenzimas purificadas, complexos enzima-substrato e enzima-inibidor e de compostos modelos, associados com a cristalografia de raios X tem permitido esclarecer, a nível molecular, o mecanismo pelo qual as enzimas purificadas transferem os elétrons. Na Tabela II estão indicados alguns exemplos da distribuição de metais de transição nas *oxidoreductases*.

2.2 Polifenol Oxidase (PPO)

Polifenol oxidase (PPO) é ubíqua na natureza e pode ser encontrada em inúmeras frutas e hortaliças. A atividade primária desta enzima está associada ao escurecimento enzimático e na geração de “flavors” desagradáveis em produtos hortifrutícolas enlatados ou congelados. Como resultado, uma quantidade considerável de dados tem sido acumulada sobre suas propriedades catalíticas e moleculares como também do papel que exerce no ciclo de vida das plantas e na tecnologia de alimentos.

TABELA II. Metais como componentes do centro ativo de *oxidases* e *oxigenases*.

GRUPO / ÁTOMOS	EXEMPLOS DE ENZIMAS			
Grupos	<i>Peroxidase</i>	<i>Catalase</i>	<i>Citocromo oxidase</i>	<i>Sulfito oxidase</i>
Hemo Fe				
Átomos de Fe	<i>Lipoxigenase</i>	<i>Prostaglandina ciclo oxigenase</i>	<i>Superóxido dismutase</i>	
Átomos de Cu	<i>Superóxido dismutase binuclear com Zn</i>	<i>Polifenol oxidase</i>	<i>Ascorbato oxidase, Lacase</i>	<i>Citocromo oxidase binuclear com Fe</i>
Átomos de Mn	<i>Superóxido dismutase</i>			
Átomos de Mo	<i>Xantino oxidase</i>	<i>Sulfito oxidase</i>	<i>Aldeído oxidase</i>	<i>Nitrogenase</i>
Átomos de Se	<i>Glutathione peroxidase</i>			

2.2.1 Sinonímia

O nome trivial “*polifenol oxidase*” tem sido aplicado imensamente na literatura para denotar duas diferentes enzimas. Ambas estão registradas no Enzyme Nomenclature⁶ sob o número 1.14.18.1. com o nome sistemático de *monofenol, dihidroxifenilalanina: oxigênio óxido redutase*. Entretanto, elas são diferentes com respeito à especificidade de substrato. Uma delas oxida compostos fenólicos com grupos OH na posição *orto* ou vicinais (3,4,5-trihidroxí). É também capaz de agir sobre os monofenóis convertendo-os em *o*-dihidroxifenóis. Alguns nomes triviais dessa enzima - *tirosinase*, *cresolase*, *catecol oxidase*, *fenolase*, *o-difenol oxidase* - ainda são utilizadas na literatura e se referem ao principal substrato onde elas atuam. A outra enzima, a *lacase*, oxida uma grande variedade de substrato incluindo monofenóis, trifenois e ácido ascórbico como também *o*- e *p*-difenóis.

2.2.2 Ocorrência

Como dito anteriormente, a PPO está amplamente distribuída na natureza. Em adição a sua ocorrência generalizada em plantas, ela pode ser encontrada em microrganismos, especialmente em fungos e também em alguns órgãos animais. O conteúdo de PPO de diferentes plantas varia extensamente com a espécie ou cultivar.

A localização da enzima nas células da planta (em cloroplastos, em frações subcelulares, mitocôndrias), depende da espécie, da idade e da maturidade. A sua distribuição, em diferentes partes das frutas e hortaliças, pode ser consideravelmente distinta, variando com o desenvolvimento da planta. O conteúdo de PPO pode ser, também, consideravelmente afetado pelas condições de crescimento impostas às plantas^{7,8}.

2.2.3 Bioquímica da PPO

2.2.3.1 As Reações Catalisadas

PPO é uma enzima que contém cobre e catalisa duas reações inteiramente diferentes: (a) a hidroxilação de monofenóis aos correspondentes *o*-dihidroxifenóis e (b) a oxidação de *o*-dihidroxifenóis a *o*-quinonas. As reações requerem oxigênio molecular.

Preparações enzimáticas de diferentes fontes vegetais podem possuir essas duas atividades em proporções distintas⁹. As relações de atividades oxidante / hidroxilante variam de 1 - 10 até > 40. Estas variações se devem, provavelmente, a modificações verificadas durante o isolamento e a purificação ou a tratamentos por métodos físicos. A atividade de hidroxilação pode, muitas vezes, ser totalmente perdida.

A reação de hidroxilação em um substrato monofenólico inicia-se após um período de inércia que pode ser reduzido ou inteiramente eliminado por pequenas quantidades de *o*-dihidroxifenóis ou agentes redutores. Este período de indução não é verificado em homogenatos de frutas e hortaliças onde *o*-dihidroxifenóis estão sempre presentes.

Uma característica interessante da PPO é a sua parcial inativação durante a reação. Este fenômeno é atribuído a ação das quinonas produzidas que se ligam covalentemente com a enzima nas proximidades do sítio ativo¹⁰.

A quantidade do grupo prostético da enzima é de quatro átomos de Cu por molécula da PPO de cogumelos e um átomo por molécula na PPO de *Vicia faba*^{11,12}. A hidroxilação requer Cu na forma cuprosa que é fornecido na etapa de desidrogenação. Isto poderia explicar a eliminação do período de indução por *o*-dihidroxifenóis ou agentes redutores. A remoção, total ou parcial, do cobre leva à inativação ou à redução de atividade da enzima que pode ser restaurada por adição de íons cúpricos⁹.

2.2.3.2 Substratos

Frutas e hortaliças contêm uma grande variedade de compostos fenólicos. Entretanto, somente alguns destes compostos são substratos da PPO. Os substratos naturais mais importantes da PPO são as catequinas, ésteres do ácido cinâmico (ácido clorogênico, ácido cafeico), 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA) e a tirosina.

L-DOPA é o produto da hidroxilação da tirosina quando catalisada pela PPO. Tirosina, sendo um fenol e ao mesmo tempo um aminoácido constituinte de proteínas é encontrado, praticamente, em quase todos os tecidos vegetais. Entretanto, PPO de algumas fontes (ex., maçãs) pode hidroxilar o *p*-cresol, não atuar sobre tirosina e oxidar DOPA¹³.

O sítio de substituição de mono- e dihidroxifenóis é um fator importante do ponto de vista de atacabilidade da PPO. Monofenóis são hidroxilados somente se eles têm um grupo CH_2 - *p*-substituído e os 3,4-dihidroxifenóis *p*-substituídos são melhor oxidados que os 2,3-dihidroxifenóis¹⁴. Substituintes na posição 3 (3-metil catecol, ácido 2,3-dihidroxi benzóico, ácido 2,3-dihidroxifenil sulfônico) provocam uma diminuição na afinidade da enzima pelo substrato, provavelmente devido a efeitos estéricos. A presença de um grupo doador de elétrons na posição 4 (como no ácido clorogênico, 4-metil catecol) aumenta a reatividade do substrato enquanto um grupo que retira elétrons (como no 4-nitro catecol, ácido 3,4-dihidroxi benzóico, 3,4-dihidroxi benzaldeído) reduzem-na¹⁵. A natureza dos *p*-substituintes também afeta a velocidade de oxidação¹⁶. Destes resultados pode-se concluir que a velocidade de oxidação é governada por um estágio eletrofílico e que o fenol, provavelmente, é oxidado na sua forma ceto^{15,16}.

Com relação à especificidade, a PPO de tecidos animais é relativamente específica para a tirosina e DOPA¹⁷, enquanto as enzimas de plantas superiores e fúngicas atuam em inúmeros substratos mono- e *o*-difenílicos. Geralmente, o substrato mais adequado para a PPO é um composto fenólico que não se encontra no tecido vegetal de sua origem. Alguns substratos fenólicos da PPO de várias fontes estão registrados na literatura e são mostrados na Tabela III.

A afinidade da PPO por um dado substrato varia dentro de certos limites, mesmo se iso-enzimas da mesma origem são consideradas. Estas diferenças podem ser devidas, em grande parte, a fatores estéricos associados à diferenças na estrutura protéica. De acordo com alguns autores²⁵ nenhuma relação deve ser encontrada entre os valores de k_m e V_{max} obtidos de substratos diferentes com uma dada preparação de PPO. Normalmente, a afinidade da PPO pelos substratos fenólicos é relativamente baixa. Desta maneira, o k_m é alto, usualmente em torno de 1 mmol. Entretanto, há

registros de afinidades elevadas de PPO de algumas fontes vegetais (tubérculos de batata, algodão e banana), com um excepcional k_m da PPO de *Papaver somniferum* igual a 1 μmol . Valores de k_m para os substratos fenólicos mais comuns de algumas fontes vegetais são mostrados na Tabela IV.

TABELA III. Principais substratos da *polifenol oxidase* de algumas fontes vegetais.

Fonte	Substratos (em ordem decrescente)	Referência
Abacate	4-metil catecol, dopamina, catecol, pírogallol	18
Ameixa	Ácido clorogênico, catequina, ácido cafeico, catecol, DOPA	19
Banana	Dopamina	20
Cogumelo	Catecol, DOPA, dopamina	21
Cenoura branca	DOPA, catecol, tirosina	22
Pêra	Ácido clorogênico, catecol, catequina	23
Maçã (cloroplastos)	4-metil catecol, ácido clorogênico, DOPA, epicatequina, ácido cafeico	24

2.2.4 pH Ótimo de Atividade

O pH ótimo de atividade da PPO varia com: (a) a fonte da enzima; (b) com o substrato; (c) o tipo de tampão e (d) com a sua pureza, em um intervalo de pH relativamente amplo (geralmente, entre pH 4,0 e 7,0)³⁹. Isoenzimas podem ter também distintos pH ótimos. Preparações enzimáticas obtidas da mesma fruta ou hortaliça em estágios de maturidade diferentes podem diferir com relação ao pH ótimo. Além do substrato, o pH ótimo pode ser distinto entre os gêneros e cultivares, como se mostra na Tabela V. A variabilidade de dados observada nesta tabela deve-se, provavelmente a uma purificação insuficiente da enzima.

2.2.5 Temperatura Ótima de Atividade

A temperatura ótima de atividade da PPO depende essencialmente dos mesmos fatores relacionados com o pH ótimo. A atividade da PPO de pêssegos (var. Redhaven) aumenta de 3° até 37° C e declina em temperaturas superiores a 45° C. A 3° C a atividade diminuiu 50% em relação ao valor máximo. Em damascos a enzima alcançou um máximo de atividade a 25° C⁴⁸, em bananas a 37° C⁴⁹. A energia de ativação da reação catalisada pela PPO de banana, quando calculada a partir

da dependência de atividade com a temperatura, foi de 18,6 kJ mol⁻¹ (aproximadamente 4,5 kcal mol⁻¹), tendo catecol como substrato. De quatro cultivares de uva, a temperatura ótima situou-se entre 25° - 30° C e 10° - 15° C, respectivamente^{29,36}.

TABELA IV. Valores de k_m da *polifenol oxidase* para vários substratos de fontes distintas.

Substrato	k_m (mmol . L ⁻¹)	Fonte da Enzima	Referência
Ácido clorogênico	1,66	Maçã (cloroplasto)	26
	16,1	Pêra (Bartlett)	27
	1,20	Damasco	28
	2,50	Uva	29
	0,01	Batata (casca)	25
	1,40	Batata (tubérculo)	30
	0,22	Cogumelo	31
Ácido cafeico	0,63	Maçã (cloroplasto)	26
	0,50	Damasco	28
	5,50	Uva	29
	2,10	Batata (tubérculo)	30
Catecol	4,60	Maçã (Red Delicious flesh)	32
	20,9	Pêra (Bartlett)	27
	120	Pêssego (Fay Elberta)	33
	29,0	Pêssego (Redhaven)	34
	15,0	Pêssego (Halford)	35
	2,40	Damasco	28
	3,06	Uva	29
	67	Uva (Concorde)	36
	13	Ameixa	19
	0,11	Batata (casca)	25
	4,80	Batata (tubérculo)	30
	1,68	Berinjela	37
	4	Berinjela	38
	22	Cogumelo	31
	8	Pêra (Bartlett)	27
4- metil catecol	1,40	Damasco	28
L-DOPA	11,8	Batata (tubérculo)	30

Em maçãs da variedade Jonathan e Starking, máxima atividade da PPO sobre ácido clorogênico foi obtida em 30° C e 25° C, respectivamente. Com batatas, a PPO tem um máximo de atividade a 22° C com catecol como substrato; com pirogalol, um aumento linear na atividade foi verificada entre 15° e 35° C⁴⁸.

TABELA V. pH ótimos de atividade de *polifenol oxidases* de algumas fontes vegetais.

Fonte	pH ótimo	Observações	Referência
Abacate	5,3 - 6,7	4 metil catecol, DOPA	40
Banana	6,0 - 7,0	formas ativas diferentes	41
Berinjela	5,0 - 5,2	catecol	38
	6,8	catecol	37
Batata	5,8	catecol	42
Batata doce	6,1 - 7,0	frações enzimáticas diferentes	43
Cogumelo	5,5 - 7,0	catecol	44
	6,0 - 7,0	p-cresol	44
Manga	6,5 - 7,0	frutas frescas e irradiadas	45,46
Pêra	6,2	var. Bartlett	47
Pêssego	5,9 - 7,2	var. diferentes; catecol	33,34,35
Uva	6,2 - 7,0	ácido clorogênico; catecol; catequina, pirogalol	29
	5,9 - 6,3		36

2.2.6 Estabilidade Térmica

PPO não é uma enzima termo-estável. Exposições curtas, do tecido vegetal ou em solução, em temperaturas entre 70° - 90° C são, em muitos casos, suficientes para a destruição, parcial ou total, de sua atividade catalítica. Exposições abaixo de zero podem também afetar sua atividade.

A termo-tolerância de PPO depende, principalmente, da fonte da enzima e do pH. Quando PPO encontra-se nos tecidos vegetais, naturalmente imobilizada, o tamanho da partícula, além dos fatores já mencionados, pode influenciar consideravelmente a eficiência de sua inativação térmica.

A PPO de maçã é completamente inativada, em pH 5,0, em temperaturas acima de 70° C. Sua meia-vida nesta temperatura é de 12 min e a atividade é completamente destruída a 80° C. O valor *D* para purê de maçã a 75° C foi de 0,24 min e o valor *z* de 10° C^{50,51}.

Entre as frutas com caroço, a PPO de pêssegos possui a menor termo-estabilidade enquanto a de ameixas é a mais termo-resistente. Os valores *z* da PPO variaram de 8,5° a 15° C e inativação instantânea (cerca de 6 s) foi conseguida em 89,5° a 110° C.

PPO foi encontrada, por muitos autores, tendo mais termo-estabilidade em suco do que na polpa de uma dada fruta⁵² enquanto outros observaram o contrário⁵³. Em geral, o cultivar e a localidade do cultivo das frutas podem influenciar a estabilidade térmica⁵⁴ assim como diferentes formas moleculares de PPO da mesma fonte podem possuir termoestabilidades distintas.

Estudos sobre inativação térmica da PPO de banana revelaram uma cinética de desnaturação de primeira ordem no intervalo de 42° a 80° C. Abaixo de 42° C a enzima foi muito estável em pH 6,0; uma hora de exposição nesta temperatura acarretou apenas a perda de 8% de sua atividade. No intervalo de 42° a 72° C, a energia de ativação da reação de inativação foi de 77 kJ mol⁻¹ (18,4 kcal mol⁻¹) e no intervalo de 72° a 80° C, 355 kJ mol⁻¹ (85 kcal mol⁻¹). Os valores de Q_{10} e as modificações de entropia foram também muito mais elevados no último intervalo, mostrando que modificações acentuadas na estrutura da proteína (da enzima) ocorrem somente acima de 70°C. Dados termodinâmicos foram similares no intervalo de pH de 5,0 a 8,0⁴⁹. Completa inativação da PPO de banana pode ser atingida pela exposição a 80° C por 15 min.

2.2.7 Ativadores

Detergentes aniônicos (ex., dodecil sulfato de sódio) são capazes de reativar PPO de preparações mitocondriais de cascas de maçãs após inativação por polivinilpirrolidona (PVP)⁴¹ além de também ativarem a PPO latente de preparações parcialmente purificadas ou cruas obtidas de diversos cultivares de abacate⁵⁵. Uréia também ativa as formas latentes de PPO de vagens, aumentando especialmente a sua ação sobre os monofenóis. A adição de íon Cu²⁺ aumenta a atividade enzimática da PPO de rabanete enquanto tratamento similar não tem nenhum efeito sobre a PPO de batata^{56,57}.

Apesar da ausência de trabalhos sistemáticos sobre ativação de PPO de diferente fontes, uma possível explicação para ativação da PPO por estes compostos seria a associação ou a dissociação de proteína envolvida no processo⁵⁸. A forma ativa da PPO parece ser um oligômero de um monômero enzimático contendo cobre e o papel do ativador seria promover a enzima a um grau de polimerização essencial para atividade biológica. O efeito dos substratos e/ou adição do íon prostético devem ser melhor compreendidos.

A atividade enzimática pode ser induzida também por outros fatores, tais como elementos traços de fertilizantes, agentes promotores do amadurecimento⁵⁹ ou tratamentos físicos como a radiação ionizante⁶⁰. Nestes casos, a ativação não tem sido comprovada, visto que o efeito pode estar associado ao incremento da síntese de proteína enzimática na planta; eliminação de um inibi-

dor natural (ex., por complexação com o íon metálico do grupo prostético); modificações na estrutura do substrato ou na permeabilidade da parede celular. Os diferentes fatores estimulantes nem sempre são conhecidos e algumas vezes não são fáceis de serem distinguidos.

2.2.8 Inibidores

2.2.8.1 Inibidores que Atuam Primariamente Sobre a Enzima

Como a PPO é uma metaloproteína (cobre é o grupo prostético), ela pode ser inibida por agentes complexantes/quelantes tais como cianeto, monóxido de carbono, dietil-ditiocarbamato de sódio (DIECA), mercaptobenzotiazol, dimercaptopropanol, azida sódica, EDTA, ou metil xantato de potássio. Alguns destes reagem também com as quinonas formadas. O ácido ascórbico pode também atuar diretamente sobre a enzima quelando o seu grupo prostético. Diferenças podem ser encontradas na ação desses inibidores sobre a PPO dependendo de sua origem (de cloroplastos, de mitocôndrias ou da fração solúvel).

Ácido benzóico e alguns ácidos cinâmicos são os mais competitivos inibidores da enzima. Estes compostos são capazes de inibir a PPO competindo com o substrato pelo mesmo sítio ativo da enzima. Uma inibição do tipo não competitiva é verificada entre estas substâncias e o O_2 . O cianeto, por sua vez, mostra um comportamento inverso: concorre com o oxigênio pelo grupo prostético da enzima e inibe a PPO por inibição do tipo não competitiva. Isto pode ser interpretado como o resultado da existência de dois sítios distintos de ligação do substrato na molécula enzimática, um dos quais possui uma alta afinidade por compostos aromáticos, incluindo substratos fenólicos, enquanto o outro, que provavelmente contém o cobre, pode se ligar com agentes complexantes e oxigênio⁶¹. Inibição do tipo competitiva por ambos os substratos pode ser conseguida com o 2,3-naftalendiól e diacetil.

Inibição por haletos tem sido demonstrada para PPO de várias fontes. A inibição é pH-dependente e pode ser causada pela formação de um complexo entre o íon haleto e o cobre, o qual é estabilizado em meio ácido.

Outros inibidores que atuam na enzima: moléculas pequenas de peptídeos que interagem com o cobre; polímeros solúveis tais como polivinilpirrolidona que atuam como inibidor competitivo; tioglicolato que reage com a enzima e com os substratos da PPO da cana de açúcar; o 2,3-naftalendiól, inibidor competitivo específico da PPO e que não atua sobre a *lacase*,

tornando possível a distinção entre elas.

2.2.8.2 Compostos que Reagem com os Produtos da Reação ou Substratos

Estes podem ser divididos em dois grupos: (1) agentes redutores que atuam sobre as quinonas formadas reduzindo-as aos *o*-dihidroxi fenóis que as originaram. Alguns compostos deste grupo são: ácido ascórbico, SO₂, sulfito de sódio, metabissulfito de potássio, 2-mercaptoetanol, 2-mercaptobenzotiazol, tioglicolato; (2) substâncias como cisteína, glutathione, ácido benzeno sulfônico, DIECA, etil xantato de sódio são, entre outras, capazes de se ligarem com as quinonas formando compostos estáveis, sem cor. Os compostos que contêm grupos -SH podem também reagir com o cobre.

3 Biossensores

A especificidade inerente das moléculas biológicas e a sua associação com transdutores adequados são freqüentemente exploradas para o desenvolvimento de biossensores analíticos. As técnicas analíticas convencionais, apesar de precisas, possuem a desvantagem como alto custo e a necessidade de pessoas treinadas. Os biossensores, devido a sua especificidade, baixo custo, facilidade de manipulação e sinal contínuo em tempo real, podem apresentar vantagens em muitos casos. Neste item, o desenvolvimento histórico, os princípios, a evolução dos vários tipos de sensores biológicos, suas exigências, aplicações potenciais e suas vantagens serão apresentados. Ênfase será dada aos biossensores de tecidos vegetal, com enzimas naturalmente imobilizadas.

3.1 Considerações Iniciais

Um dos mais importantes problemas em Química Analítica é o desenvolvimento de métodos sensíveis e seletivos que possam ser utilizados para solucionar questões associadas com os eventos biológicos. O uso de enzimas, anticorpos e receptores (em preparações ou em materiais que as contenham) para solucionar estes problemas analíticos tem propiciado uma nova faceta nesta área - a dos métodos analíticos sem uso de reagentes químicos.

Os recentes avanços em biotecnologia (maior conhecimento das biomoléculas e suas interações) e nas áreas da eletrônica e dos detectores (o aperfeiçoamento de elementos transdutores) têm acelerado o desenvolvimento de dispositivos analíticos capazes de proporcionar informação seletiva, rápida e direta, acerca da composição química de uma dada matriz. Destes dispositivos, os mais utilizados são os sensores (bio)químicos, denominados de biossensores.

3.2 Desenvolvimento Histórico

Quando Sorensen⁶², em 1900, propôs o conceito de pH, não imaginava que, com base neste parâmetro, os primeiros sensores poderiam ser desenvolvidos para a determinação potenciométrica da $[H^+]$ em amostras biológicas.

O desenvolvimento de sensores (bio)químicos, nos primeiros estágios, esteve associado à eletroquímica e por esta razão a contribuição de Heyrovsky⁶³ foi extremamente importante pela aplicação de técnicas polarográficas para medir o oxigênio em fluidos biológicos. O desenvolvimento do primeiro microeletrodo de oxigênio por Davies e Brink Jr.⁶⁴, em 1942, foi um marco nos estudos de biossensores. Free e Free⁶⁵ abriram um caminho para a simplificação do procedimento analítico quando utilizaram tiras-teste descartáveis com enzimas. Entretanto, os reagentes não podiam ser reutilizados. Somente com Clark Jr.⁶⁶, em 1956, eletrodos revestidos com uma membrana sensível ao O_2 foram empregados como biossensores no diagnóstico clínico e no controle ambiental.

Os estudos de Clark Jr.⁶⁶ para a quantificação indireta de glicose no sangue, utilizando um eletrodo de oxigênio para a medida do O_2 consumido na reação com *glicose oxidase*, pode ser considerado como o primeiro biossensor devido a combinação direta de um receptor biologicamente ativo e um dispositivo eletrônico.

A oclusão da *glicose oxidase* em um gel de poliacrilamida proporcionou a estabilidade operacional da enzima e simplificou a operação do sensor⁶⁷. Este estudo abriu as portas para o desenvolvimento de uma série de eletrodos enzimáticos e analisadores bioquímicos desenvolvidos desde os anos 70. Em 1975, Janata⁶⁸ projetou um imunoeletrodo e, em 1983, Lowe e Goldfinch⁶⁹ usaram, pela primeira vez, indicadores ópticos em um sensor enzimático. É importante salientar, também, o desenvolvimento concomitante nos campos da microeletrônica e das estratégias de imobilização que possibilitaram e propiciam a fabricação de sensores confiáveis e seletivos para a monitorização de parâmetros químicos e biológicos em diferentes tipos de matrizes.

3.3 Estrutura de um Biossensor

O sensor (bio)químico é um dispositivo que pode detectar ou responder às substâncias químicas contidas nas imediações do sensor mediante interações específicas com um biocomponente sensível que se encontra em íntimo contato com um transdutor físico. O componente biológico translada o reconhecimento molecular específico do analito alterando um parâmetro físico ou químico facilmente mensurável. Esta modificação é sentida por um transdutor que gera um sinal

elétrico para um processador de sinal eletrônico. Uma ilustração esquemática dos princípios operacionais de um biossensor é mostrada na Figura 6.

Figura 6. Princípios operacionais de um biossensor eletroquímico, onde: ● substrato; ○ reagente (ex.: O₂); □ enzima; △ mediador reduzido; ▲ mediador oxidado; ■ produto.

Basicamente, há dois tipos de biossensores que diferem no modo de geração do sinal. Primeiro, os sensores de bioafinidade que utilizam o evento da ligação para detectar substâncias. Esta ligação modifica a conformação da biomolécula acarretando alterações na carga elétrica, espessura, temperatura ou parâmetros ópticos (cor ou fluorescência). Estes biossensores são denominados de *imunossensores*. O segundo tipo é o biossensor enzimático / metabólico. Neste, o reconhecimento do substrato pelos receptores imobilizados é seguido imediatamente da conversão química ao correspondente produto. Na maioria dos casos, o analito é quantificado pelo aparecimento do produto gerado ou pelo desaparecimento de sinal em sua presença. A utilização de um ou a combinação desses princípios em um sensor para o monitoramento de frações vitais de organismos vivos constitui um *bioprobe* (bioensaio). Exemplos de biossensores, imunossensores e *bioprobes* podem ser encontrados na Figura 7.

Figura 7. Diferentes classes de sensores químicos e suas interrelações

3.3.1 Transdutores Biológicos

Os transdutores biológicos, biocomponentes ou receptores conferem ao biossensor seletividade ou especificidade, estando envolvidos no rápido reconhecimento e detecção de moléculas específicas ou reações químicas. Enzimas, proteínas, organelas, tecidos, ácidos nucleicos, antígenos ou anticorpos, como também células íntegras de bactérias, fungos, plantas ou animais podem constituir o sistema de reconhecimento biológico.

Estes elementos podem estar protegidos por uma membrana permeável a certas moléculas do ambiente ou estar imobilizadas, em um suporte sólido, de várias maneiras. Adsorção física, oclusão em um gel ou polímero, ligação covalente com um carreador e ligações cruzadas com proteínas são técnicas utilizadas no desenvolvimento de um biossensor. A matriz de imobilização pode funcionar simplesmente como um suporte ou pode também estar relacionada com a mediação do mecanismo de transdução do sinal.

A adsorção física do biocomponente está baseada nas forças atrativas de van der Waals. É o mais antigo e o mais simples método de imobilização. A oclusão do biocomponente em matrizes de géis, polímeros, pastas ou tintas aumentam consideravelmente a estabilidade. Entretanto, para melhorar o desempenho de um biossensor, o transdutor biológico e o suporte sólido devem dispor de grupos funcionais capazes de formarem essencialmente ligações covalentes para resultar em

maior precisão e exatidão pela eliminação de variações dentro e entre a análise.

A característica mais importante a respeito do biocatalisador, além da habilidade de detectar um composto específico, é seu papel na transferência do impulso energético proporcional à substância que necessita ser quantificada. Assim, o receptor deve estar próximo ou em íntimo contato com um sistema de transdução adequado.

3.3.2 Transdutores Físicos

O transdutor físico - o interpretador do biossensor - é um dispositivo elétrico que converte os impulsos energéticos da reação biocatalítica em sinais que podem ser eletronicamente amplificados, armazenados e revelados. Modificações no pH, concentração iônica, emissão de luz, produção de oxigênio, gás carbônico ou peróxido de hidrogênio da reação, condutividade ou modificação na temperatura podem ser monitorados por potenciometria, amperometria, termorregistadores, equipamentos optoeletrônicos, transistores de efeito de campo ou outros.

Os transdutores mais freqüentemente utilizados são os elétricos, os ópticos e os térmicos mas transdutores piezelétricos e de ondas acústicas de superfície podem também ser empregados. A natureza da superfície do sensor, sua capacidade de medir em tempo real e a possibilidade de ser reutilizado são parâmetros distintos em cada método. Similarmente, as vantagens dos vários métodos são ditadas pela sua aplicabilidade nas indústrias e laboratórios, quando comparadas com as tecnologias e produtos disponíveis no mercado.

De maneira geral, no emprego de um transdutor devem ser consideradas as seguintes características⁷⁰: a) alta especificidade ao analito de interesse e resposta no intervalo de concentração apropriado; b) tempo de resposta, moderadamente rápido (entre 1 e 60 s) é desejável; c) acessível à miniaturização; d) compensação interna dos efeitos adversos de fatores ambientais (ex., temperatura) e e) confiabilidade e adequação para aplicação prática.

Os transdutores mais empregados comercialmente estão baseados em métodos eletroquímicos e os que utilizam enzimas constituem os chamados biossensores potenciométricos e biossensores amperométricos.

3.3.2.1 Biossensores Potenciométricos

Os sensores potenciométricos determinam o potencial entre dois eletrodos um dos quais é sensível ao íon de interesse (eletrodo de trabalho) e outro que mantém o potencial, altamente estável e constante (o eletrodo de referência). Este potencial, geralmente, é proporcional ao logaritmo

da concentração do analito ou atividade seguindo a bem conhecida equação de Nernst:

$$E = E^0 - \frac{0,0952}{zF} \ln a_i \quad (42)$$

onde E é o potencial produzido no eletrodo, E^0 corresponde ao potencial padrão produzido no eletrodo (incorpora diversos parâmetros, dentre os quais os potenciais de junção e do eletrodo de referência), z é o número de elétrons transferidos entre o analito e o eletrodo, F é a constante de Faraday (96 485 C) e a_i é a atividade ou concentração de um íon definida como:

$$a_i = f_i \cdot c_i \quad (43)$$

em que f_i é o coeficiente de atividade (modifica-se em função da resistência iônica de acordo com a equação de Debye-Hückel) e c_i é a concentração molar do íon.

Os dispositivos potenciométricos mais comuns são os eletrodos de pH e os eletrodos seletivos sensíveis a inúmeros íons (F^- , I^- , S^{2-} , CN^- , NH_4^+), têm sido empregados, com êxito, juntamente com inúmeras enzimas (*glucose oxidase*, *peroxidase*, *urease*, *catalase*). Entretanto, estas associações devem ser usadas com restrições, visto que interferências podem ser encontradas tanto no eletrodo íon seletivo - EIS como em compostos oxidáveis que podem estar presentes na amostra, alterando assim o equilíbrio de oxidação do analito. Os EIS são particularmente úteis devido a sua notável seletividade alcançada pela moldagem no eletrodo de uma membrana permeável ao gás (polipropileno, Teflon ou membranas à base de silicone, dentre outras).

Um interessante exemplo de um biossensor potenciométrico é o eletrodo enzimático sensível à gás (Figura 8) no qual a enzima imobilizada é aplicada sobre um eletrodo de vidro convencional. Entre estes tem-se uma fina camada de solução de bicarbonato de sódio (sensor de CO_2) ou cloreto de amônia (sensor de NH_3). Quando o eletrodo é exposto à solução do substrato a ser analisado a reação enzimática produz CO_2 (*descarboxilases*) ou NH_3 (*deaminases*) como produto. O gás gerado difunde-se, dissolvendo-se na solução interna do eletrodo, modificando o pH e aumentando a resposta potenciométrica do sistema. Respostas lineares são geralmente observadas no intervalo de 10 μmol a 0,1 mol L^{-1} , com um tempo de resposta variando de 1 a 10 min. Infelizmente, o tempo de recuperação da linha base é da mesma ordem de magnitude, o que diminui a praticidade de uso desse tipo de sensor. Interferências podem resultar de espécies dissolvidas na amostra. Esses sensores têm sido utilizados para a análise de muitos compostos biológicos e são, particularmente, úteis na preparação de eletrodos enzimáticos para aminoácidos⁷¹.

Figura 8. Sensor potenciométrico sensível à gás: a) eletrodo de vidro (sensível à variações de pH); b) solução interna; c) corpo do eletrodo; d) anel de borracha (“O-ring”); e) membrana permeável à gás; f) camada de enzima; g) membrana de diálise.

Eletrodos íons-seletivos têm sido usados como detetores alternativos nos testes de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)⁷². Um imunossensor baseado nesse princípio e desenvolvido por Fonong e Rechnitz⁷³ é mostrado na Figura 9. Os imunossensores oferecem uma excepcional sensibilidade e se constituem em um vasto campo para o desenvolvimento de novos biossensores.

3.3.2.2 Biossensores Amperométricos

Os biossensores amperométricos monitoram o fluxo de corrente em um potencial fixo, previamente selecionado, originado na oxidação ou redução de um composto eletroativo, entre o eletrodo de trabalho e o de referência. Para compensar a queda no potencial provocada pela corrente que passa através da solução ou quando se opera em meios de baixa condutividade (soluções hidroalcoólicas, solventes orgânicos), um sistema de três eletrodos é essencial. Estes biossensores exibem resposta linear *versus* concentração do substrato (dentro de certos limites) e a corrente registrada é uma medida direta da velocidade de reação eletroquímica (i.é., a velocidade de redução ou de oxidação no eletrodo).

A quantidade de corrente I mede a velocidade de reação eletroquímica, como descrita pela lei de Faraday (equação 44):

$$I = zF \frac{dn}{dt} \quad (44)$$

onde dn/dt é a velocidade de oxidação ou de redução (em mol s^{-1}).

Figura 9. Exemplo de imunossensor potenciométrico. O produto da enzima imobilizada pelo IgG é detectado pelo eletrodo íon-seletivo. Na presença de anti-IgG, a atividade enzimática decresce, ocorrendo uma variação no potencial proporcional à concentração do antígeno.

Nos eletrodos enzimáticos, um dos reagentes ou um dos produtos da reação enzimática deve ser eletroativo e a variação da concentração desta espécie junto à superfície do sensor é monitorada. A otimização desses biossensores envolve estabilidade, fundo de corrente baixo e cinética de transferência de elétrons rápida.

Eletrodos de platina são, geralmente, usados como sensores base na combinação com biocatalisadores, devido às suas respostas catalíticas na medida da oxidação do peróxido de hidrogênio e redução de oxigênio. Atualmente, são populares os eletrodos de carbono, modificados ou não (carbono vítreo, pirolítico e outras formas de carbono). A modificação da estrutura da superfície do eletrodo por reagentes químicos apropriados pode acelerar a velocidade de reação eletroquímica, prevenir envenenamento da superfície e diminuir as interferências da reação, além de propiciar um maior controle da etapa de imobilização da enzima.

Muitas enzimas envolvidas nas reações de oxidação e redução contêm centros eletroativos (hemina, flavina) envolvidos por uma camada de proteína, que impede uma eficiente transferência de elétrons aos eletrodos. Para minimizar esse problema, tem-se introduzido os mediadores redox (fenoxazina, ferricianeto, benzoquinona, ferroceno e seus derivados, tetratiafulvaleno (TTF), tetracianoquinodimetano (TCNQ), poliviologeno, cloranil, azul de Meldola, entre outros) que podem ser incorporados em eletrodos enzimáticos ou em imunossensores⁷¹. Um mediador, para ser eficiente, deve apresentar as seguintes características: (1) ser insensível ao pH e ao oxigênio; (2) interagir rapidamente com o sítio da enzima e ter comportamento eletroquímico rápido e (3) ser de fácil imobilização. Na Figura 10 ilustram-se as várias maneiras de transferência de elétrons de mediadores para o eletrodo.

Figura 10. Diferentes maneiras de transferência de elétrons de mediadores para a superfície do eletrodo: a) via mediador solúvel; b) via mediador imobilizado onde: M, mediador; ET, eletrodo de trabalho; S, substrato; MP, membrana permeável. Os índices o e r referem-se às formas oxidadas e reduzidas, respectivamente.

3.4 Evolução dos Eletrodos Enzimáticos

Basicamente, três classes distintas de eletrodos enzimáticos amperométricos podem ser reconhecidos, dependendo do grau de integração dos componentes (Figura 11)⁷⁴.

Os sensores de primeira geração são baseados em uma solução concentrada de enzima mantida em uma câmara de reação por uma membrana fina em frente do eletrodo indicador. Este sistema foi descrito por Clark Jr. e Lyons⁷⁵ e, posteriormente, melhorado por oclusão em gel e imobilização das enzimas na própria membrana.

Figura 11. Diferentes gerações durante a evolução de eletrodos enzimáticos amperométricos. A) Primeira geração; B) Segunda geração; C) Terceira geração, onde: a) Membrana permeável; b) Enzima (região onde ocorre a bioconversão); c) Transdutor; d) Sistema eletrônico.

Na segunda geração de sensores, há uma adsorção física direta ou fixação covalente do receptor na superfície do transdutor eliminando assim, a camada de membrana inativa. Exemplos de sensores de segunda geração incluem os sistemas desenvolvidos por Blaedel e Jenkins⁷⁶ e por Durlat e Comtat⁷⁷ para a determinação de lactato e glicose, respectivamente.

Os sensores de terceira geração são caracterizados pela comunicação elétrica direta entre os centros redox das enzimas e a superfície do eletrodo. Esta configuração se constitui em um eletrodo enzimático sem mediador. Este sensor, do tipo "biochip", permite considerável miniaturização do dispositivo sensível como é exemplificado pelo sensor descrito por Briggs⁷⁸. Relativamente, pouco sucesso com estes biossensores tem sido registrado, devido às dificuldades inerentes relacionadas com as estruturas complexas das proteínas. Entretanto, deve ser ressaltado que se trata de um campo recentemente iniciado. Adicionalmente, essa classe de eletrodos enzimáticos é difícil de identificar na literatura visto que a natureza exata do mecanismo do eletrodo frequentemente não está bem definida (i.é, se a enzima é oxidada por transferência direta de elétrons do eletrodo, se é um processo mediado ou se simplesmente detecta o peróxido de hidrogênio). Atualmente, predomina a utilização de sensores de segunda geração.

Apesar de, até o momento, apenas um pequeno grupo de biossensores estar comercialmente disponível, uma enorme gama destes transdutores têm sido preparados e testados por inúmeros pesquisadores. Teoricamente, é possível idealizar biossensores para qualquer molécula orgânica capaz de interagir com espécies biológicas. Os mais comuns e bem-sucedidos sensores são os sistemas baseados em biocatalisadores (enzimáticos).

3.5 Sensores Enzimáticos

Os biossensores eletroquímicos baseados em enzimas isoladas, células íntegras de microrganismos, anticorpos, antígenos e de tecidos vegetais e animais permitem a quantificação de inúmeras substâncias, incluindo aminoácidos, gases, cofatores, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, antibióticos, carboidratos assimiláveis, açúcares e amidos, álcoois e fenóis, vitaminas, mutágenos e íons inorgânicos. Estas aplicações dos biossensores estão resumidas na Tabela VI.

3.5.1 Biossensores Tissulares

Os sensores de tecidos vegetais (folhas novas, extremidades de raízes, flores de árvores frutíferas, sementes, frutas, hortaliças, inflorescências, tubérculos) em conjunção com elementos eletroquímicos formam um sensor biocatalítico de baixo custo, de fácil construção e que, geralmente, não requer cofatores⁸⁰.

Do ponto de vista histórico, biossensores tissulares foram introduzidos após o desenvolvimento de biossensores baseados em enzimas isoladas e de células microbianas. O emprego de um tecido de mamífero como uma camada biocatalítica foi demonstrado pela primeira vez por Rechnitz, em 1978⁸¹. Neste caso, um fino pedaço de fígado bovino e uma alíquota da enzima *urease* foram co-imobilizados na superfície de um eletrodo sensível ao gás amoníaco. Desta maneira, este sistema abriu as portas para o desenvolvimento de inúmeros biossensores tissulares. Na Tabela VII são apresentados alguns dos biossensores tissulares registrados na literatura nos últimos cinco anos.

No início da utilização de tecidos vegetais e animais como materiais biocatalíticos estes eram mantidos na superfície de um eletrodo íon seletivo ou de um eletrodo sensível à gas. Facilmente preparados pelo simples corte de seções finas de tecidos em um ambiente não estéril, os sensores tissulares tinham mostrado substancial simplificação em relação a outros eletrodos seletivos em termos de estabilidade mecânica, facilidade de preparação, simplicidade, sensibilidade, baixo custo e vida útil relativamente extensa. Além-distó, estes eletrodos, geralmente, possuíam maior atividade biocatalítica quando comparados com outros sensores que usam microrganismos,

mitocôndrias ou enzimas isoladas. Adicionalmente, a utilização de tecidos de seções diferentes da mesma fonte animal ou vegetal eram capazes de detectar diversos substratos por conterem múltiplos sistemas enzimáticos. Entretanto, apesar dessas vantagens, estes sistemas apresentam desvantagens marcantes como: (1) pequena seletividade a um dado substrato visto que o material biocatalítico contém numerosas enzimas e pode manter múltiplas vias metabólicas e (2) ocasionalmente, há um aumento do número de interferentes devido ao maior número de enzimas, vias metabólicas, cofatores e a própria estrutura de imobilização natural da enzima, fatores estes que, por outro lado, promovem maiores estabilidade e vida útil a este sistema analítico.

Tabela VI. Aplicações de biossensores amperométricos e potenciométricos na indústria química

CLASSE DE COMPOSTOS	ANALITO
Ácidos orgânicos e/ou seus sais	Acetato, formato, malato, gluconato, isocitrato, lactato, oxalato, piruvato, succinato, ácido nitriloacético, ascorbato
Álcoois, fenóis	Acetaldeído, bilirrubina, catecol, colesterol, éteres do colesterol, etanol, glicerol, ésteres do glicerol, metanol, fenol
Aminoácidos	Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glutatona, histidina, leucina, lisina, metionina, N-acetilmetionina, fenilalanina, sarcosina, serina, tirosina, triptofano, valina
Aminas, amidas, heterocíclicos da adenosina	Aminopirina, anilina, aminas aromáticas, acetilcolina, fosfatidilcolina, colina, creatina, guanidina, guanosina, penicilina, espermina, creatinina, ácido úrico, uréia, xantina, hipoxantina
Carboidratos	Amigdalina, galactose, frutose, glicose, glicose-6-fosfato, lactose, maltose, sacarose, amido
Cofatores	AMP (adenosina monofosfato), ATP (adenosinatri-fosfato), H_2O_2 , NADPH (piridina nucleotídeos)
Complexos variados	Antibióticos, substâncias assimiláveis, substâncias voláteis, vitaminas, peptídeos, demanda biológica do oxigênio, mutágenos
Enzimas	<i>Peroxidase</i> , α -amilase, glicoamilase, colinesterase, <i>pululanase</i>
Gases	NH_3 , H_2 , CH_4 , SO_2 , NO, O_2 , CO, CO_2

Fonte: Ho e Rechnitz⁷⁹.

TABELA VII. Biossensores baseados em tecidos vegetais.

Substrato	Material Biocatalítico	Enzima	Referência
Dopamina	Banana, batata, maçã	<i>Polifenol oxidase</i>	83
Flavanóides	Banana, batata, maçã	<i>Polifenol oxidase</i>	82
Organofosforados	Batata	<i>Fosfatase ácida</i>	88
Ácido carbâmico	Batata	<i>Fosfatase ácida</i>	88
Uréia	Feijão (Jack bean)	<i>Urease</i>	91
Fenóis	Cogumelo	<i>Polifenol oxidase</i>	89
Piruvato	Grão de milho	<i>Piruvato descarboxilase</i>	84
Peróxido de hidrogênio	Aspargo	<i>Peroxidase</i>	90
Colina	Raiz forte	<i>Peroxidase</i>	103
Pectina	Casca de laranja	<i>Pectinesterase</i>	92
Ácido glicólico	Espinafre	<i>Glicolato oxidase e Peroxidase</i>	93
Fenóis, dopamina	Cogumelo	<i>Polifenol oxidase</i>	94
Dopamina	Maçã em pó	<i>Polifenol oxidase</i>	95
Cadaverina, putrescina	Ervilhas, lentilhas	<i>Amino oxidase / Anidrase carbônica</i>	85

Cont. Tabela VII.

Glucoronídeos	Raiz e pecíolo de batata	<i>β-glucoronidase</i>	86
Bifenil-2-2' diol	Banana, cogumelo	<i>Polifenol oxidase</i>	87
Catecol	Batata	<i>Polifenol oxidase</i>	96
Ácido oxálico	Sorgo	<i>Oxalato oxidase</i>	97
Atrazina	Batata	<i>Polifenol oxidase</i>	98
Dopamina	Pós de batata, banana, cogumelo e maçã ^a	<i>Polifenol oxidase</i>	99
Dopamina	Pós de batata, banana, cogumelo e maçã	<i>Polifenol oxidase</i>	100
Ácido benzóico, tiou- réia, dietilditiocarbama- mato	Cogumelo	<i>Polifenol oxidase</i>	101
Peróxido de hidrogênio	Nabo	<i>Peroxidase</i>	102

a. náfon.

Há algumas vantagens em se utilizar os biossensores baseados em tecidos vegetais quando comparados aos de tecidos animais: disponibilidade de plantas facilitada, simplicidade na construção de eletrodos e de bioreatores, custo mais reduzido na sua preparação, e uma imensa aplicabilidade quando acoplados com enzimas isoladas para formar os chamados sensores híbridos.

Todos os biossensores tissulares estão sujeitos à degradação microbiana. Assim, devem ser estocados adequadamente em uma solução de agentes antimicrobianos para assegurar sua vida útil. Materiais bacteriostáticos frequentemente utilizados são: solução de timerasol 0,01 %, azida sódica 0,02 % ou diacetato de clorohexidina a 0,002 %. Apesar de efetivos na prevenção do crescimento microbiano, estes devem ser empregados com cautela visto que estes agentes químicos podem, se usados por longo tempo, inibir a atividade enzimática causando assim a perda da integridade do sensor. Adição de glicerol na solução de estocagem ajuda a manter a atividade biocatalítica e a estabilidade das enzimas no tecido. Tecidos congelados podem reter sua atividade biocatalítica por alguns meses quando armazenados apropriadamente.

A estabilidade da atividade biocatalítica depende não somente de certos cofatores presentes mas também do pH da solução tamponante. Modificações de pH (não controláveis) que podem ocorrer na superfície do eletrodo, possivelmente, devido a intermediários enzimáticos gerados, podem causar interferências no eletrodo. A adição de inibidores específicos, como fenilalanina ou fosfato de glicerol, ajudam a regular estas mudanças imprevistas de pH. O uso de soluções com adequada capacidade tamponante, geralmente, é suficiente para manter o pH ótimo necessário para maximizar a atividade do eletrodo.

Os tempos de resposta e de recuperação de um biossensor tissular dependem de alguns fatores. Estes incluem: tipos de tecidos, conteúdo celular, via metabólica, cofatores, disponibilidade da enzima, espessura do tecido, substrato, velocidade de difusão do produto, tipo de reator enzimático e método de detecção, entre outros. Alguns tecidos podem conter mais material de suporte, mais tecido conectivo ou mais partes fibrosas do que outros; conseqüentemente, suas porosidades variarão consideravelmente. Isto pode explicar as diferenças nas velocidades de difusão através das membranas celulares (animais), paredes celulares (plantas) e espaços intra- e extracelulares.

3.5.1.1 Mecanismo de Resposta dos Biossensores Tissulares

As enzimas encontram-se no interior das células dos tecidos vegetais e animais e é razoável supor que as moléculas do substrato devem ser transportadas, para ficarem em íntimo contato

com as moléculas da camada biocatalítica. Assim, a determinação do mecanismo de transporte do substrato até a enzima imobilizada e do produto gerado para o eletrodo é importante do ponto de vista de utilização de materiais tissulares como reagentes analíticos.

Os modelos existentes para descrever as interações entre substrato e enzima ainda são os propostos por Arnold e Rechnitz¹⁰⁴. A Figura 12 mostra os vários modelos esquematicamente.

O modelo I representa a situação em que as células da superfície externa do tecido completamente destruído liberam a enzima na superfície do eletrodo. Com o envelhecimento do eletrodo ocorre a difusão de fragmentos celulares para fora da superfície do eletrodo que expõe uma camada nova de células ricas em enzimas. Este modelo elimina as complicações da entrada de substrato no interior das células. A velocidade de liberação da enzima deve ser constante, consistente com a boa reprodutibilidade dos biossensores baseados em tecidos e deve ser lenta para assegurar quantidade suficiente de enzima por um tempo de vida útil prolongado.

Figura 12. Representação esquemática dos modelos propostos para a interação substrato-enzima. o, substrato; E, enzima e tp, transporte de proteína.

O modelo II representa o caso onde as células imobilizadas, rompidas suficientemente, permitem uma difusão livre de moléculas de substrato e produto dentro e fora das células do tecido, mas não tão completamente que a enzima possa se difundir fora do eletrodo. Aqui pode ocorrer a formação de canais nas membranas mais externas dos tecidos ocasionada durante a construção do eletrodo devido a lavagem com água da camada tissular ou ao descongelamento prévio do tecido.

Os modelos III e IV representam os casos onde as células de tecidos imobilizados permanecem

intactas no interior da célula, junto à superfície do eletrodo. O modelo III requer uma proteína específica para auxiliar no transporte do substrato através da membrana celular. O modelo IV, além desta proteína de transporte, requer uma fonte de energia dentro da célula do tecido para ajudar no processo de transporte. A necessidade de uma fonte de energia torna este modelo pouco provável porque a viabilidade de células neste sistema é duvidosa.

3.5.1.2 Biossensores Baseados em Folhas

Muitas folhas possuem uma estrutura de multicamada contendo um revestimento externo ceroso (cutícula) e uma camada esponjosa entre o endocarpo e o mesocarpo. A cutícula é de natureza hidrofóbica, porém permite a troca de gases através de pequenas aberturas na superfície conhecidas como estômatos.

Um biossensor baseado em folhas de pepino, sem cutícula, que possui atividade de *l*-cisteína dissulfidrase, foi proposto por Smit e Rechnitz¹⁰⁵. Este material biocatalítico foi fixado em eletrodos de membrana sensível a NH_3 para a determinação de cisteína. Folhas de alface pulverizadas, ricas em *peroxidase*, foram colocadas sobre uma membrana de teflon e fixada por uma membrana de acetato de celulose sobre um eletrodo sensível a O_2 e utilizadas por Fang et al.¹⁰⁶ para detecção de peróxido de hidrogênio.

3.5.1.3 Biossensores Baseados em Flores

Os tecidos das flores oferecem propriedades atraentes como materiais biocatalíticos na construção de biossensores. As fragrâncias produzidas pelas flores indicam um alto nível localizado de atividade metabólica resultando em produtos voláteis que podem ser compatíveis com eletrodos sensíveis a gases. Tais processos metabólicos são suficientemente rápidos, sensíveis e seletivos entre diferentes espécies ou componentes estruturais das flores que podem ser usados no desenvolvimento de biossensores.

Uchiyama e Rechnitz¹⁰⁷, utilizaram pétalas de flores de magnólia (*Magnolia grandiflora*) para a construção de um biossensor visando a determinação de *l*-glutamina e *l*-asparagina. Após removida a parte hidrofóbica externa, discos de 12 mm e 0,1 - 0,4 mm de espessura foram utilizados diretamente na superfície de um sensor sensível a gás amoníaco.

3.5.1.4 Biossensores Baseados em Bulbos e Inflorescências

Os sulfóxidos de *s*-alquil-*l*-cisteína, ativados pela *alinase*, são os precursores dos compostos responsáveis pelo "flavor" de bulbos dos gêneros *Allium* (cebola, alho) e *Brassica* (repolho,

couve-flor, brócoli). A reação catalisada por essa enzima é a seguinte:

A amônia produzida, quando a enzima está em contato com o substrato via ruptura da parede celular, é facilmente monitorada com um eletrodo sensível à amônia. Esta reação enzimática é muito rápida e este biossensor pode ser utilizado para detecção de sulfóxidos.

3.5.1.5 Biossensores Baseados em Tubérculos / Raízes

Tecidos de beterraba, que possuem atividade da enzima *tirosinase*, foram empregados por Schubert et al.¹⁰⁸, para a determinação de tirosina. Fatias com espessura de 100 µm foram acopladas a um eletrodo de oxigênio com uma membrana de diálise e presa por um anel de borracha. As características desse sensor foram estabilidade à temperatura ambiente, vida útil de oito dias, tempo de resposta de 5 - 10 min e um intervalo de linearidade de 0,03 - 0,9 mmol L⁻¹.

3.5.1.6 Biossensores Baseados em Sementes e Grãos

Um sensor de piruvato foi desenvolvido por He e Rechnitz⁸⁴ utilizando a região central do grão de milho, rico em *piruvato descarboxilase*, como camada biocatalítica. O sensor foi fabricado confinando uma solução indicadora fluorescente (3,6,8-trissulfonato de 1-hidroxipireno, NaHCO₃, NaCl e glicerol) em um recipiente de vidro coberto com uma membrana consistindo do material biocatalítico “sandwichado” entre uma membrana permeável ao gás e uma membrana de diálise, mais externa. O sensor exibiu linearidade no intervalo de 0,05 - 1,5 mmol L⁻¹, com tempo de resposta de 6 - 12 min e uma vida útil de sete dias quando usado diariamente.

Fernandes et al.⁹⁷, desenvolveram um reator enzimático com sementes de sorgo acoplado com um eletrodo sensível a CO₂ para a quantificação de ácido oxálico. Este sensor foi estável durante 200 determinações com um tempo de resposta em torno de um minuto.

3.5.1.7 Biossensores Baseados em Frutas

Há interessantes sistemas biocatalíticos encontrados em frutas. Sidwell e Rechnitz¹⁰⁹ acoplaram um pedaço da polpa de banana (0,25 - 1,0 mm de espessura) em um eletrodo de oxigênio (célula de Clark) com uma membrana de diálise e obtiveram um biossensor que pode quantificar o neurotransmissor dopamina. O consumo de oxigênio nesta reação produz um sinal (via eletrodo de oxigênio), proporcional à concentração de dopamina presente.

Wijesuriya et al.¹¹⁰ utilizaram tecido de uva Thompson (*Vitis vinifera*) como fonte de cata-

lase para detecção de peróxido de hidrogênio. Uma fatia (0,5 mm) do tecido foi acoplada a um eletrodo de oxigênio fixa por um rede de nylon e um anel de borracha. O sensor obtido era estável em uma amplo intervalo de pH (5,5 - 8,5), com tempo de resposta de um minuto e vida útil compatível com o de eletrodos de *catalase* comercial imobilizada.

Horie e Rechnitz⁹², desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção de pectina fixando um pedaço de casca de laranja, fonte de *pectinesterase*, junto a um eletrodo de pasta de carbono contendo *álcool oxidase*. Da degradação da pectina pela *pectinesterase* há produção de metanol, que é detectado pelo eletrodo de pasta de carbono contendo *álcool oxidase*.

Pós obtidos de batata, maçã, banana e cogumelo foram misturados com álcool polivinílico e espalhados em uma membrana de policarbonato. O biofilme obtido após desidratado, foi colocado sobre um eletrodo sensível ao oxigênio e coberto com outra membrana de policarbonato. Os biossensores obtidos possuíam limites de detecção de cerca de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a dopamina, alta estabilidade e reprodutibilidade¹⁰⁰. Para aumentar a seletividade à dopamina estes eletrodos foram revestidos, posteriormente, com nafion®⁹⁹. Estes novos biossensores mostraram maiores estabilidade, reprodutibilidade e vida útil quando comparados com os biossensores de tecidos não tratados e *tirosinase* isolada.

4. Características Operacionais e Limitações dos Biossensores

4.1 Tempo de Resposta

As aplicações analíticas dos biossensores são baseadas, geralmente, nas condições de equilíbrio entre o “fluxo do produto e refluxo” de material que chegam à superfície do eletrodo. Gráficos logarítmicos ou lineares para eletrodos potenciométricos e amperométricos, respectivamente, proporcionam uma relação analítica adequada para a quantificação do substrato. Entretanto, o comportamento de equilíbrio de tais biossensores pode ser afetado de inúmeras maneiras dentre as quais a construção do eletrodo, configuração do reator enzimático, como também da cinética de reação no material tissular e a composição da solução teste.

As propriedades dinâmicas dos biossensores são de considerável importância analítica. Tempos de resposta dos biossensores baseados em tecidos vegetais normalmente se encontram no intervalo de ~1 - 10 min (em certos casos até mais) dependendo do tipo de eletrodo utilizado (potenciométrico ou amperométrico), espessura e massa do tecido, pH da solução tamponante,

permeabilidade tissular, temperatura, configuração do reator, agitação, velocidade de fluxo e mecanismos de difusão. Tipicamente, tempos de resposta menores são obtidos em concentrações mais baixas de analito.

4.2 Vida Útil dos Biossensores Tissulares

A vida útil dos biossensores tissulares é primariamente governada pela instabilidade do tecido utilizado. Esta instabilidade é afetada pelos métodos de imobilização do biocatalisador, pH da solução, condições de estocagem e presença ou ausência de ativadores. A vida útil destes biossensores pode ser inferior a um dia ou, dependendo das condições particulares do material biocatalítico utilizado, ser superior a mais de 30 dias.

Biossensores de tecidos vegetais, geralmente, possuem boa seletividade, especialmente se o substrato a ser determinado é o nutriente principal ou um metabólito funcional do material tissular empregado. As condições de pH ótimo, presença de cofatores e de estabilidade, normalmente, favorecem este material biocatalítico para a construção de sensores visto que as enzimas encontram-se imobilizadas em seu ambiente natural.

4.3 Técnicas de Imobilização

Os dois métodos mais freqüentemente empregados na imobilização de enzimas são (1) a ligação cruzada empregando um reagente bifuncional em um suporte inerte e (2) a retenção física da enzima em uma membrana apropriada. O primeiro método, onde há formação de ligações intermoleculares entre a enzima e o suporte, normalmente, não é requerido no caso de tecidos de plantas, visto que os agentes biocatalíticos encontram-se em uma matriz otimizada pela evolução. Biossensores de tecido, usualmente, são fabricados pela retenção física do material biológico na extremidade do eletrodo usando-se uma membrana. Esta membrana deve permitir a difusão do substrato nas camadas biocatalíticas do tecido vegetal sem deixar que o biocatalisador se afaste da superfície do eletrodo. Normalmente, pode-se empregar uma membrana de diálise à base de celofane ou dependendo do tamanho das partículas do material tissular, uma rede de nylon de 150 μm de porosidade é suficiente.

4.4 Características Desejáveis de um Biossensor

Há um consenso generalizado sobre as propriedades desejáveis de um sensor (bio)químico. Em adição às características principais de todos os métodos analíticos, tais como eficiência, precisão, sensibilidade e seletividade, é necessário que os biossensores tenham algumas propriedades

adicionais: ausência de histerese, estabilidade, fácil procedimento na construção de uma curva de calibração, robustez e baixo custo do sistema analítico. É desejável também portabilidade e biocompatibilidade objetivando a sua aplicação "in situ" e "in vivo". Devem operar de maneira reversível ou alternada, sejam reusáveis e facilmente regeneráveis ou adequado para um único caso, em sistemas irreversíveis, não-regeneráveis (Tabela VIII).

TABELA VIII. Características analíticas dos biossensores.

Propriedades Principais	Propriedades Adicionais	Aplicação das Propriedades	Propriedades Específicas
Eficiência	Nenhuma histerese Estabilidade	Portabilidade Resposta em tempo real Biocompatibilidade	Reversibilidade Reutilizável Regenerabilidade Adequabilidade
Precisão	Pequeno sinal residual		
Sensibilidade	Bom limite de detecção Ampla intervalo dinâmico Fácil calibração		
Seletividade	Linearidade Simplicidade de construção e operação Robustez Baixo custo Vida útil elevada		

5. Eletrodos de Pasta de Carbono

A primeira informação sobre eletrodos sólidos de carbono para voltametria foi registrada por Adams, em 1958¹¹¹. Tais sensores, denominados de "*eletrodos de pasta de carbono*" (EPC), foram idealizados para ser usados em intervalos de potenciais mais positivos onde os eletrodos de mercúrio não são aplicáveis tendo em vista a fácil oxidação deste metal. Consistiam de um capilar conectado a um reservatório contendo uma suspensão de pó de carbono em um líquido orgânico apropriado¹¹². Tal arranjo mostrou-se inadequado para propósitos práticos devido ao alto conteúdo de líquido que provocava uma alta resistência elétrica e outros efeitos indesejáveis. Posteriormente, uma mistura de pó de carbono ou grafite com uma quantidade adequada de líquido orgânico não condutor, com consistência descrita como "semelhante à creme de amendoim", foi propos-

ta como material para o novo tipo de eletrodo¹¹².

Atualmente, a pasta de carbono é uma mistura de dois componentes: o pó de carbono (grafite) com um líquido orgânico, o ligante¹¹³. Os tipos de pó e os compostos ligantes comumente usados nestas misturas são mostrados nas Tabelas IX e X.

TABELA IX. Pós de carbono (grafite) usados na preparação de pastas de carbono.

Carbono (Grafite)	Tamanho da Partícula (Média) (μm)	Fonte Comercial
Acheson G-38	10 - 20	National Carbon Company (U.S.A.)
UCP-1-M	1	United Carbon Product (U.S.A.)
RW-A(B)	5 - 10	Ringsdorff Werke (R.F.A.)
CR-5	5	Tesla Lanskroun (R. Checa)
Graphon	25	Não encontrada-
Sigradur G	1 - 12	HTW Reitingen (R.F.A.)

Fonte: Kalcher et al.¹¹⁴.

TABELA X. Compostos usados como ligantes em pastas de carbono.

Tipo de Ligante	Substância
Hidrocarbonetos Alifáticos	Hexano, octano, decano, dodecano, hexadecano, esqualeno
Mistura de Hidrocarbonetos	Nujol, Uvasol
Compostos Aromáticos	Benzeno, naftaleno, fenantreno, trimetilbenzeno, éter difenílico
Hidrocarbonetos Halogenados (alifáticos, aromáticos)	Tetracloroeto de carbono, tribrometo de carbono, derivados polifluoretados
Silicones	MS, MSO, Lukoil
Ésteres de Ácidos Orgânicos	Fosfato de tricresil, ftalato de dioctil

Fonte: Kalcher et al.¹¹⁴.

O tamanho das partículas do pó de grafite varia entre 5 e 25 μm . Partículas grandes produzem uma textura grosseira e desfavorecem as propriedades mecânicas e eletroquímicas. Partículas muito pequenas (ex., 0,2 μm) são adequadas para a fabricação de microeletrodos de pasta de carbono. As propriedades requeridas do pó de grafite na elaboração das pastas de carbono são: uniformidade do tamanho de partícula, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de

oxigênio e de impurezas eletroativas. Materiais tais como negro de fumo, carvão vegetal ou produtos similares não são adequados para a preparação de pastas.

O segundo componente da pasta de carbono é o ligante. Esta substância deve ser eletroinativa e quimicamente inerte, imiscível com as soluções do analito, pouco volátil e livre de impurezas.

A relação entre o ligante e pó de grafite usualmente varia de 0,3 - 0,5 mL por grama de carbono (pastas “secas”) e 0,5 - 0,9 mL por grama de carbono (pastas “úmidas”)^{115,116}.

A superfície de um **EPC** possui características únicas com regiões condutoras (carbono) e isolantes (líquido orgânico). As dimensões destas regiões são variáveis e dependem da relação pó de grafite e ligante. Geralmente, os **EPC** de composição comum exibem uma superfície revestida, praticamente, por um microfilme de líquido ligante. A relação pó de grafite e ligante determina, também, as propriedades físicas e químicas além do comportamento eletroquímico.

Os **EPC** têm sido utilizados para determinações analíticas desde 1963¹¹⁷. Estes eletrodos, não modificados, são freqüentemente empregados em análises por “stripping” após deposição dos analitos como metais ou como óxidos insolúveis. Pré-concentração de algumas espécies inorgânicas, como heteropoliácido de molibdênio e silício, para a determinação de silício, é também possível por adsorção¹¹⁸. Os **EPC** são detetores amperométricos apropriados para análise em fluxo, mas são empregados principalmente como sensores em sua forma modificada.

Os primeiros trabalhos relatando a utilização de um terceiro componente na pasta de carbono datam de 1964 e 1965^{119,120}. Estes trabalhos pioneiros contribuíram enormemente para o aparecimento dos chamados “*eletrodos de pasta de carbono quimicamente modificados*” (**EPCQM**) na década de 70. A introdução de um novo constituinte na pasta afeta significativamente o comportamento eletroquímico do novo material do eletrodo propiciando seletividade e sensibilidade.

A primeira modificação química da pasta de carbono foi realizada por Cheek e Nelson¹²¹ pela introdução de grupos funcionais complexantes na superfície do pó de carbono para a pré-concentração de prata. Outro método de modificação foi escolhido por Yao e Musha¹²². Estes autores dissolveram um modificador no ligante para imobilização das espécies eletroativas. A ampla aplicação dos **EPCQM** foi proporcionada por Ravichadran e Baldwin¹²³ que propuseram a mistura direta do modificador com a pasta como uma maneira conveniente para a modificação.

Desta maneira, os **EPCQM** passaram a ser usados para determinações voltamétricas diretas ou como detectores amperométricos em sistemas de soluções em fluxo ou em batelada. Recentemente, estas modificações estão sendo realizadas com enzimas ou, como neste trabalho, com tecidos vegetais pulverizados onde as enzimas encontram-se em seu habitat natural com todos os estabilizadores e ativadores necessários. Estes novos eletrodos são denominados de “*eletrodos de pasta de carbono biologicamente modificados*” (**EPCBM**).

Os biossensores amperométricos baseados na incorporação de entidades biológicas em matrizes de pastas de carbono possuem grande versatilidade advinda da coimobilização da enzima, seu mediador ou cofator, bem como outras enzimas e estabilizadores presentes no mesmo sistema. Tempos de resposta curtos são propiciados devido a ausência de membranas e da estreita proximidade dos sítios biocatalíticos e o pó de grafite. Toda a pasta funciona como uma fonte da atividade biocatalítica e novas “biosuperfícies” podem ser facilmente obtidas pela renovação de uma das extremidades do sensor. O fato de que muitas enzimas retêm suas atividades no interior de um ambiente hidrófobo não é surpresa considerando que há atividade enzimática em meios orgânicos¹²⁴⁻¹²⁸. A bioespecificidade inerente destes dispositivos elimina, em muitos casos, a necessidade de separações cromatográficas demoradas, tornando-os atrativos para obtenção de respostas rápidas quando associados com sistemas de soluções em fluxo.

Inúmeros exemplos desta associação são citados na literatura. Bremken et al.¹²⁹ descreveram um detector “sem reagente” para glicose baseado na co-imobilização da *glicose dehidrogenase*, NAD^+ e fenoxazina como mediador. Outros **EPCBM** foram desenvolvidos para o monitoramento on-line de peróxidos¹³⁰, fenóis¹³¹, etanol¹³², aminoácidos¹³³. Em adição a estes detectores, é possível também a incorporação de tecidos de plantas em matrizes de pasta de carbono objetivando-se a obtenção de detectores biocatalíticos^{134,135}.

Materiais vegetais ricos em *peroxidases*, *polifenoloxidasas* e *tirosinase* tornaram-se populares na construção de eletrodos de pasta de carbono. Inúmeros exemplos de **EPCBM** com tecidos vegetais são citados na literatura e incluem: banana (*PPO*)^{134,136,137}, cogumelo (*tirosinase*)¹¹³⁶⁻¹³⁸, raiz forte (*POD*)^{130,135,139}, beterraba (*oxalato oxidase*)¹⁴⁰, abobrinha (*ascorbato oxidase*)¹⁴¹, abacaxi (*POD*)¹⁴², berinjela (*PPO*)¹⁴³, rúcula (*POD*)¹⁴⁴, semente de tomate (*álcool dehidrogenase*)¹⁴⁵, ervilha (*diamino oxidase*)¹⁴⁶, mamão (*papaína*)¹⁴⁷, espinafre (*ácido cinâmico hidrolase*, *catecol oxidase*, *glicolato oxidase*)¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, aveia (*poliamino oxidase*, *POD*)¹⁵¹.

6. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos

Na última década, os conceitos relativos a reações enzimáticas mudaram drasticamente. A constatação de que certas enzimas apresentam atividade catalítica em meio orgânico data do início do século, mas foi a partir dos anos 80 que as macromoléculas biológicas passaram a ser vastamente utilizadas em outros meios que não o aquoso. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica. Paralelamente, a utilização de biossensores em meio aquo-restrito tem proporcionado o desenvolvimento de novos dispositivos analíticos tornando possível trabalhar em meios até então inexplorados para a análise de espécies hidrofóbicas. A seguir serão apresentados vários aspectos de importância no controle da atividade enzimática em solventes orgânicos, bem como diversas aplicações analíticas envolvendo reações enzimáticas em meio não aquoso.

6.1 Reações Enzimáticas em Meio Não Aquoso

A catálise enzimática em meio orgânico possui uma enorme potencialidade para aplicações em síntese orgânica, na indústria e particularmente, na (bio)analítica.

Apesar do reconhecimento desses benefícios, o número de trabalhos onde enzimas têm sido utilizadas para propósitos analíticos em meio não-aquoso é, ainda, bastante limitado, quando comparado com a profusão de monografias relativas a sensores em meio aquoso. As principais razões listadas por Braco¹⁵² que podem justificar esse desequilíbrio no uso de meios aquosos e não-aquosos em métodos analíticos mediados por enzimas são: a) o comportamento de inúmeras enzimas em ambientes aquo-restritos ainda permanece inexplorado; b) muitas amostras reais são aquosas ou encontram-se em meio aquoso, o que implica, muitas vezes, ou numa partição ineficiente ou no acréscimo de uma etapa no processo para a extração do analito de interesse na fase orgânica; c) os fundamentos da enzimologia em meios não-aquosos foram estabelecidos muito recentemente; d) o uso de solventes orgânicos pode, muitas vezes, colocar em risco a saúde do analista (por serem tóxicos, inflamáveis e/ou explosivos) além de poderem acarretar problemas ambientais.

Algumas pesquisas têm demonstrado as vantagens da biocatálise em meios aquo-restritos, oferecendo uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento de novas tecnologias e de biossensores na determinação de importantes analitos (insolúveis em água) e de matrizes de amostras hidrofóbicas. Na Tabela XI são apresentadas as principais vantagens da realização de reações enzimáti-

cas nesses meios.

A introdução de biossensores eletroquímicos, em meios não-aquosos, tem encontrado variadas aplicações no processamento industrial e em testes de controle de qualidade. Quando utilizados em sistemas de análise por injeção em fluxo, propriedades tais como velocidade, portabilidade e simplicidade de análise são conseguidas. Neste contexto, o desenvolvimento de novos biossensores amperométricos em meios não-aquosos deve ser explorado em profundidade por químicos, bioquímicos e engenheiros.

Tabela XI. Vantagens da realização da biocatálise em meios aquo-restritos.

SOLVENTES ORGÂNICOS

- catálise eficiente pode ser alcançada com substratos pouco solúveis em água (não polares); estas modificações induzidas pelo solvente na eficiência enzimática ou especificidade de substrato pode, potencialmente, aumentar o limite de detecção por modificações aparentes na constante de Michaelis-Menten
- reações indesejáveis bem como inibição do substrato ou do produto podem ser reduzidas
- a estabilidade térmica das enzimas é aumentada acarretando a ampliação do intervalo operacional da temperatura e a sua vida útil
- a imobilização é freqüentemente desnecessária porque enzimas são insolúveis nestes meios
- se a imobilização é desejada, a adsorção da enzima em superfícies não porosas é satisfatória
- a contaminação microbiana é eliminada
- a recuperação e a reutilização da enzima ficam mais fáceis

FASE GASOSA

- imobilização não é necessária ou muito simplificada visto que o biocatalisador encontra-se em fase sólida. Reatores em batelada ou contínuos podem ser usados e a recuperação do biocatalisador é bastante facilitada
- a adição de solventes é evitada e a produção de produtos secundários e, assim, muito limitada facilitando a separação e a purificação durante o processamento podendo, portanto, melhorar a produtividade
- a transferência de massa na fase gasosa é freqüentemente mais eficiente do que em solução. Assim, as reações são menos afetadas por problemas difusionais
- produtos voláteis, tóxicos ou inibidores podem ser removidos continuamente

FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FSC)

- reações de síntese nas quais a água é um produto indesejável podem ser evitadas
 - as solubilidades dos materiais hidrofóbicos são relativamente incrementadas
 - a termoestabilidade das biomoléculas em FSC é superior do que em água
 - o solvente pode ser prontamente reciclado
 - reações bioquímicas e separações podem ser integradas em uma única etapa
-

6.2 Fatores que Controlam a Atividade Enzimática em Solventes Orgânicos

6.2.1 Água

As propriedades solventes da água resultam das forças atrativas fortes (as pontes de hidrogênio) que existem entre as suas moléculas. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, a “automontagem” e as propriedades das enzimas. As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente na água (*hidrofílicas*) porque elas podem substituir as interações moleculares água-água, energeticamente favoráveis, por interações do tipo pontes de hidrogênio e eletrostáticas, ainda mais favoráveis, no sistema água-soluto. A variação da entalpia (ΔH) pela dissolução desses solutos é, geralmente, pequena. Diferentemente, moléculas não-polares interferem com as interações água-água e são muito pouco solúveis na mesma água (*hidrofóbicas*). Estas moléculas não-polares tendem, quando em solução aquosa, a agregarem-se de forma a minimizar os efeitos energeticamente desfavoráveis provocados pela sua presença. Biomoléculas como as enzimas são *anfipáticas*, possuindo regiões superficiais polares (ou carregadas) e não-polares. Em um ambiente aquoso, estas duas regiões da molécula experimentam tendências conflitantes; a região hidrofílica interage favoravelmente com a água enquanto a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água (Figura 13a). Assim, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das enzimas agregam-se para apresentar a menor área hidrofóbica possível à água - (ficam confinados no interior da molécula protéica) e as regiões polares são arranjadas para maximizar as interações com o solvente aquoso (Figura 13b).

Figura 13. Etapas de formação de micelas: (A) Representação da extremidade hidrofílica (a) e da região hidrofóbica (b), envolta por camada de moléculas de água altamente ordenadas de uma biomolécula; (B) Ordenação das moléculas com conseqüente diminuição do número de moléculas de água; (C) Formação da micela com eliminação de água das proximidades da região hidrofóbica.

enzima é fundamental para a atividade catalítica em meio não aquoso. A explicação mais provável para isso advém do fato da água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura protéica.

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (a α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula da enzima deve ter uma camada de hidratação definida, separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna.

Numerosas discussões e trabalhos¹⁵³⁻¹⁵⁵ têm sido dedicados para determinar a quantidade adequada de água para a atividade enzimática em meio orgânico. Zaks e Klibanov¹⁵⁴ examinaram três modelos de enzimas - *polifenoloxidase*, *álcool desidrogenase* e *álcool oxidase* - em solventes de hidrofobicidades e conteúdos de água diferentes. Eles mostraram que a atividade enzimática estava relacionada à quantidade de água ligada à proteína e não à concentração de água nos solventes orgânicos. A água ligada àquelas enzimas em solventes orgânicos não formaria uma camada de água verdadeira mas, de preferência, uns poucos "clusters", provavelmente, em torno de regiões carregadas e polares da superfície enzimática.

A quantidade de água necessária para catálise depende das características de cada enzima. *Lipases* são altamente ativas quando poucas moléculas de água estão associadas com a molécula protéica¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. *Subtilisina* e α -*quimotripsina* necessitam menos de 50 moléculas de água por molécula de enzima para exibir sua atividade mínima¹⁵⁴. *Álcool oxidase*, *álcool desidrogenase* e *polifenoloxidase*, entretanto, são unicamente ativas quando um elevado número de moléculas de água estão ligadas com a molécula de enzima formando uma monocamada¹⁵⁹.

Existe um consenso de que as enzimas são mais termoestáveis em meios com baixo conteúdo de água do que em soluções aquosas. Isto pode ser explicado pelo aumento da rigidez e pelos processos covalentes envolvidos na inativação irreversível, tais como deamidação, hidrólise de peptídeos e decomposição da cistina, que necessitam de água. Estes processos são extremamente lentos em meios de baixa concentração de água. O aumento da termoestabilidade tem sido mostrado para *lipase* do pâncreas de suínos¹⁶⁰, α -*quimotripsina*¹⁵⁴, *ribonuclease*, α -*quimotripsina*, *lisozima*¹⁶¹ e *tirosinase*¹⁶².

Embora a presença de água ligada seja uma condição necessária para a retenção da ativi-

dade catalítica e estabilidade em meios não-aquosos, alguns estudos têm demonstrado que as enzimas *eritrocupreína*¹⁶³, *xantina oxidase*¹⁶⁴, *lipase pancreática*¹⁶⁵ e *subtilisina*¹⁶⁶ retêm sua atividade catalítica em solventes orgânicos verdadeiramente anidros (dimetilsulfóxido, formamida, piridina ou dimetilformamida). Os mecanismos moleculares que protegem a conformação dessas enzimas e as suas propriedades catalíticas nesses solventes orgânicos ainda permanecem obscuros.

Além dessas propriedades naturais, a modificação química pode reduzir a quantidade de água requerida por uma enzima tornando-a, desta maneira, mais hidrofóbica¹⁶⁷.

6.2.2 Solvente

As modificações no sistema biocatalítico somente afetarão o biocatalisador quando estas ocorrerem nas proximidades moleculares da enzima. Quando se dissolve um solvente orgânico imiscível em água (sistema bifásico líquido-líquido) a concentração do solvente é variável e depende de sua solubilidade em água. Isto significa que o biocatalisador, nesses sistemas, não experimenta uma concentração do solvente que exceda a solubilidade deste na fase aquosa. Dessa maneira, o biocatalisador estará exposto na interface do sistema líquido-líquido o qual poderá ser nocivo para ele¹⁶⁸.

Para solventes miscíveis não há limite de solubilidade do solvente na fase aquosa e qualquer concentração deste pode ser obtida nestes sistemas. Tem sido mostrado que há um valor limite para a concentração do solvente orgânico onde se inicia a inativação^{169,170}. Tem sido demonstrado quantitativamente, que solventes não polares não são suficientemente solúveis em água para alcançar a concentração limite de inativação¹⁷¹.

Os efeitos do solvente sobre a velocidade de reação da catálise enzimática em sistemas de uma ou duas fases podem ser diretos ou indiretos¹⁷². Os efeitos *indiretos* compreendem a partição de reagentes e de produtos, a alteração do equilíbrio químico e mais a transferência de massa em sistemas de duas fases. Os efeitos *diretos* são responsáveis pela redução da atividade e pela inativação (desestabilização) da enzima através de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima que altera a conformação nativa da enzima devido a penetração do solvente no âmago hidrófobo da proteína provocando a quebra das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas. Uma exceção, seria a estabilização conformacional adquirida pela enzima em meios não-aquosos, através do “efeito gaiola”. Neste caso, as moléculas das enzimas, no interior da proteína, estariam firmemente espremidas pelas moléculas ao seu redor¹⁷³ à semelhança das en-

zimas imobilizadas.

Outra maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática. Solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação. Reciprocamente, os solventes hidrofóbicos por serem menos capazes de arrastar “para fora” ou deformar a camada de hidratação podem apenas afetar parcialmente a atividade catalítica.

É importante frisar que há exceções notáveis. A *xantina oxidase*¹⁶⁴, a *lipase* pancreática suína¹⁶⁵ e a *subtilisina*¹⁶⁶ mantêm suas propriedades catalíticas tanto em solventes orgânicos como em meio aquoso. Uma possível explicação para este fato é que essas enzimas são capazes de reter sua camada de hidratação tão fortemente que mesmo solventes hidrofílicos não conseguem retirar a água.

Muitas maneiras diferentes têm sido descritas na literatura para quantificar a hidrofobicidade¹⁷⁴. Os mais importantes indicadores de hidrofobicidade são: o parâmetro de solubilidade de Hildebrand, o solvatocromismo de corante, a constante dielétrica, o momento dipolar e o logaritmo do coeficiente de partição (log P).

Laane et al.¹⁷⁵ discutiram amplamente esses parâmetros e concluíram que o log P apresentava a melhor correlação com a atividade enzimática. Desta maneira, o log P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão (octanol/água), foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. Geralmente, a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos, que apresentam $\log P < 2$, é moderada em solventes tendo log P entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde $\log P > 4$.

Outro fator a ser considerado para a seleção do solvente é a solubilidade do substrato e do produto no meio¹⁷⁶. Por ex., açúcares são solúveis apenas em solventes hidrofílicos (miscíveis com a água) tais como piridina ($\log P = 0,71$) ou dimetilformamida ($\log P = -1,0$). O uso de solventes imiscíveis com a água é inviável para a catálise enzimática, pois não ocorre nenhuma interação entre o açúcar insolúvel e a enzima também insolúvel. De modo similar, compatibilidade dos produtos da reação enzimática com o solvente é crucial. Produtos polares tendem a permanecer na camada de água em torno da enzima e isto causará inibição ou reações secundárias indesejáveis. Esta situação foi encontrada na catálise de fenóis pela *polifenoloxidase* em hexano¹⁷⁷ ($\log P = 3,50$) e na oxidação do álcool benzílico pela *álcool oxidase*, também em he-

xano¹⁷⁸. No primeiro caso, os produtos polares gerados (*o*-quinonas) são insolúveis em hexano e rapidamente se polimerizam no ambiente aquoso próximo a enzima, provocando a sua inativação. Em um solvente mais polar como o clorofórmio ($\log P = 2,0$), os produtos se distribuem por todo o solvente e não inativam a enzima.

Apesar da ampla utilização do $\log P$ como parâmetro de hidrofobicidade algumas discrepâncias têm sido relatadas^{179,180}. Assim, outras propriedades do solvente como (a) constante dielétrica¹⁸¹; (b) a solubilidade molar da água em um solvente¹⁸²; (c) a associação de parâmetros: $\log P$, a constante de solubilidade de Hildebrand (δ) e ligações por pontes de hidrogênio¹⁸² e (d) combinação de hidrofobicidade, capacidade de solvatação e geometria molecular¹⁸³ têm sido utilizadas. Desta maneira, pode-se concluir que ainda não há um parâmetro quantitativo confiável que possa refletir as múltiplas interações entre enzima-solvente orgânico que permita prever, com sucesso, a atividade biocatalítica ótima em meio não-aquoso. É possível que estudos futuros, envolvendo um grande número de proteínas de natureza diferentes, possam introduzir parâmetro(s) que possibilite(m) a otimização das concentrações limites dos solventes orgânicos que retenham e/ou maximizem a atividade e a estabilidade do biocatalisador em sistemas bifásicos.

6.2.3 pH e Alteração da Especificidade Enzimática

Entre as questões intrigantes referentes a ação das enzimas em solventes não-aquosos encontra-se o pH. Todas as reações enzimáticas em água são fortemente dependentes do pH visto que o estado de ionização da enzima é essencial para a catálise. Desde que protonação e desprotonação da enzima raramente ocorrem de maneira perceptível em um meio orgânico, é levantada a questão de como a enzima reconhece o pH em solventes orgânicos anidros? A resposta é um tanto inusitada: a enzima “recorda-se” do pH da última solução aquosa a que foi exposta e isto tem sido chamado de “memória de pH”^{165,184}. A nível molecular, os grupos ionogênicos da molécula enzimática adquirem um certo grau de ionização na solução aquosa a um dado pH - e a atividade enzimática correspondente a este pH - que é mantido sem modificação nos solventes orgânicos como também no estado sólido.

Desta maneira, a capacidade tamponante do microambiente aquoso deve ser controlada e algumas substâncias como hidróclorato de triisocetilamina e ácido trifênil acético (sal sódico) têm sido adicionadas às soluções aquosas que vão ser liofilizadas ou introduzidas na fase orgânica. A perda da “memória de pH” na hidratação pode ser atribuída a redistribuição de cargas na superfície da proteína.

6.2.4 Estabilidade Térmica de Enzimas em Solventes Não-Aquosos

As moléculas de água, que se encontram em torno da molécula enzimática nas soluções aquosas, exercem um papel importante na estabilidade protéica devido, principalmente, às interações hidrofóbicas além das forças de van der Waals, pontes salinas e pontes de hidrogênio. Desta maneira, todas as reações que provocam termoinativação irreversível de enzimas envolvem água livre e a desnaturação, induzida pelo calor, necessita de uma ampla mobilidade conformacional. Assim, não é surpresa que a manipulação da natureza do meio e da quantidade de água em torno da enzima tem um profundo efeito sobre sua estabilidade.

A remoção de água da superfície da proteína, indubitavelmente, diminui os efeitos hidrofóbicos provocando a sua desestabilização. Isto conduz a uma reorganização das moléculas de água devido ao incremento do número de ligações intramoleculares por pontes de hidrogênio que contribui para a re-estabilização e aumento da rigidez da proteína. O componente predominante destas ligações intramoleculares é eletrostático. Logo, a estabilidade dessas ligações deve aumentar em solventes com baixa constante dielétrica.

Quando proteínas são expostas a temperaturas elevadas por um período prolongado, elas sofrem um processo de desenrolamento que expõe os grupos reativos e áreas hidrofóbicas mais internas, acarretando modificações químicas irreversíveis, o desordenamento monomolecular e agregação. Os processos químicos que freqüentemente levam à inativação (altamente acelerados em temperaturas elevadas) são a deamidação dos resíduos de asparagina e glutamina, hidrólise das ligações peptídicas nos resíduos de ácido aspártico, permuta dissulfeto-tiol, destruição de ligações dissulfeto, oxidação de cisteínas, isomerização de prolinas, glicação de aminogrupos e outros processos químicos¹⁸⁵. Todos esses processos exigem a participação de água e, portanto, não devem ocorrer em um microambiente livre de água como nos solventes orgânicos anidros.

Inúmeros autores têm demonstrado que suspensões enzimáticas em solventes orgânicos anidros exibem termoestabilidade bem superior do que aquelas em soluções aquosas. Um exemplo bastante ilustrativo da significativa diferença de termoestabilidade entre meio aquoso e meio orgânico é o caso da *tirosinase*. Esta enzima possui uma vida média, a 50°C, nove vezes superior em clorofórmio do que em solução aquosa¹⁸⁶.

Biossensores, em geral, operam em temperaturas ótimas para que a reação biocatalítica se processe rapidamente e tenha grande sensibilidade. Entretanto, em muitos casos, a temperatura ideal para a reação enzimática ocorrer não coincide com a condição mais favorável para os de-

mais parâmetros envolvidos no processo. O aumento da estabilidade térmica das enzimas proporcionada pelos solventes orgânicos é uma vantagem importante do ponto de vista operacional da enzima, ampliando o intervalo de temperatura onde ocorre um dado processo químico de interesse.

6.3 Aplicações Analíticas de Enzimas em Meios Não-Aquosos

O principal impulso da química industrial moderna é a busca incessante de maior especificidade nos processos bioquímicos. A falta de seletividade resulta em aumento de custos advindo dos processos de separação, purificação e tratamento de resíduos. Por outro lado, o conhecimento de que enzimas são específicas e podem funcionar vigorosamente em sistemas anidros ou com baixo conteúdo de água, tem proporcionado variadas transformações de importância biotecnológica. Klibanov^{187,188}, Dordick¹⁸⁹ e Tanaka e Kawamoto¹⁹⁰ têm revisado as inúmeras aplicações da enzimologia em meios não aquosos em síntese orgânica, lipólise e em métodos analíticos.

Aplicações e vantagens de dispositivos bioanalíticos baseados em enzimas (biossensores enzimáticos) que funcionam em fase não-aquosa têm sido demonstradas solucionando diversos problemas analíticos de indústrias de alimentos, de bebidas, farmacêuticas, petroquímicas, militar e de cosméticos, além do seu emprego na agricultura e nos diagnósticos clínicos.

Antes dessa exploração, somente uns poucos sensores enzimáticos operavam em meios não aquosos. As enzimas eram mantidas em um compartimento aquoso separadas do meio orgânico por uma membrana permeável seletiva. Um exemplo desse tipo de sensor foi idealizado pela Phillips Petroleum para a determinação do conteúdo de álcool na gasolina¹⁹¹. Ele consistia de um eletrodo de oxigênio onde a *álcool oxidase* se encontrava imobilizada na extremidade e mantida adequadamente hidratada por uma membrana externa semi-permeável. O álcool no meio aquoso poderia atravessar essa membrana e na camada onde se encontrava a enzima hidratada era biocataliticamente oxidado. A diminuição concomitante da concentração de oxigênio era medida amperometricamente. Em outros casos, a solubilidade do analito insolúvel em água era aumentada com o auxílio de detergentes. Isso, normalmente, acarretava em perda de sensibilidade do sensor tanto pela insolubilidade do analito em água como devido ao próprio detergente. Entretanto, se a enzima era capaz de funcionar em uma fase predominantemente orgânica, então analitos de baixa solubilidade em água poderiam estar em altas concentrações para a bioanálise. Independente dessa característica - aumento de solubilidade - os biossensores em fase orgânica podem oferecer outras vantagens que são mostradas na Tabela XII.

Tabela XII. Vantagens dos biossensores em fase orgânica.

Característica	Vantagem
▽ Biocatálise em meios não aquosos	▽ Aumenta o número de analitos que podem ser determinados pelos biossensores
▽ Modificação na especificidade do substrato para algumas enzimas induz a novas reações biocatalíticas	▽ Novos detectores
▽ Aumento da estabilidade térmica das enzimas	▽ Aumento da estabilidade operacional do biossensor
▽ Diminuição da contaminação microbiana	▽ Melhora a vida útil operacional do biossensor
▽ Resistência à oxidação e à redução em solventes orgânicos	▽ Amplia a janela do potencial para reações que transferem eletrons
▽ Baixa solubilidade de espécies eletroativas aquosas	▽ Diminui interferência de espécies iônicas hidrofílicas
▽ Habilidade das enzimas de permanecerem ativas em estados essencialmente desidratados	▽ Ausência de água pode facilitar a construção de sensores
▽ Solubilidade alterada dos reagentes	▽ Novas opções para a configuração de dispositivos estáveis
▽ Capacidade térmica mais baixa dos solventes orgânicos comparada com a da água	▽ Aumento da sensibilidade de termistores enzimáticos

Hall et al.^{192,193} descreveram, em 1988, o primeiro biossensor no qual o biocatalisador estava em contato direto com a fase orgânica, para a determinação amperométrica de fenóis em clorofórmio. Neste solvente, a *polifenoloxidase* catalisava a conversão do composto fenólico a benzoquinona, que era eletroquimicamente reduzida em eletrodo de carbono vítreo a -275 mV (vs ECS).

Algumas aplicações dos sensores enzimáticos, em ambientes aquo-restritos desenvolvidas nos anos recentes serão, a seguir, brevemente discutidos.

6.3.1 Eletrodos Enzimáticos de Fase Orgânica

Nos últimos oito anos, uma considerável atenção tem sido dada à pesquisa e ao desenvolvimento de biocatalisadores de fase orgânica para serem utilizados em síntese, no processamento industrial e, particularmente, como ferramenta analítica nos testes de controle de qualidade. Estes biossensores podem ser usados para a detecção, direta e específica, de analitos hidrofóbicos de uma variedade de amostras complexas que se tornam acessíveis ao microambiente enzimático devido ao meio orgânico.

Muitos dos recentes avanços nesta área têm sido obtidos utilizando-se técnicas de detecção eletroquímica que se expandiram durante as décadas de 60 e 70 usando eletrodos convencionais e solventes tais como dimetilformamida, acetonitrila, carbonato de propileno e dimetilsulfóxido. Estes solventes possuem algumas características importantes: constantes dielétricas baixas, a capacidade de solubilizar analitos orgânicos e alguns compostos inorgânicos, resistência à oxidação e à redução (ampliando a faixa de potencial de trabalho) e, geralmente, boas características de estocagem. Uma abordagem sobre eletroquímica em fase orgânica pode ser encontrada em Saini et al.¹⁹¹.

Com o desenvolvimento da tecnologia dos biossensores, outras técnicas de transdução, além da eletroquímica, têm sido exploradas. Parâmetros tais como oxigênio, gás carbônico, peróxido de hidrogênio e pH são comumente detectados nas reações biocatalíticas. Para esses e outros parâmetros, uma ampla variedade de métodos e ou sensores espectrofotométricos (absorbância, reflectância, fluorescência, fosforescência e quimio/bioluminescência), calorimétricos, piezoeletrônicos e de sensores não catalíticos, são exequíveis. Dessa maneira, a expansão da tecnologia de biossensores pode permitir o aumento potencial de suas aplicações em fase orgânica e seu uso certamente beneficiará áreas tais como a tecnologia de alimentos, diagnóstico clínico e o controle de contaminação de águas. Muito tem que ser realizado para o desenvolvimento desses novos biossensores para adequá-los a outros métodos de análise que não os eletroquímicos. Recentemente, Díaz-Garcia e Valencia-González¹⁹⁴, revisaram o emprego de sensores ópticos em meio não-aquosos, ao passo que Connor et al.¹⁹⁵ deram principal ênfase aos sensores eletroquímicos. A Tabela XIII reúne os principais transdutores desenvolvidos ao longo dos últimos anos e as correspondentes aplicações realizadas em meio orgânico.

Tabela XIII. Tipos possíveis de biossensores em meio orgânico e seus transdutores.

Base	Tipo	Aplicação	Referência
Eletroquímica			
	Amperométricos:		
		Fenol e derivados	200,201,203
		Colesterol	204
		Peróxido	205,206
	Potenciométricos:		
		Deteção da síntese de éster	207
Calorimétrico			
	Termistores:		
		Reações da lipase e da peroxidase	208
		Reações da glucose oxidase e catalase	209
		Imunossensor	210
Óticos			
	Uso de cromógenos com enzimas:		
		Análise de colesterol	162
		Sensoriamento de temperatura	211
		Análise de gases tóxicos	212

Apesar do amplo emprego de enzimas isoladas como componente biológico, preparações de células integras de microrganismos e de fontes vegetais e animais têm sido também propostas como elementos biocatalíticos dos biossensores. Tais materiais simplesmente mantêm a enzima de interesse em seu ambiente natural resultando em uma estabilização da atividade enzimática desejada, sem sacrificar, em muitos casos, a sua seletividade. Diversos exemplos de aplicações recentes dos eletrodos enzimáticos em fase orgânica estão listados na Tabela XIV.

Uma outra aplicação dos biossensores baseia-se na possibilidade do uso de mediadores insolúveis em solventes orgânicos (podem ser co-imobilizados com a enzima por adsorção) obtendo-se os chamados sensores “sem reagentes”. Schubert et al.¹⁹⁷, exploraram a oxidação do íon hexacianoferrato(II) pelo peróxido de hidrogênio na presença de *peroxidase* em vários solventes orgânicos. A forma oxidada desse íon era novamente reduzida em eletrodo de grafite em potencial próximo de zero permitindo assim a quantificação de peróxido de hidrogênio. Recentemente, Stancik et al.²¹⁴ desenvolveram um biossensor baseado em um eletrodo de Clark acoplado a uma camada biocatalítica contendo *tirosinase*. Derivados da tiouréia foram detectados em hexano e o método mostrou-se altamente sensível com limites de detecção no intervalo de 13 - 181 nmol.L⁻¹, dependendo da estrutura do composto inibidor.

TABELA XIV. Exemplos de aplicações recentes de eletrodos enzimáticos que operam em fase orgânica

Enzima	Solvente	Analito	Detetor	Limite de Detecção ^a	Referência
<i>Peroxidase</i>	Dioxano	Peróxido de hidrogênio	Eletrodo de carbono	10	197
	Etanol	Peróxidos orgânicos	Microeletrodo de carbono	1	205
	Acetonitrila	Peróxido de hidrogênio	Eletrodo de carbono ^b	0,0003	206
	Acetonitrila	Sulfetos orgânicos	Eletrodo de platina	-	207
<i>Tirosinase</i>	Etanol	Fenóis	Microeletrodo de carbono	0,7	205
	Acetonitrila	Fenóis	Eletrodo de carbono ^a	0,0001	206
	Vários	Fenóis	Eletrodo de oxigênio	0,0002	208,209
<i>Glucose oxidase</i>	Acetonitrila	Glicose	Eletrodo de carbono vítreo	-	210
<i>Polifenol oxidase</i>	Clorofórmio	Fenóis	Eletrodo de grafite	0,03	136
	Acetonitrila	Conteúdo de água	Eletrodo de carbono vítreo ^c	-	211
<i>Colesterol oxidase</i>	Hexano clorofórmio	/ Colesterol	Eletrodo de oxigênio		212
<i>Lacase</i>	Álcoois	Hidroquinona	Eletrodo de carbono vítreo	0,0006	213

a. Limite de Detecção (mmol.L⁻¹); b. enzima oculta em membranas de poliéster sulfônico; c. pasta de carbono

Há numerosas oportunidades do emprego de biossensores em fase orgânica em sistemas de análise em fluxo. Recentemente, em uma revisão, Wang²¹⁵ discutiu as vantagens de tal metodologia. Em tais sistemas, além dos benefícios já mencionados da enzimologia em meio não-aquoso, há rapidez na análise de amostras complexas sem a necessidade de pré-tratamentos, tornando-os atrativos para testes de controle de qualidade e de processos industriais. Algumas aplicações recentes desses biossensores podem ser encontradas baseadas, principalmente, no uso de *oxidases* e *dehidrogenases* (*polifenoloxidases*, *álcool dehidrogenases* e *peroxidases*)^{130,216-219}.

6.3.2 Análises em Bateladas

Diversos pesquisadores^{153,203} realizaram determinações em bateladas onde a enzima era diretamente introduzida em um meio não-aquoso e o produto formado monitorado pelo aparecimento de cor. Kazandjian et al.¹⁵³ utilizaram *cholesterol oxidase* agregada com *peroxidase* (ambas as enzimas adsorvidas em superfícies de vidro poroso) com *p*-anisidina como substrato cromogênico em diferentes solventes orgânicos, visando a análise de colesterol. Boeriu et al.²⁰³ dispersaram, homogeneamente, a *peroxidase* e o cromóforo em misturas de parafina solidificável de ponto de fusão adequado como um protótipo de um sensor aplicável a materiais alimentares e farmacêuticos termo-sensíveis. Com o aumento da temperatura, alterava-se a fase do meio, diminuindo as barreiras difusionais, facilitando assim a catálise enzimática. Como resultado ocorria modificação de cor, que era monitorizada visualmente.

6.3.3 Reatores Enzimáticos que Operam em Sistemas Analíticos em Fluxo

Braco et al.²²⁰, foram os primeiros a realizar uma avaliação sistemática das possibilidades de implementação de sistemas analíticos em fluxo empregando solventes orgânicos. Esses autores adaptaram, para condições em fluxo, a análise para colesterol. Neste trabalho, a viabilidade de utilização de um reator bienzimático imobilizado não covalentemente para determinações em fluxo em meio anidro (tolueno) com detecção espectrofotométrica foi demonstrada, com a vantagem de apresentar ainda um notável melhoramento em relação ao sistema em batelada. Com esse sistema, os autores obtiveram respostas lineares de 1×10^{-6} até $1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de colesterol, com uma frequência analítica de 60 amostras por hora. Em adição, tais reatores puderam ser utilizados por até 4 meses, período muito superior ao alcançado em meio aquoso.

Outro sistema em fluxo, útil para a determinação de colesterol em alimentos (limite de detecção de 5×10^{-5} mol L⁻¹) foi idealizado por Valencia-González e Diaz-Garcia²²¹. Esse sistema

consiste de materiais bioativos - *cholesterol oxidase* e *peroxidase* - co-imobilizados sobre vidro poroso, em associação com uma resina aniônica carregada com material fluorescente, sensível à oxigênio. A quantificação de colesterol neste caso foi obtida de forma indireta, via diminuição de fluorescência, provocada pelo consumo de oxigênio, quando da reação enzimática:

O peróxido de hidrogênio gerado é consumido, concomitantemente, objetivando prevenir a inativação da *cholesterol oxidase* e favorecer a reação anterior.

A utilização de sensores enzimáticos em fluxo, apesar de altamente vantajosa requer, no caso das enzimas liofilizadas, sua fixação na superfície ou no interior do eletrodo. No caso dos tecidos vegetais utilizados neste estudo, a enzima já se encontra naturalmente imobilizada, podendo ser adequadamente explorada, como será visto nas próximas seções.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1 Fontes Vegetais da Enzima

Ao longo deste trabalho, foram utilizadas duas fontes vegetais de PPO naturalmente imobilizadas:

(a) cocos (*Cocos nucifera*, L.), no estágio verde, obtidos em postos de venda de frutas na cidade de São Paulo-SP, Brasil, e estocados em temperatura de refrigeração (4° C). O mesocarpo, o tecido fibroso do coco, foi picado com uma faca inox sobre uma placa de vidro e parte de sua umidade era extraída por expressão em papel absorvente. Na construção de bioreatores o tecido continha $33 \% \pm 5 \%$ de água. Nos experimentos para a determinação do conteúdo de água em meio aquo-restrito, o material tissular utilizado nos bioreatores possuía, após processo de desidratação descrito a seguir, $6 \% \pm 2 \%$ de água. A determinação de umidade destes tecidos foi realizada por gravimetria (110° C, até peso constante).

(b) as frutas da palmeira leque (*Latania* sp) foram coletadas na cidade do Guarujá - SP e no campus universitário da Universidade de São Paulo - SP, sendo estocadas em temperaturas de refrigeração antes do uso. A polpa e a casca destas frutas, no estágio verde, eram picadas utilizando procedimento semelhante ao do MFC. Os ensaios com tecidos desidratados (ver texto), foram mantidos à temperatura ambiente dentro de frascos de vidro e usados para a preparação de eletrodos de pasta de carbono (EPC). Este material foi utilizado, durante seis meses, na construção de bioreatores e de EPC biologicamente modificados (EPCBM) e continua com atividade enzimática após mais de dois anos de prateleira.

2 Soluções e Reagentes

Todas as substâncias químicas utilizadas apresentavam grau analítico. Catecol, fenol, resorcinol, ácido gálico, ácido cafeico, *l*-tirosina, dopamina, cafeína, *dl*-DOPA, 4-acetilamidofenol, ácido benzóico, *l*-ácido ascórbico, *l*-cisteína, *l*-cistina, cianeto de potássio, *p*-benzoquinona, ácido clorogênico, frutose, glicose, sacarose, ácido bórico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido acético e hidroquinona foram adquiridos da Sigma Chemicals. Ácido 3-hidroxibenzóico, *o*-, *m*- e *p*-fenilenodiamina, *o*-, *m*- e *p*-cresol, 1-nitroso-2-naftol, 4-fenilfenol e 1-naftol foram obtidos da Aldrich. Ácido cinâmico, EDTA (sal sódico), fosfato monossódico, fosfato dipotássico, cloreto de sódio, nitrato de cádmio, nitrato de mercúrio, nitrato de zinco, tiouréia, dodecil sulfato de sódio, azida sódica, hidróxido de sódio, acetonitrila,

ácido clorídrico, sulfito de sódio, cloreto de benzalconio e *tirosinase* foram obtidos da Merck e pirogallol da Riedel. Todas as soluções foram preparadas, utilizando água filtrada, destilada e deionizada obtida através de sistema de purificação comercial Nanopure (18 M Ω). O eletrólito de suporte utilizado foi uma solução de tampão fosfato - STF, 50 mmol L⁻¹, pH 6,0 (com os tecidos do coco) ou pH 5,7 (polpa/casca da palmeira-leque).

3 Avaliação dos Parâmetros Cinéticos e Térmicos da PPO Naturalmente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco

3.1 Análise em Fluxo Contínuo com Detecção Espectrofotométrica

Para avaliar os parâmetros de atividade, bioquímicos, de termorresistência e de Arrhenius da PPO naturalmente imobilizada no MFC, foi desenvolvido um sistema em fluxo contínuo com detecção espectrofotométrica. Na Figura 14 é apresentado um diagrama esquemático deste sistema. O arranjo consistiu de um becker de 200 mL, o reator, colocado no interior de uma caixa de termostatização, ambos sobre um agitador magnético. No centro do becker foi posicionado um cilindro de plástico cuja extremidade inferior foi colocada uma rede de nylon fixada com um O-ring, como mostrado no detalhe. Esta rede tinha a finalidade de reter o material particulado. Um segundo filtro, constituído de um cilindro com lã de vidro, foi empregado para evitar a passagem de pequenas partículas do MFC em suspensão. Uma bomba peristáltica Ismatec, modelo 7331-10 foi usada para impulsionar a mistura através de condutos de silicone e de polietileno (extensão 1,60 m x 0,8 mm) até o detetor, um espectrofotometro Hitachi Instruments, modelo U-2001 UV/Vis e o retorno da solução para o reator. Uma célula espectrofotométrica foi adaptada para este sistema. Em uma cobertura de borracha inseriram-se uma tubulação de entrada que ia até o fundo e uma de saída, 1,3 cm acima, para diminuir o volume morto e minimizar a dispersão. Os experimentos foram realizados em temperatura controlada usando um banho termostático Forma Temp Jr - Forma Scientific. A vazão utilizada foi de 5,6 mL min⁻¹.

3.2 Limpeza do Sistema

Para evitar interferências na resposta analítica entre os diferentes experimentos, todo o sistema era lavado. Inicialmente, eram circulados 35 ml de etanol por cinco minutos. A seguir, 25 ml de água deionizada eram mantidos em fluxo durante três minutos e, finalmente, 15 ml de solu-

Figura 14. Diagrama esquemático do sistema de soluções em fluxo contínuo com detecção espectrofotométrica. (a) agitador magnético; (b) solução tampão fosfato, substrato, mesocarpo fibroso do coco; (c) cilindro plástico; (d) caixa termostatizadora; (e) conduto para a célula; (f) filtro; (g) bomba peristáltica; (h) conduto para a célula; (i) espectrofotômetro; (j) conduto da célula para o reator; (k) registrador; (l) célula espectrofotométrica; (m) cobertura de borracha; (n) solução na célula espectrofotométrica; (o) tubulação entrada célula espectrofotométrica; (p) tubulação saída célula espectrofotométrica; (q) O-ring; (r) tela de nylon; (s) suporte para prender o cilindro plástico na parte central do reator.

ção tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0 (STF) eram bombeados em todo o conjunto por dois minutos. Este procedimento foi adotado para eliminar os produtos de polimerização (solúveis em etanol) que se depositavam no interior do tubo e na célula espectrofotométrica.

3.3 Espectro de Absorção Molecular Uv-Visível dos Produtos da Oxidação do Catecol

Os espectros de absorção dos produtos da oxidação do catecol catalisada enzimaticamente em diferentes intervalos de tempo (0 a 30 min) foram obtidos e registrados em um espectrofotometro Hitachi (modelo U2001 UV/VIS), utilizando-se uma solução padrão (SP) contendo 25 mmol L⁻¹ de catecol, 0,2 g de MFC em 100 mL de STF, à temperatura de 25° C. O comprimento de onda característico de produtos quinóides foi utilizado em todos os outros experimentos.

3.4 Efeito do pH na Atividade da PPO

A atividade da PPO em função do pH foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se a SP em valores de pH no intervalo de 4,0 a 8,0 obtidos empregando soluções de NaOH 1 mol L⁻¹ ou HCl 1 mol L⁻¹. O pH ótimo, determinado nesta etapa, foi utilizado em todos os outros experimentos.

3.5 Efeito da Temperatura na Atividade da PPO

A estabilidade térmica da PPO foi determinada usando-se a SP em temperaturas que variaram de 22° a 80° C. Esta solução era aquecida até a temperatura teste. Após atingir esta condição o tecido era adicionado. A atividade da PPO era medida como descrito anteriormente.

3.6 Determinação da Atividade da PPO

A atividade da PPO foi determinada medindo-se espectrofotometricamente o aumento da absorbância a 404,5 nm a 25° ± 2° C em uma mistura de reação que continha 25 mmol de catecol em 100 mL de STF e uma quantidade variável do MFC (0,05 a 0,6 g). A velocidade de reação foi determinada tomando-se os coeficientes de regressão das curvas de atividade. Uma unidade de atividade da PPO foi definida como a quantidade de MFC que provocava uma modificação de 0,001 unidade de absorbância por minuto a 404,5 nm por grama de mesocarpo fibroso do coco na mistura de reação.

3.7 Efeito da Concentração de Substrato

A constante de Michaelis-Menten (k_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas espectrofotometricamente utilizando-se catecol como substrato em várias concentrações (5 a 50 mmol) e concentração fixa de MFC (0,2 g), em condições ótimas de pH, temperatura e força iônica. As constantes (k_m e V_{max}) foram calculadas a partir dos coeficientes angulares e de regressão das velocidades iniciais das curvas obtidas em função da concentração de substrato de acordo com o método de Lineweaver-Burk.

3.8 Especificidade da PPO a Alguns Substratos

Alguns compostos mono-, di- e polihidroxifenóis foram usados para a determinação de especificidade da PPO. Os substratos empregados foram adicionados a uma mistura de reação padrão (0,2 g de MFC em 100 ml de STF) para proporcionar uma concentração final de 25 mmol e seguiu-se procedimento espectrofotométrico anteriormente descrito.

3.9 Efeitos de Inibidores na Atividade da PPO

Os efeitos de inibidores na atividade da PPO foram determinados usando como substrato 25 mmol L⁻¹ de catecol com uma quantidade fixa de tecido (0,2 g) em 100mL de STF na presença de várias concentrações de inibidores. Medidas espectrofotométricas foram empregadas como previamente citadas. Para alguns inibidores, a reação enzimática foi caracterizada por um período de indução. Nestes casos, as atividades foram calculadas a partir da velocidade de modificação na absorbância imediatamente posterior a esse período. Os resultados foram expressos como % de inibição da reação enzimática com o substrato catecol.

4 Determinação de Catecol e Outros Compostos Fenólicos, Conteúdo de Água e Sulfito

4.1 Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica

Um sistema de soluções em fluxo contendo um bioreator empacotado inserido entre uma válvula injetora de amostra e uma célula eletroquímica do tipo “wall-jet” foi usado em todos os experimentos. A Figura 15 apresenta, em detalhes, o bioreator e a célula eletroquímica. O sistema completo inclui um potenciostato EG&G PAR (modelo 400 EC) em conexão com um registrador x-t Linseis (modelo X-T L6512B), uma bomba peristáltica Ismatec (modelo 7331-10) e uma válvula injetora Rheodyne (modelo 5020), com um “loop” para a injeção de 100 µL de amostra. O

Figura 15. Representação esquemática do sistema FIA com detecção amperométrica. (a) eletrólito; (b) bomba peristáltica; (c) injetor de amostras; (d) reator empacotado; (e) tubos de silicone para adaptação de dutos de entrada e saída; (f) lã de vidro; (g) partículas do tecido; (h) cilindro de vidro; (i) célula amperométrica do tipo "wall-jet"; (j) entrada de solução; (k) saída de solução; (l) célula de vidro; (m) tampa de polietileno; (n) eletrodo de Ag / AgCl_{sat.}; (o) eletrodo de carbono vítreo; (p) eletrodo auxiliar de platina; (q) detetor eletroquímico; (r) registrador x-t.

eletrodo de referência de Ag/AgCl_{sat}, o eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (diâmetro de 3 mm) inseriam-se na célula através de orifícios efetuados na cobertura de Teflon®.

4.2 Reatores Empacotados

Partículas muito finas do MFC ou da polpa / casca dos frutos da palmeira leque eram introduzidas no interior de um cilindro de vidro (3 cm x 3 mm). Nas extremidades deste reator, foram colocadas lâ de vidro, com a finalidade de reter o tecido vegetal no interior do reator, evitando o entupimento da tubulação.

Na determinação do conteúdo de água, as partículas do MFC, obtidas como descrito anteriormente, foram submetidas a uma desidratação prévia, da seguinte maneira: aproximadamente, 1,0 g de MFC era colocado em erlenmeyer e lavado, sob agitação, no mínimo três vezes, com acetonitrila (30 mL) e filtrado em papel de filtro comum. O material obtido era colocado novamente em 30 mL deste mesmo solvente e submetido a evaporação em dessecador e à vácuo. A preparação do reator empacotado seguia a metodologia usual.

4.3 Procedimentos

Uma vazão de 2,8 mL min⁻¹ foi usada em todos os experimentos (exceção dos estudos de inibição dos íons sulfito, 3,5 mL min⁻¹). A *o*-quinona produzida a partir do catecol foi eletroquimicamente monitorada por amperometria em um potencial aplicado de -0,1 V vs Ag / AgCl_{sat}, à temperatura ambiente (23° C ± 2° C). O posicionamento do reator, muito próximo ao da célula amperométrica, foi importante para minimizar a dispersão do analito e consequentemente o alargamento do pico. A distância entre o reator e o detector era de cerca de 5 cm, apenas, minimizando a dispersão.

Na maioria dos métodos desenvolvidos foi utilizada como fluido carregador STP, pH 6,0 (experimentos com o MFC) ou 5,7 (experimentos com *Latania* sp). Exceções nas determinações do conteúdo de água, onde o eletrólito de suporte foi uma solução de cloreto de benzalcônio 50 mmol.L⁻¹, em meio de acetonitrila.

4.4 Experimentos em Batelada

Estes experimentos foram realizados em um analisador polarográfico (EG&G, modelo 264) conectado a um registrador x-y (EG&G modelo RE 0089) ou x-t (Linseis modelo 6512B). Na preparação dos EPCBM, a polpa “in natura”, a polpa desidratada e a casca das frutas da pal-

meira leque, foram picadas com faca inox e, quando necessário, moidas. Os EPCBM foram preparados misturando-se 0,5 g de pó de grafite (Acheson 38, Fisher), 0,4 g de óleo mineral (Aldrich) e 0,1 g do tecido de *Latania* sp. Após mistura cuidadosa e manual, uma porção de pasta foi empacotada firmemente no final de um cilindro de vidro (3 cm x 3 mm) com bastão de cobre (50 mm) previamente fixado em uma das extremidades. A superfície foi alisada em papel comum.

IV. TRABALHOS DESENVOLVIDOS

IV.1

**Determinação das Características Bioquímicas de *Polifenol Oxidase*
Naturalmente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco Empregando
Análise em Fluxo Contínuo com Detecção Espectrofotométrica**

1 Introdução

O coqueiro-da-baía ou da praia (*Cocos nucifera* L.) é uma das mais importantes e úteis palmeiras do mundo²²². A distribuição geográfica dessa monocotiledônea, no Brasil, vai desde o extremo Norte até o Rio de Janeiro, não sendo encontrada nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Cosmopolita, é a mais cultivada e utilizada drupa no mundo. A fruta do coqueiro, o coco, é de tamanho grande, quase sempre arredondada, embora não raro, apareçam tipos alongados. Consta, de fora para dentro: a) do *epicarpo*, película fina, lisa, que envolve exteriormente a fruta; b) do *mesocarpo*, camada bastante grossa, fibrosa, acastanhada, quando seca e c) do *endocarpo*, lenhoso, duríssimo - de coloração escura, na fruta madura. Quando verde, a fruta contém, a princípio, na sua parte mais interna, água, saborosa, refrigerante, doce, levemente acidulada, muita rica em fósforo e potássio. Durante o seu amadurecimento, a quantidade dessa água vai diminuindo e uma camada branca, a *amêndoa*, carnosa, começa a revestir, internamente, o *endocarpo* (Figura 16). Este tecido é muito rico em óleo, carboidratos e quantidades moderadas de proteínas sendo amplamente empregado nas indústrias de alimentos.

Figura 16. Corte transversal do coco mostrando sua morfologia interna.

Foi verificado que o *mesocarpo* do coco, o tecido localizado entre o *epicarpo* e o *endocarpo*, quando exposto ao ar, escurece rapidamente. Este escurecimento deve estar relacionado a

uma elevada atividade catalítica da PPO presente nesta fruta. Alguns estudos têm descrito as características culturais, fisiológicas, práticas pós-colheitas e possibilidades de aproveitamento industrial do coco. Entretanto, a caracterização bioquímica da PPO - isolada ou naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco - MFC, não tem sido registrada.

Em frutas e hortaliças, tem sido comprovado que a enzima *polifenol oxidase* (PPO) catalisa a oxidação aeróbia de uma grande variedade de substratos fenólicos resultando na formação de pigmentos escuros^{2,223-227}. Esta enzima é capaz de catalisar duas reações distintas: (1) a hidroxilação de monohidroxifenóis a *o*-dihidroxifenóis devido a sua atividade *cresolase* (atividade *monofenolase*) e (2) a desidrogenação dos *o*-dihidroxifenóis a *o*-quinonas devido a sua atividade *catecolase* (atividade *difenolase*). As *o*-quinonas são espécies químicas muito reativas. Assim, uma vez formadas, podem se polimerizar não-enzimaticamente gerando produtos coloridos - as melaninas, como resultado de reações químicas do tipo Maillard, entre os açúcares redutores e aminoácidos, especialmente em temperaturas superiores a 25 °C^{17,58}.

A afinidade da PPO por um dado substrato difere acentuadamente de uma fonte para outra sendo inibida por um considerável número de substâncias tais como agentes complexantes, agentes redutores, íons inorgânicos e substratos análogos^{225,226}. Outros inibidores que têm sido reportados são proteínas, peptídeos e aminoácidos que afetam a atividade reagindo com a *o*-quinona produzida ou quelando-se com o cobre do seu sítio ativo^{225,228}.

Como PPO está amplamente distribuída nos tecidos de plantas superiores e inferiores, as suas características bioquímicas têm sido intensamente estudada. Inúmeras técnicas foram desenvolvidas para prevenir eventuais perdas na atividade da PPO durante as etapas de isolamento e purificação, cada uma delas com abordagem distinta dependente da característica da planta.

Ensaio espectrofotométricos têm sido utilizados para determinar a atividade *difenolase* da PPO. Alguns ensaios cinéticos medem o surgimento das quinonas geradas nas reações enzimáticas²²⁹ ou outros intermediários da biossíntese da melanina tais como aminocromo²³⁰ e melanocromo²³¹. Outros métodos estão baseados na reação de associação da *o*-quinona correspondente com ascorbato²³², NADH²³³, *l*-prolina²³⁴, cisteína²³⁵, e outras substâncias cromogênicas²³⁶. Recentemente, Gauillard et al.²³⁷ determinaram a atividade *difenolase* da PPO baseando-se na reação estequiométrica da cisteína com a *o*-quinona durante a oxidação enzimática de *o*-difenois. A estabilidade dos reagentes ou dos produtos, a sensibilidade e aplicabilidade das enzimas de diferentes fontes são problemas associados com tais análises. Nestes ensaios podem ser utilizados

os mais diversos substratos fenólicos medindo-se a absorbância dos pigmentos solúveis por espectrofotometria em 360 - 500 nm (freqüentemente próximo de 400 nm) ou medindo-se o consumo de oxigênio.

Em quase todos os estudos cinéticos envolvendo enzimas naturais estas são usadas na forma de extratos ou purificadas. Assim, há consumo de reagentes e de tempo para o isolamento e a purificação das enzimas, além de um trabalho enfadonho. Deve-se ressaltar que na etapa de isolamento, pode ocorrer a diminuição da atividade enzimática devido a interação da enzima com os agentes de separação ou com os substratos fenólicos presentes no tecido fragmentado. Adicionalmente, a enzima sendo utilizada na forma solúvel, momentaneamente, pode criar um sistema não homogêneo, interferindo nas medidas espectrofotométricas iniciais. Mesmo eliminando estas conjecturas, a atividade enzimática em solução pode ser muito diferente daquela apresentada em seu ambiente natural (imobilizada).

No decorrer de nossos estudos, foi desenvolvida uma maneira simples para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes de enzimas imobilizadas. Está baseada na associação de FLA e medidas espectrofotométricas contínuas. O arranjo, aqui desenvolvido, mesmo utilizando grandes volumes de soluções (50 - 200 ml), permite minimizar dificuldades advindas da homogeneização de aeração. A substituição rápida do oxigênio é favorecida pela agitação constante da solução e por sua circulação no sistema em fluxo. A concentração deste analito pode ser considerada constante ao longo de todo o processo reativo e isto, indubitavelmente, favorece a cinética da reação enzimática.

Com o objetivo de se obter um melhor entendimento das características bioquímicas da PPO naturalmente imobilizada no MFC, de suas propriedades e comportamento em sistemas de soluções em fluxo com relação ao pH, à temperatura e à especificidade de substratos como também do efeito de inibidores, propôs-se investigar estes aspectos, neste estudo. Os resultados experimentais são apresentados nos itens seguintes.

2 Resultados e Discussão

Espectros de absorção

Uma solução de catecol em tampão fosfato pH 6,0 é incolor e é caracterizada por um pico máximo de absorbância em 265 nm e dois picos menores em 341 e 382 nm. Quando uma solução de catecol é incubada na presença de PPO naturalmente imobilizada, o produto da reação mostra um pico de absorção a 404,5 nm que pode ser considerado como característico da absorção de

produtos quinóides²³⁸. A Figura 17 mostra os espectros de absorção dos produtos da reação de oxidação do catecol catalisada pela PPO em função do tempo. Observa-se um aumento gradual na absorbância a 404,5 nm ao contrário do que ocorre com a enzima isolada (purificada ou em extrato bruto). Isto pode ser atribuído a (1) restauração imediata do oxigênio consumido uma vez que a solução no reator era vigorosamente agitada e bombeada para a célula ou (2) à dificuldade, por efeitos estéricos, dos produtos de oxidação do catecol se associarem à enzima tendo em vista que a mesma se encontra naturalmente imobilizada. Em adição a este pico, há uma grande absorção em torno de 295 nm. Aqui, o aumento de intensidade a 295 nm, provavelmente, corresponde à formação de um “aduto” da *o*-quinona com os aminoácidos da proteína²³⁸. Este fenômeno foi também observado na oxidação do catecol com a PPO da cereja²³⁹.

A enzima, isolada e purificada, apresentou também os picos de absorção característicos de produtos quinóides a 404,5 nm e do produto da associação da quinona com os aminoácidos da proteína em torno de 295 nm porém, ao contrário da PPO naturalmente imobilizada, após atingir um máximo de absorbância - aproximadamente em 2,0 min de reação - ocorreu uma diminuição gradual desta quando do progresso da reação (Figura 18). Esta diminuição na intensidade a 404,5 nm é possivelmente devido ou (1) a associação covalente da *o*-quinona com aminoácidos reativos na vizinhança do(s) sítio(s) ativo(s) da enzima, tornando-os inacessíveis ao catecol ou (2) à catálise da *o*-quinona via degradação de Strecker²³⁸. Outros autores²⁴⁰ sugerem a formação de um aduto entre quinona-*tirosinase* como causa da desativação enzimática. Testes controle foram também realizados para a obtenção dos espectros de absorção, durante 15 min, de duas maneiras: (1) uma solução contendo apenas STP e catecol e (2) STP + PPO do MFC. Em ambos os casos nenhuma variação na absorbância foi verificada.

Efeito do pH

O pH ótimo para a oxidação enzimática do catecol em STP encontra-se situado no intervalo 5,0 e 6,0. Estes valores estão de acordo com as medidas de pH efetuadas para o suco expressado do MFC de várias frutas, que se situou sempre entre 5,2 e 5,7. Inúmeros autores^{33-36,40,42,44,47} encontraram o pH ótimo da PPO no intervalo entre 5,0 e 7,0. Pode ser observado nas Figuras 19 e 20 que há uma rápida diminuição na atividade da PPO naturalmente imobilizada em pH menores que 5,0 e maiores que 6,0. Há uma abrupta diminuição na atividade em pH menos ácidos tendo em vista que a atividade da PPO envolve resíduos de histidina no processo de oxidação²⁴¹. Estes valores de pH (> 6,0) podem acarretar (1) modificação conformacional da enzima e/ou (2) a enzima

Figura 17. Espectros de absorção dos produtos de oxidação do catecol catalisada pela *polifenol oxidase*, naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco em função do tempo (intervalos de 1,5 min).

Figura 18. Espectros de absorção dos produtos de oxidação do catecol catalisada pela *tirosinase* de cogumelos, isolada e purificada, em função do tempo (intervalos de 1,5 min).

Figura 19. Efeito do pH em função do tempo sobre a atividade da *polifenol* oxidase, naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco (25 mmol de catecol em 100 mL de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C).

Figura 20. Efeito do pH sobre a atividade da *polifenol oxidase*, naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco, após 30 min (25 mmol de catecol em 100 mL de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C).

pode reagir mais rapidamente com a *o*-quinona produzida através da reação de Maillard e/ou degradação de Strecker e/ou (3) a *o*-quinona produzida pode sofrer rápidas reações secundárias que são catalisadas nestes meios de pH elevados. Em meios mais ácidos podem ocorrer variações mais drásticas e irreversíveis na estrutura protéica considerando que os grupos COO^- carregados negativamente podem ser neutralizados, deixando os grupos NH_3^+ positivamente carregados e livres para exercer repulsão eletrostática, agravando assim a distorção e o desdobramento da molécula.

Estabilidade Térmica da PPO Naturalmente Imobilizada

Experimentos foram conduzidos para verificar a atividade da PPO naturalmente imobilizada em função da temperatura em intervalos de tempo diferentes usando catecol como substrato e em STP pH 6,0. Uma diminuição progressiva na atividade ocorreu quando a temperatura aumentou de 25° para 75° C como mostrada na Figura 21. Por estes dados, a temperatura ótima para máxima atividade da PPO é de 25° C. Pode-se verificar também que o declínio de atividade nos primeiros 10 min parece seguir cinética de primeira ordem.

Baseado nesta observação, uma curva de inativação em escala semi-logaritmica foi obtida relacionando a modificação da atividade vs tempo de aquecimento nas temperaturas de 35°, 45°, 58° e 75° C (Figura 22). Das inclinações obtidas, as constantes de velocidade da reação (valores k) foram calculados usando análise de regressão das linhas retas para cada curva de aquecimento.

As energias de ativação, E_a , foram calculadas utilizando a equação de Arrhenius (eq. 10). Os logaritmos naturais dos valores k ($\ln k$) para cada tratamento tempo-temperatura foram plotados vs o recíproco das temperaturas de aquecimento ($1/T$) (Figura 23). O valor E_a foi computado pela multiplicação da inclinação pela constante dos gases $R = 1,987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

O valor de E_a para o calor de inativação da PPO naturalmente imobilizada foi de $10,5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este valor de E_a é muito superior ao reportado por Oktay et al.²⁴² para PPO de maçã variedade Amasya, próximo ao de McCord e Kilara²⁴³ para cogumelo ($8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) e bem inferior àqueles registrados por Yemenicioglu et al.²⁴⁴ para diversas variedades de maçã ($54,1$ a $77,2 \text{ kcal mol}^{-1}$), Aquilera et al.²⁴⁵ para uva “sultana” ($16,6 - 19,4 \text{ kcal mol}^{-1}$) e Ansah²⁴⁶ para arroz ($19,4 \text{ kcal mol}^{-1}$), Palmer⁴⁹ para banana ($18,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) e Vámos-Vigyázó²²⁴ para banana (85 kcal mol^{-1}). Este baixo valor de E_a implica que há necessidade de uma modificação elevada na temperatura para inativar a PPO naturalmente imobilizada do MFC. É interessante frisar que a atividade da PPO é dependente não somente da temperatura mas também do tempo de exposição da enzima nesta temperatura.

Figura 21. Efeito da temperatura sobre a atividade da *polifenol oxidase*, naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco (0,2 g de fibra de coco + 25 mmol de catecol em 100 mL de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C).

Figura 22. Efeito do tempo de aquecimento e temperatura sobre a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco (0,2 g de fibra de coco + catecol 25 mmol em 100 ml de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0).

Figura 23. Determinação da energia de ativação da reação de oxidação do catecol pela *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco.

O valor D , isto é, a duração do tratamento térmico a uma dada temperatura necessária para reduzir a atividade para 10 % de seu valor original, foi calculado pelo uso da relação entre k e D (eq. 31). Os valores D nas temperaturas de 35°, 45°, 58° e 75° C para a PPO naturalmente imobilizada foram 75,3, 48,9, 37,6 e 14,2 min, respectivamente. Strubi et al.²⁴⁷ encontraram um valor D de 0,24 min para PPO de maçã (purê) a 75° C.

O valor z , modificação na temperatura (°C) necessária para alterar o tempo de inativação térmica por um fator de 10 foi determinado utilizando-se os valores de D calculados anteriormente (Figura 24). O valor z para a PPO naturalmente imobilizada foi 55,2° C. Vamos-Vygyazo²²⁴ registra que os valores z de PPO de inúmeras frutas encontram-se no intervalo de 8,5 - 10,1 °C. Strubi et al.²⁴⁷ obtiveram um valor z de 10 °C para PPO em purê de maçã. Há alguns registros de valores de z elevados. Heil et al.²⁴⁸ encontraram valores z de 16° e 61,5° C para a PPO de damascos.

O coeficiente de temperatura (Q_{10}), outro termo empregado para descrever a dependência de uma reação à temperatura, foi calculado da relação dos valores k a 75° C e a 65° C (valor calculado utilizando a equação de regressão $\ln k (\text{min}^{-1}) = 13,31 - 5280 \frac{1}{T (\text{K})}$, Figura 22). O valor obtido foi 1,63.

As meias-vidas, $t_{1/2}$, foram determinadas da seguinte equação

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / k \quad (47)$$

O tempo requerido para a redução de 50 % da atividade inicial da PPO naturalmente imobilizada no MFC nas temperaturas de 45°, 58°, 75° C foram, respectivamente 14,7, 11,4 e 4,3.

Na Tabela XV são apresentados, resumidamente, os parâmetros de resistência térmica e de Arrhenius, para a inativação da PPO naturalmente imobilizada no MFC.

TABELA XV. Parâmetros de resistência térmica e de Arrhenius para a inativação da *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco em função da temperatura.

Temperatura (°C)	k (10^2 min^{-1})	D (min)	$t_{1/2}$ (min)	z (°C)	Q_{10} (65° - 75° C)	E_a (kcal mol ⁻¹)
35	3,1	75,3	22,7			
45	4,7	48,9	14,7	55,2	1,63	10,5
58	6,1	37,6	11,4			
75	16,1	14,2	4,3

Figura 24. Determinação do parâmetro térmico z da *polifenol oxidase*, naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco.

Atividade e Parâmetros Cinéticos da PPO Naturalmente Imobilizada

Como mostrado na Figura 25, a produção de *o*-quinona foi registrada como absorbância por unidade de tempo em função da quantidade de tecido. As velocidades desta produção foram plotadas novamente em função da quantidade de MFC (Figura 26). Da análise dessa figura, pode-se concluir que para se obter uma modificação de 0,001 unidade na absorbância por minuto são necessários 2,5 mg de tecido vegetal.

A constante aparente de Michaelis-Menten (k_m) para a PPO naturalmente imobilizada foi determinada estudando a formação do produto em várias concentrações de substrato (o catecol) (Figura 27). Plotando-se o recíproco da atividade enzimática contra o recíproco da concentração do substrato, uma linha reta foi obtida no gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 28). Os valores determinados foram 9,1 mmol e 0,2 unidades de absorbância por minuto. O valor da constante de Michaelis-Menten aqui encontrado está em acordo com aquelas constantes obtidas para as PPO de cacau²⁴⁹, de folhas de espinafre²⁵⁰ e de frutas verdes de oliveiras²⁵¹. Valores de k_m menores foram registrados para batata doce²⁵² e cacau²⁴⁹, enquanto valores maiores foram encontrados para palmito²⁵³ e batata inglesa²⁵⁴. É importante ressaltar que as constantes obtidas no presente estudo foram de enzimas imobilizadas naturalmente e, nos estudos anteriormente mencionados, as constantes apresentadas foram obtidas usando extratos ou enzimas isoladas e purificadas.

Especificidade da PPO Naturalmente Imobilizada do MFC

A atividade relativa da PPO naturalmente imobilizada no MFC junto a diferentes substratos no pH ótimo é mostrada na Tabela XVI. Os resultados indicam que a enzima catalisa a oxidação de dihidroxifenóis, mas é inativa para monofenóis. A ordem de atividade observada foi ácido cafeico > pirogallol > catecol. A resposta da atividade da PPO sobre diferentes substratos pode ser considerada similar a aqueles registrados para outras fontes vegetais^{18-24,35,239,255,257}. A enzima imobilizada é uma *o*-difenol oxidase com nenhuma atividade cresolase presente. Algumas PPO de origem vegetal podem possuir ambas atividades. Entretanto, muitas PPO não possuem atividade monofenolase^{27,239,256}.

Efeito de Inibidores

Os efeitos de vários inibidores sobre a PPO naturalmente imobilizada do MFC utilizando catecol como substrato, foram determinados (Tabela XVII).

Figura 25. Influência da quantidade de fibras do coco na oxidação do catecol 25 mmol (solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C) em função do tempo (partes lineares).

Figura 26. Influência da quantidade de fibras de coco na velocidade de oxidação de 25 mmol L^{-1} de catecol (solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 6,0, temperatura 23°C) em função do tempo (partes lineares).

Figura 27. Efeito da concentração de catecol (0,2 g de fibra de coco em 100 mL de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C) sobre a absorbância em função do tempo (partes lineares).

Figura 28. Gráfico duplamente recíproco (Lineweaver-Burk) de $1 / v_o$ contra $1 / [\text{catecol}]$ para a reação catalisada por *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco (0,2 g de fibra de coco em 100 ml de solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, temperatura 23 °C).

TABELA XVI. Especificidade de substrato da *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco*

Substrato (mmol L ⁻¹)	Comprimento de Onda (nm)	Absorbância	Atividade Remanescente (%)
Monofenóis			
Fenol (10)	-	0	0
4 acetamidofenol (10)	-	0	0
<i>l</i> -tirosina (10)	381	0,110	1,3
p-cresol (10)	381	0,024	2,9
Difenóis			
Catecol (10)	404	0,830	100,0
Ácido cafeico (saturada)	355	2,350 ¹	283,1
Dopamina (10)	473	0,125	15,0
Ácido clorogênico (1)	-	0	0
<i>l</i> -Dopa (10)	-	0	0
Outras substâncias			
Pirogalol (10)	291	2,142	257,8
1,4 benzoquinona (10)	423	0,260	31,3
Ácido gálico (10) ²	385	0,052	6,3
Ácido cinâmico (10)	-	0	0

* Os valores desta tabela foram obtidos após 30 min de reação, em solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0. Cada experimento foi realizado utilizando-se 0,2 g de mesocarpo fibroso do coco em 100 mL de solução. A atividade remanescente é expressa em relação ao catecol. As concentrações dos substratos são mostradas entre parênteses.

Os nitratos de cádmio, zinco e mercúrio(I) foram capazes de inibir irreversivelmente a PPO naturalmente imobilizada no MFC. Íons de metais são capazes de formar mercaptídeos com os grupos sulfidrílicos podendo se complexar também com outros grupos - o imidazólico, carboxílico e peptídico da enzima provocando inativação devido a efeitos estéricos ou a própria desnaturação da proteína.

Há uma significativa diminuição na atividade da PPO naturalmente imobilizada pelo cianeto de potássio, tiouréia, *l*-cisteína, ácido ascórbico e sulfito de sódio. Estes compostos foram capazes de inibir a atividade da PPO em várias extensões sendo diretamente proporcional à concentração do inibidor. Estes inibidores, em concentrações menores que um mmol L⁻¹, caracterizaram-se por permitir o retorno da atividade enzimática após um período de indução. A duração desta fase pode ser considerada como proporcional à concentração do inibidor. Esta fase de indução pode ter sido devido a (1) à redução da *o*-quinona de volta a catecol (ascorbato, sulfito, tiouréia) e/ou (2) a associação do inibidor com a *o*-quinona produzida ou com aminoácidos nas vizinhanças do sítio ativo da enzima (cisteína, cianeto). Além disso, tem sido comprovado que o ácido ascórbico

TABELA XVII. Efeito de vários inibidores sobre a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco^a.

Inibidor ² (mmol L ⁻¹)	Atividade Remanescente (%)
Nitrato de cádmio (1,0)	0
Nitrato de zinco (1,0)	0
Nitrato de mercurioso (1,0)	0
Cloreto de sódio (0,34)	45,7
(0,17)	64,3
(0,085)	74,3
Cianeto de potássio ³ (1,0)	0
(0,5)	22,8
(0,25)	25,7
(0,10)	35,7
Tiouréia (1,0)	0
(0,5)	11,4
(0,25)	18,2
(0,1)	26,7
<i>l</i> -Cisteína (1,0)	0
(0,5)	2,8
(0,25)	5,0
(0,1)	34,0
Ácido 3- Hidroxibenzóico (1,0)	38,3
4 Acetamidofenol (1,0)	29,3
Ácido benzóico (1,0)	61,7
Azida sódica (1,0)	23,3
Resorcinol (1,0)	23,3
<i>l</i> -Cistina (1,0)	66,0
EDTA (sal sódico) (1,0)	58,3
Ácido ascórbico ⁴ (1,0)	0
(0,5)	68,0
(0,25)	74,3
(0,1)	85,7
Sulfito de sódio ⁵ (1,0) ⁴	0
(0,5)	46,7
(0,25)	73,2
(0,1)	83,0
Dodecil sulfato de sódio (1,0)	75,0

1. A *polifenol oxidase* do mesocarpo fibroso do coco foi pré-incubada com o inibidor a 25° C ± 2° C durante 30 min. 2. As concentrações de inibidores são mostrados em parênteses. 3. Utilizou-se solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. 4. período de indução de 13,0, 7,0 e 2,0 min, respectivamente. 5. lag fase de 2,0 min.

bico e íons cobre podem catalisar a reação entre o grupo imidazol da histidina que se liga com o cobre do sítio ativo da enzima, inativando-a. Efeitos inibitórios similares da *L*-cisteína e ácido ascórbico têm sido observados para as PPO do cacau³¹, do kiwi²⁵⁸ e de *Solanum melongena*²⁵⁹ mas, contrário ao aqui observado, o cianeto de potássio teve um efeito inibitório muito menor sobre a PPO do palmito²⁶⁰.

EDTA, adicionado à mistura de reação, mostrou efeito inibitório sugerindo que íons metálicos podem estar envolvidos nesta reação. Outro agente complexante que teve efeito inibitório sobre a PPO do MFC foi a azida sódica.

Alguns autores^{260,261} têm verificado o efeito inibidor de haletos sobre a PPO. Para testar esta suposição, a atividade enzimática foi determinada em três concentrações de NaCl (0,34; 0,17 e 0,09 mmol L⁻¹) utilizando catecol como substrato. Uma diminuição proporcional na atividade da PPO ocorreu quando do aumento da concentração de cloreto de sódio. Esta inibição é provocada pela formação de um complexo entre o íon cloreto e o cobre da enzima. Há uma grande estabilização deste complexo em meios ácidos. Resultados similares foram obtidos por Lourenço et al.²⁶⁰ e Robb et al.²⁶¹. Entre os inibidores competitivos avaliados - ácido benzóico, ácido 3-hidroxibenzoico, 4-acetamidofenol e resorcinol - os dois últimos mostraram maiores afinidades pela PPO naturalmente imobilizada no MFC.

3 Conclusões

A PPO naturalmente imobilizada no MFC possui um pH ótimo de atividade situado entre 5,0 e 6,0, à temperatura de 23 °C. Rápida diminuição na atividade enzimática foi verificada em pH < 5,0 e em pH > 6,0. A enzima apresentou uma boa estabilidade térmica. 50 % de sua atividade foi perdida após aquecimento a 75° C, durante 4,3 min. Um k_m aparente de 9,1 mmol L⁻¹, V_{max} igual a 0,20 abs min⁻¹ e E_a aparente de 10,5 kcal mol⁻¹ foram calculados usando o catecol como substrato. A PPO naturalmente imobilizada no MFC mostrou elevada atividade para catecol, ácido cafeico e pirogalol enquanto atividade *monofenolase* não foi detectada nas regiões visível e UV próximo. Estudos de inibição mostraram uma completa inativação na presença de 1 mmol L⁻¹ de cianeto, tiouréia, *L*-cisteína, ascorbato, sulfito e dos nitratos de cádmio, zinco e mercúrio.

IV.2

**Bioreatores Tissulares para a Quantificação de Catecol e Outros Compostos Fenólicos,
Conteúdo de Água e Sulfito Utilizando Sistemas em Fluxo com Detecção Amperométrica**

IV.2.1

**Utilização da *Polifenol Oxidase* Naturalmente Imobilizada no
Mesocarpo Fibroso do Coco (*Cocus nucifera*, L.)**

1 Introdução

Compostos fenólicos têm recebido considerável atenção em programas ambientais devido à sua toxicidade, seu amplo emprego na produção de pesticidas e seu papel na poluição de águas²⁶². Há numerosos métodos para analisar estes compostos, em níveis de traços, em amostras de água. Alguns procedimentos cromatográficos^{263,264}, espectrofotométricos²⁶⁵ e volumétricos²⁶⁶ têm sido publicados mas, nos últimos anos, ocorreu um crescente interesse no desenvolvimento de novos princípios de detecção capazes de monitorar, rápida e seletivamente, espécies fenólicas em amostras ambientais.

Fenóis podem ser determinados amperometricamente mediante oxidação eletroquímica direta. Esta técnica, entretanto, devido a utilização de potenciais anódicos elevados, propicia inúmeras reações interferentes, aumento de corrente residual e de ruído, além do rápido envenenamento do eletrodo. Para contornar estes obstáculos, tem-se demonstrado, experimentalmente, que os biossensores baseados em enzimas (*polifenol oxidase*^{94,267-270}, *lacase*²⁷¹ e *peroxidase*²⁷²) e integrados com transdutores amperométricos mostram significativa vantagem na determinação destes compostos. Estes biossensores operam em potenciais próximos de 0,0 V (vs Ag/AgCl), onde são menos susceptíveis às reações interferentes. Algumas vezes, maior sensibilidade e menor limite de detecção são alcançados com tais dispositivos quando comparados àqueles obtidos por oxidação direta. A Tabela XVIII ilustra alguns resultados de pesquisadores que utilizaram eletrodos biologicamente modificados para a detecção de catecol. Os procedimentos de imobilização da enzima, os materiais empregados na construção do eletrodo, estabilidade e sensibilidade estão, freqüentemente, entre os objetivos destes estudos.

As vantagens no uso de tecidos vegetais como fonte de material biológico para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos são bem conhecidas. Esta popularidade aumentou com publicações como 'bananatrode' de Sidwell e Rechnitz²⁷⁶, em 1985. Há mais de uma década muitos tecidos vegetais têm sido usados como fonte de material biocatalítico e empregado no desenvolvimento de biossensores^{90,104}. Mais recentemente, a construção de um biossensor híbrido para a quantificação indireta de pectina⁹², e de um biossensor bi-enzimático para a detecção de ácido glicólico⁹³ que explora a associação de um mediador e de duas enzimas, demonstram que muito progresso no uso de tecidos vegetais pode ainda ser alcançado.

TABELA XVIII. Comparação dos eletrodos modificados com *tirosinase* para a detecção de catecol em solução aquosa.

Eletrodo	Procedimento de Imobilização (Modo de Análise)	SENSIB. ^a (A mol ⁻¹ cm ⁻²)	LD ^b (nmol L ⁻¹)	REF. ^c
Carbono vítreo	<i>Tirosinase</i> eletropolimerizada em polipirrol (steady-state)	1,5	2,0	273
Grafite	<i>Tirosinase</i> + carbodiimida + grafite ativado (FLA)	2,2	2,3	268
Pasta carbono	<i>Tirosinase</i> adsorvida na superfície do eletrodo (steady-state)	1,8	10	274
Grafite/epoxi	<i>Tirosinase</i> + epoxi (FLA)	0,4	40	269
Grafite sólido	<i>Tirosinase</i> imobilizada na superfície do EQM ^d (steady-state)	3,4	100 - 300	275
Pasta de carbono	<i>Tirosinase</i> + rutênio + óleo mineral + octa- decilamina (steady-state)	3,1	500	94
Pasta de carbono	<i>Tirosinase</i> + óleo mineral (FLA)	0,8	900	268
Pasta de carbono	pó de grafite + tecido vegetal + óleo mineral (steady-state)	0,1	1000	143

a. Sensibilidade; b. Limite de Detecção; c. Referência; d. Eletrodo Quimicamente Modificado.

Em muitos protocolos baseados em sensores tissulares, o tecido vegetal é posicionado próximo a um eletrodo e coberto por uma membrana permeável ao analito ou misturado com pasta de carbono ou, ainda, empacotado em um reator posicionado nas proximidades imediatas do detector em que a produção do sinal de transdução está baseada no produto enzimático ou no co-substrato solúveis em um sistema de fluxo. Esta última configuração é muito apropriada para a utilização de novos materiais como biocatalisadores.

Na presente tese, pela primeira vez, o tecido do coco é explorado como fonte natural de *polifenol oxidase* (PPO), para a construção de biossensores. O material enzimático contido no mesocarpo fibroso desta fruta, catalisa a oxidação do catecol a *o*-quinona como produto primário. A *o*-quinona produzida pode ser monitorizada eletroquimicamente em um sistema de soluções em fluxo e a resposta amperométrica está quantitativamente relacionada à concentração de catecol. As duas principais reações envolvidas no processo são a oxidação biocatalítica do catecol a *o*-quinona e a redução da quinona a catecol, na superfície do eletrodo de carbono vítreo, de

acordo com a reação:

A grande tolerância do tecido do coco às condições ambientais adversas combinada com sua característica fibrosa, resultou em um biossensor com elevada atividade biocatalítica, boa seletividade, boa estabilidade e tempos de resposta rápidos para a detecção de catecol. Nas seções seguintes, a adequabilidade deste biossensor tissular é registrada e discutida neste trabalho.

2 Resultados e Discussão

Otimização do Reator

Diferentemente de outros materiais de plantas já utilizados como folhas de espinafre²⁷⁷, foi observado que a atividade biocatalítica do tecido de coco não é absolutamente dependente de idade, do método de cultivo ou da fonte do material. Sua atividade catalítica é muito estável. O coco mantido à temperatura ambiente (no laboratório) apresenta alta atividade de PPO durante semanas, e se o tecido for seco e transformado em pó, pode ser estocado durante vários meses.

Um escurecimento no tecido pode ser visto após o uso do mesmo. Este fenômeno é causado pela sorção de polímeros fenólicos formados como produtos finais no processo biocatalítico. Estes polímeros podem bloquear o acesso de algumas enzimas nos sítios ativos causando uma diminuição na atividade do reator. Além disto, a *o*-quinona produzida é muito reativa e pode reagir com o sítio ativo da enzima, possivelmente se ligando a ele, por meio de ligações covalentes²⁴⁰. Um reator preparado desta maneira pode ser usado por vários dias apresentando apenas uma discreta perda de atividade e não requerendo qualquer procedimento de imobilização para manter a

enzima no tecido.

Várias combinações de comprimento e diâmetro interno para o reator foram explorados. Um cilindro de vidro de três milímetros de diâmetro interno e três centímetros de comprimento com 0,2 g de material biológico foi eficiente para a biotransformação, evitando problemas de lavagem.

O Potencial de Trabalho e pH Ótimos

A Figura 29 mostra o efeito do potencial de operação e o pH na resposta amperométrica de catecol em fluxo. De acordo com o voltamograma cíclico (não mostrado), qualquer potencial entre, aproximadamente, + 0,10 V até valores mais negativos (aproximadamente, - 0,20 V) pode ser usado como potencial operacional para detecção catódica da quinona produzida no reator. A resposta é também muito dependente do pH, mostrando uma ótima sensibilidade para valores de pH entre 5,0 e 6,0. Estes valores estão de acordo com o intervalo de variação de pH de 5,0 a 8,0 reportado na literatura para a enzima livre²⁷⁸. Como foi citado anteriormente, os valores de pH para os sucos espremidos do MFC de vários cocos estão situados entre 5,2 e 5,7. Para minimizar a interferência de espécies eletroativas comuns, todos os experimentos subsequentes foram conduzidos num potencial operacional de -0,10 V vs Ag / AgCl_{sat} usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 6,0.

Efeito da Vazão

A Figura 30 mostra o efeito da vazão na resposta analítica após injeção de catecol em fluxo. Como esperado, baixas vazões originam pequenos e largos picos devido a alta dispersão e lenta lavagem e para altas vazões, o sinal analítico começa a diminuir devido ao pouco tempo de contato da amostra com o material biocatalítico contido no reator. Uma condição balanceada foi alcançada com vazão de 2,8 mL min⁻¹, adotada nos experimentos subsequentes.

A Estabilidade da Bioconversão

A efetividade da bioconversão é mostrada nos experimentos apresentados na Figura 31A, envolvendo injeções sequenciais de catecol em duas diferentes concentrações. A excelente estabilidade da linha base e o rápido decréscimo do sinal da corrente catódica indicam a inexistência

Figura 29. (A) Voltamograma hidrodinâmico de catecol $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) na ausência e (b) na presença de um reator de mesocarro fibroso do coco no sistema. Eletrólito: solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 6,0; vazão $2,8 \text{ mL min}^{-1}$; volume amostral $100 \mu\text{L}$. (B) efeito do pH sobre a resposta do sistema. Potencial de trabalho $-0,1 \text{ V}$ vs $\text{Ag} / \text{AgCl}_{\text{sat}}$. Todas as outras condições como em (A).

Figura 30. Efeito da vazão sobre o sinal de corrente do sistema utilizando o reator empacotado com o mesocarpo fibroso do coco. Catecol $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH 6,0. Todas as outras condições como na Figura 28.

Figura 31. (A) Sinais de corrente para injeções alternadas de soluções de catecol (a) $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Injeções repetitivas de catecol $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as outras condições como na Figura 28.

de efeito de memória na alteração de concentração entre a) $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e b) $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 31B mostra 50 picos de injeção obtidos consecutivamente para a medição de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol. A corrente de pico permanece inalterada, revelando uma estabilidade de longa duração, muito utilizável para operações prolongadas. O desvio padrão relativo da série completa foi 1,8%. Esta característica demonstra a estabilidade efetiva na conversão biocatalítica de catecol a *o*-quinona.

Curva de Calibração Típica

Curvas de calibração usando soluções padrão de catecol (em meio tamponado) mostram a existência de dois padrões diferentes para altas e baixas concentrações de substrato (Figura 32). Este comportamento foi também observado com um EPC modificado com o mesocarpo fibroso do coco (não mostrado). A relação sigmoideal está em contraste com a relação hiperbólica simples de Michaelis-Menten entre concentração de substrato e a velocidade de reação²⁷⁹. Esta curva sigmoideal pode ser explicada assumindo-se que cada molécula de enzima combina não apenas com uma molécula única do substrato, mas com várias moléculas. A ligação da primeira delas na superfície da proteína pode causar uma mudança na conformação e na atividade em outra localização. Este fenômeno, referido como alosterismo, foi observado para várias moléculas²⁸⁰. Este comportamento mostra a necessidade de se usar diferentes curvas de calibração para intervalos de concentração distintos.

Picos bem definidos são observados mesmo para a concentração mais baixa e a quantificação é exequível no intervalo de 5×10^{-6} até $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Um limite de detecção de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi estimado a partir da relação sinal/ruído da resposta para $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol, nas condições adotadas neste trabalho.

Substratos

Uma vez que PPO é uma enzima que apresenta uma ampla seletividade de substratos²⁸¹, vários outros compostos fenólicos foram estudados para assegurar a especificidade do biossensor para catecol. A Tabela XIX mostra uma comparação da resposta relativa de vários compostos ao catecol. Não é surpresa observar que vários fenóis são bons substratos para a reação enzimática e este sensor pode ser usado também como biossensor para dopamina ou hidroquinona. Para fenol, o sinal inicialmente obtido foi muito baixo. Com injeções sucessivas, um significativo aumento de corrente foi observado até que uma condição estacionária foi atingida. Este resultado é muito similar àqueles observados por outros autores, trabalhando com métodos espectrofotométricos^{282,283}. Eles interpretaram este comportamento como resultado de reações que ocorrem em duas etapas, onde o monofenol é primeiramente-

Figura 31. Respostas do sistema de soluções em fluxo utilizando o reator tissular de coco “on-line” para soluções crescentes de catecol. (A) Curva de calibração utilizando soluções padrões. (B) Diagrama para baixas concentrações de catecol: (a) 1×10^{-5} mol L⁻¹; (b) 2×10^{-5} mol L⁻¹; (c) 4×10^{-5} mol L⁻¹; (d) 6×10^{-5} mol L⁻¹; (e) 8×10^{-5} mol L⁻¹; (f) 10×10^{-5} mol L⁻¹. Inserida em (A) a curva de calibração no intervalo anteriormente mencionado. Todas as outras condições como na Figura 29.

TABELA XIX. Comparação da atividade enzimática da *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco frente a compostos fenólicos^a.

Composto Fenólico ^b	Corrente / nA	Resposta / %
Catecol	60,8	100
Fenol	8,5	14
Resorcinol	1,8	3
<i>o</i> -cresol	0	0
<i>m</i> -cresol	0	0
<i>p</i> -cresol	0	0
Ácido 3-hidroxibenzoico	1,8	3
<i>o</i> -fenilendiamino	0	0
<i>m</i> -fenilendiamino	0	0
Pirogalol	0	0
4-fenilfenol	0	0
Ácido gálico	0	0
1-naftol	4,3	7
<i>l</i> -tirosina	0	0
Dopamina	101,5	167
Hidroquinona	54,7	90
Cafeína	0	0
<i>dl</i> -Dopa	0	0
4-acetaminofenol	0	0
Ácido benzoico	0	0

a. Ácido cafeico, *p*-fenilendiamino, 1-nitroso-2-naftol foram eletroativos na ausência do reator tissular, em -0,1 V vs Ag / AgCl_{sat}. b. A concentração dos compostos neste estudo foi de 1×10^{-4} mmol L⁻¹

te oxidado a *o*-difenol pela atividade *monofenol oxigenase* da enzima, seguido da formação de *o*-quinona pela atividade de *polifenol oxidase*.

Aplicação em Amostra Real

A aplicabilidade do bioreator baseado no mesocarpo fibroso do coco é ilustrado para duas situações diferentes. A Figura 33 (A) mostra os picos de injeção em fluxo para amostras de água de rio (rio Embu) tamponadas, coletadas em local urbano e poluído, na cidade de Embu - SP. O primeiro grupo de picos (a) corresponde a injeções de água de rio sem passar através do reator. O

Figura 24. Experimentos em FIA utilizando o bioreator com o mesocarpo fibroso do coco para a quantificação de catecol em água de rio (A) e água residuária de uma indústria de papel (B). Resposta para 100 μL de água de rio tamponada: (a) na ausência do bioreator; (b) na presença do bioreator; (c – g) mesma água de rio, com adição padrão de catecol (20 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (A) ou com 0,1 a 0,9 mmol L^{-1} (B).

pequeno sinal observado provavelmente corresponde a espécies eletroativas, presentes nesta água. O segundo grupo de picos (b) foi obtido com a mesma água, mas passando pelo bioreator. Os outros cinco grupos de picos (c - f) correspondem outra vez a mesma água de rio, adicionadas com crescentes níveis de catecol. O sinal aumentou linearmente com as adições subsequentes de catecol a partir de 2×10^{-5} até 1×10^{-4} mol L⁻¹. A curva padrão completa é também mostrada como “inset” na Figura 32 (A). Pode ser visto que mesmo apresentando uma baixa sensibilidade se comparada a ensaios em soluções padrão, o sensor responde eficientemente a incrementos na faixa de concentração de micromolar nestas amostras complexas. A quantidade estimada de 2×10^{-6} mol L⁻¹ como catecol pode ser produto de vários analitos biotransformados pelo presente bioreator.

Análises repetitivas da mesma amostra de rio mostraram um bom desempenho do reator. A capacidade de bioconversão observada após 100 e 200 injeções da amostra foram muito similares àquelas primeiras injeções observadas com um bioreator recém preparado. Crítico foi o desempenho do eletrodo de carbono vítreo. Um contínuo envenenamento da superfície do eletrodo foi observado durante injeções sucessivas com ou sem o uso do reator enzimático (não mostrado). A capacidade de bioconversão foi avaliada usando um eletrodo polido. O desempenho deste arranjo foi estimado repetindo toda a série de injeções apresentadas na Figura 33 (A). Para seis repetições da mesma série, o desvio padrão relativo calculado foi de 6,3 %.

A Figura 33 (B) contém as medidas envolvendo água residuária coletada de uma indústria de papel e celulose, antes de qualquer tratamento. Neste caso, devido ao elevado teor de compostos fenólicos, a amostra inicial foi diluída dez vezes. A sequência, para a introdução da amostra, foi a mesma do caso anterior. Aqui, de acordo com estudo prévio, uma resposta não linear foi novamente obtida (provavelmente, efeito alostérico). Para esta amostra, uma linha base mais estável foi observada. Nenhum envenenamento significativo da superfície do eletrodo foi detectada neste caso. A mesma análise foi repetida sete vezes. O desvio padrão relativo dos resultados foi de 4,8 %.

Conclusões

Os experimentos acima demonstram, pela primeira vez, a aplicação do mesocarpo fibroso do coco para o desenvolvimento de um bioreator. A elevada atividade da *polifenol oxidase* deste

material tissular associada às suas características físicas favoráveis permitem a determinação de compostos fenólicos a nível $\mu\text{mol L}^{-1}$ em fluxo. Os últimos experimentos evidenciam a potencialidade de aplicação em amostras reais deste novo biossensor. Em muitos casos, se compostos fenólicos estão presentes, eles podem ser quantificados com boa precisão em um intervalo amplo de concentração. Além disto, este material tissular pode ser útil no desenvolvimento de um bioreator para a transformação de compostos fenólicos, presentes em águas residuárias, em moléculas menos tóxicas, facilmente degradáveis no meio ambiente.

IV.2.2

**Utilização da *Polifenol Oxidase* Naturalmente Imobilizada
em Frutos da Palmeira Leque (*Latania* sp)**

1 Introdução

No decorrer do presente trabalho, além do tecido do coco, diversas outras fontes vegetais (lentilhas, beterrabas, salsa, feijão guandú e frutos de outras palmeiras) foram exploradas visando a utilização de sua capacidade de biocatálise, com finalidades analíticas. Dentre os tecidos vegetais investigados, os frutos da palmeira leque (*Latania* sp) levaram a resultados excelentes. Foi verificado que a polpa e, principalmente, a casca deste fruto contêm quantidade de *polifenol oxidase*, em níveis superiores a encontrada no mesocarpo fibroso do coco.

A utilização da casca e da polpa das frutas desta palmeira foram empregadas na construção de reatores empacotados e de eletrodos de pasta de carbono (EPC), com características hidrodinâmicas muito favoráveis para o uso em sistemas de análise por injeção em fluxo e em bateladas.

Adicionalmente, ao longo desta etapa, desenvolveu-se uma forma bastante simples de secagem destas fibras (metodologia que também foi estendida para o MFC) que permite sua armazenagem por períodos prolongados, sem perdas significativas de atividade. Eletrodos de pasta de carbono contendo tecido de *Latania* sp verde, mostraram vida útil extensa ao passo que eletrodos com o material desidratado, finamente particulado, demonstraram excelente desempenho, mesmo após muitos meses de estocagem à temperatura ambiente.

A seguir serão descritos, com mais detalhes, as aplicações realizadas utilizando tecidos dos frutos de *Latania* sp como biocatalisador para a quantificação de espécies de interesse analítico como catecol, fenóis e dopamina.

2 Resultados e Discussão

Otimização das Condições Experimentais

A atividade biocatalítica do tecido de *Latania* sp é, em alguns aspectos, similar a atividade observada com o MFC: resposta enzimática rápida e uma vida útil prolongada.

Progressivo escurecimento também foi observado durante seu uso. Isto ocorre devido a adsorção de produtos quinóides intermediários formados após o processo biocatalítico. Estas substâncias podem bloquear o acesso do analito a alguns centros ativos das enzimas, com consequente diminuição da atividade do reator. Apesar destes obstáculos, um reator preparado com tecidos desta palmeira, pode ser usado por vários dias, apresentando apenas uma pequena perda de atividade (cerca de 10 %). Adicionalmente, como as enzimas encontram-se naturalmente imo-

bilizadas, não se requer qualquer procedimento de imobilização e a renovação do reator é muito fácil.

Ao contrário do verificado com o MFC do coco, reatores de *Latania* sp preparados com frutas de idade e procedência distintas possuem atividade enzimática bastante diferenciada.

Vários parâmetros devem ser observados durante o desenvolvimento de um biossensor. Os experimentos iniciais foram conduzidos para se estabelecer um pH ótimo. Tampões fosfato, em diferentes valores de pH, foram usados e uma resposta máxima para catecol foi obtida em pH 5,7, como pode ser visto na Figura 34A. Este pH foi usado, posteriormente, em todo o trabalho.

O melhor potencial para a redução eletroquímica de *o*-quinona biocataliticamente gerada foi examinado em detalhes. Voltametria cíclica e amperometria foram usadas para determinar o melhor potencial. O sinal relativo obtido usando medidas amperométricas (Figura 34B) sugere a região entre - 0,05 V e - 0,20 V vs. Ag / AgCl_(NaCl sat.) como a melhor condição. O potencial - 0,10 V foi escolhido e todas as determinações apresentadas ao longo deste estudo foram conduzidas nestas condições.

O tamanho do reator empacotado foi otimizado. A melhor resposta foi obtida usando-se reatores cilíndricos com 3 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento. Estas dimensões representavam um compromisso entre a eficiência da bioconversão, ausência de obstruções e lavagem efetiva. As dimensões adotadas foram similares as usadas no estudo prévio.

A Figura 35 mostra 93 picos obtidos após injeções consecutivas de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de catecol. As correntes, praticamente, permanecem inalteradas, confirmando (1) a estabilidade do reator, uma característica importante para operações prolongadas; (2) a boa repetibilidade da conversão biocatalítica de catecol a quinona e (3) rápida bioconversão e uma eficiente lavagem do bioreator. O coeficiente de variação da série completa foi, de apenas, 2,1 %.

Reator Tissular em FIA

O uso da polpa de *Latania* sp para conversão enzimática de catecol e dopamina, associado em sistemas de soluções em fluxo produz uma maneira rápida e eficiente para a análise destes compostos. A Figura 36A apresenta os sinais amperométricos para injeções a partir de 1×10^{-6} até 8×10^{-6} mol L⁻¹ de catecol. Nenhum efeito residual foi observado quando a concentração

Figura 34. (A) Voltamograma hidrodinâmico de uma solução de catecol $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o reator de tecidos da *Latania* sp. Eletrólito de suporte: solução tampão fosfato, pH 5,7; vazão $2,8 \text{ mL min}^{-1}$; volume amostral $100 \mu\text{L}$. (B) Efeito do pH na resposta do sistema. Potencial de trabalho $-0,10 \text{ V}$ vs Ag / AgCl/sat. Outras condições como em (A).

Figura 35. Injeções consecutivas de catecol $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 5,7. Todas as outras condições como na Figura 34.

Figura 36. (A) Respostas do bioreator de *Latania sp* a injeções de concentrações crescentes de catecol. (a) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Injeções sucessivas de catecol $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. (C) Curva de calibração usando soluções padrões de catecol. (D) Detalhe para cada grupo de pontos experimentais obtidos ao longo da construção da curva de calibração.

da solução injetada foi mudada. Nenhum fenômeno de “carry-over” foi verificado mesmo quando soluções com grandes diferenças entre suas concentrações foram sequencialmente injetadas.

Picos muito bem definidos foram obtidos a partir da injeção de catecol tanto em baixas como em altas concentrações. A Figura 36B apresenta a resposta para $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol. Mesmo nesta alta concentração, após 30 s, há a diminuição do sinal analítico para apenas, aproximadamente, 3,0 % do seu valor máximo, atestando o eficiente processo de lavagem do reator e o transporte reproduzível para e da superfície do eletrodo. A frequência de 90 injeções h^{-1} foi adotada na maioria das medições em FIA.

Uma curva de calibração para soluções padrão de catecol (em meio tamponado) variando de 1×10^{-6} a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ revelou o extraordinário conteúdo de PPO neste tecido vegetal. A Figura 36C apresenta os pontos correspondentes a esta larga faixa estudada.

Similar ao MFC, aqui também duas diferentes inclinações, para altas e baixas concentrações de substrato, foram observadas. Na Figura 36D são mostrados os três segmentos que correspondem as injeções de catecol de: a) 1×10^{-6} a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; b) 1×10^{-5} a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e c) de 1×10^{-4} a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Duas regiões lineares estão bem definidas. A região de transição foi encontrada entre 8×10^{-6} e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol. Os coeficientes de correlação de cada segmento e também do intervalo completo estudado estão reunidos na Tabela XX.

TABELA XX. Parâmetros da regressão linear envolvendo os diferentes segmentos da curva de calibração.

INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	INCLINAÇÃO (mA / ml)	r^2	n ^b
1 a 8	4,92	0,9998	4
10 a 100	7,68	0,9991	5
100 a 1000	7,85	0,9998	6
10 a 1000	7,87	0,9999	10
1 a 1000	7,85	0,9999	15

a. Coeficiente de correlação; b. número de pontos experimentais.

Eletrodos de Pasta de Carbono

A incorporação de tecidos vegetais à matrizes de pasta de carbono representa uma perspectiva atraente na preparação de biossensores. A pasta de carbono apresenta muitas vantagens tais como simplicidade de preparação e renovação, uso de componentes de baixo custo e fácil

incorporação de materiais distintos. Misturando o tecido vegetal juntamente com a pasta de carbono é possível obter bioeletrodos que fornecem respostas rápidas, evitando o uso de esquemas laboriosos.

Durante este trabalho, o uso de *Latania* sp incorporado em EPC foi explorado de três maneiras diferentes: a) usando tecido fresco, b) usando pasta preparada com tecido fresco e estocada por longos períodos (cinco meses) e c) empregando o tecido seco (discutido na próxima seção).

A Figura 37A apresenta as respostas amperométricas para EPC com (a) e sem (b) tecido vegetal para sucessivas adições de $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol para uma solução mantida sob vigorosa agitação. Como esperado, EPC sem tecido não é capaz de responder às adições sucessivas de catecol. Ao contrário, EPC com *Latania* sp responde rapidamente a estas adições de substrato produzindo um rápido aumento de corrente seguido de sua estabilização em novo patamar, em menos de 20 s. Esta resposta rápida se deve, provavelmente, à proximidade da enzima com o eletrodo, onde o produto da reação enzimática é “instantaneamente” oxidado. O limite de detecção foi estimado em $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 37B apresenta as respostas de EPC que utilizaram pastas de carbono, já contendo tecidos da *Latania* sp armazenados durante cinco meses à temperatura ambiente (a) e para EPC sem tecido (b). Este fato abre interessantes possibilidades. Os tecidos vegetais, em ambiente não aquoso (confinados no óleo), foram muito bem preservados e este aspecto pode ser esperado para outros tecidos. O sinal obtido nesta figura é maior do que o registrado na Figura 36A. Isto pode ser explicado pelo fato de que os eletrodos foram preparados utilizando frutas de procedência distintas. O primeiro foi preparado usando-se a polpa e a casca picadas apenas com faca inox e o segundo utilizou a casca cuidadosamente picada (onde a quantidade de enzima é maior) e triturada em gral com o auxílio de um pistilo. Esta distinção na obtenção dos tecidos para a preparação da pasta, provavelmente, gerava partículas de tamanhos diferentes e pode ser responsável pelas diferenças detectadas. Experimentos comparando o conteúdo enzimático da casca com a polpa da fruta, indicaram que a primeira possui atividade maior.

A vida útil da PPO naturalmente imobilizada nas pastas de carbono foi admirável, uma vez que após cinco meses de estocagem, sua atividade permanecia superior a 80,0 %. Estes resultados sugerem que a pasta de carbono pode atuar como meio, muito simples e eficaz, na preservação deste tecido.

Figura 37. Curvas de corrente-tempo obtidas em (a) eletrodo de pasta de carbono modificado com *Latania* sp e (b) eletrodo de pasta de carbono sem tecido vegetal para incrementos de $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 5,7. (A) eletrodo tissular recém-preparado e (B) eletrodo tissular preparado há cinco meses.

Utilização de Tecido Seco

A elevada estabilidade da PPO naturalmente imobilizada nos tecidos da *Latania* sp evidenciada no ambiente hidrofóbico dos EPC dirigiu esta pesquisa para a utilização de tecidos secos. A obtenção de partículas menores era conseguida empregando peneiras. Este aspecto é uma vantagem adicional visto que, a polpa e a casca apesar de serem facilmente picadas de forma manual, a separação de partículas por tamanho é impraticável.

Para a preparação do tecido seco, a casca e a polpa eram separadas das sementes manualmente e cortadas em pequenos pedaços e secos à temperatura ambiente durante 72 h. Esse material era utilizado para a construção de reatores enzimáticos e de EPC.

Reatores enzimáticos foram preparados com 0,14 g de material seco. Esta quantidade representava a massa ideal para alcançar o volume exato de material para ser incorporado no reator após entrar em contato com a solução eletrolítica. A Figura 38A apresenta 40 injeções sucessivas de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol, usando um reator preparado com tecido seco após 24 h em contato com STF. O desvio padrão relativo desta série de injeções foi 2,8 %.

Eletrodos preparados misturando 6 % de tecido seco (partículas entre 0,105 e 0,250 mm), 52 % de pó de grafite e 42 % de óleo mineral, foram usados para experimentos em batelada associados com sistemas de soluções em fluxo. Não há possibilidade de comparação direta entre estes eletrodos e os preparados com tecido “in natura” (Figura 37). Eletrodos recentemente preparados geram sinais discretos, provavelmente, devido a ausência de água suficiente circundando a enzima ou no tecido. Após duas horas em STF, o sinal amperométrico aumentava significativamente e o aumento de volume do tecido era evidente na superfície do eletrodo. Um aumento discreto adicional foi registrado após 20 h em solução.

O mesmo eletrodo foi também testado em FIA. O eletrodo foi adaptado à célula eletroquímica apresentada na Figura 15, bem como utilizado sem o reator. Os resultados registrados não foram muito regulares, provavelmente devido à remoção mecânica do tecido da superfície do eletrodo. Este problema foi resolvido pelo uso de membrana de náfon[®] aplicada sobre a superfície do EPCBM. A Figura 38B apresenta uma série de medições feitas, usando o EPC modificado com náfon[®]. Estes eletrodos mostraram alguma diminuição de sinal e uma maior lentidão na lavagem, mas os sinais obtidos foram bastante reprodutíveis.

Figura 38. (A) Injeções sucessivas de uma solução de catecol $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} usando um reator com tecido de *Latania* sp desidratado. (B) Diagrama obtido através de injeções de concentração crescente de solução de catecol monitoradas por um eletrodo de pasta de carbono contendo tecido desidratado, protegido com um filme de náfon®. Condições como na Figura 35.

Quantificação de Dopamina

Ao explorar-se outros compostos que poderiam ser biotransformados pela PPO de *Cocos nucifera*, verificou-se uma intensa atividade para dopamina, superior inclusive a atividade medida para catecol. Desta maneira, supõe-se que a PPO naturalmente imobilizada nas frutas de *Latania* sp pode também catalisar a oxidação desta catecolamina à quinona correspondente. Ao longo deste trabalho, em vários experimentos conduzidos com reatores de tecido ou com EPC (contendo tecido “in natura” ou seco), os sinais analíticos de catecol e dopamina foram obtidos em paralelo. Foi interessante observar que, no presente caso, as respostas eram muito similares, contrário ao observado com o MFC.

A Figura 39 apresenta uma série de medidas de dopamina a partir de 5×10^{-6} até $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, usando um reator de tecido verde. A curva de calibração correspondente indica uma resposta linear, com parâmetros muito similares aos observados com soluções de catecol.

Atividade Cresolase

Os primeiros experimentos usados para a quantificação do fenol levaram a resultados contraditórios. Primeiramente, os testes amperométricos em fluxo usando reatores ou EPC contendo *Latania* sp indicavam a ausência de enzimas capazes de hidroxilar o fenol. Entretanto, testes qualitativos (visuais, observando a reação em um becker) mostraram que, após alguns minutos de contato entre o tecido vegetal e a solução de fenol, ocorria um significativo escurecimento, atestando as atividades monofenolase e catecolase deste tecido. Estes resultados podem ser explicados considerando a cinética envolvida.

A Figura 40 mostra a resposta amperométrica em função do tempo de contato, registrado para 1 mmol L^{-1} de fenol na presença da polpa de palmeira leque ($25 \text{ g de tecido L}^{-1}$). Para esta condição, um tempo de 6 min foi necessário para obter a resposta esperada.

Substratos

A PPO apresenta um amplo espectro de especificidade podendo oxidar inúmeros compostos fenólicos. Tecidos de *Latania* sp apresentaram resposta à dopamina > catecol > hidroquinona > fenol. Nenhum sinal foi observado para resorcinol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, pirogalol, ácido gálico, cafeína e ácido benzoico.

Figura 39. Respostas amperométricas de um bioreator de *Latania* sp para concentrações crescentes de dopamina: (a) $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (f) $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inserida na parte superior a curva de calibração.

Figura 40. Curva corrente-tempo para a biotransformação do fenol pela *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada na polpa de frutos da *Latania* sp. Concentração de fenol: 1×10^{-3} mol L^{-1} ; quantidade de tecido: 25 g L^{-1} . Outras condições como na Figura 34

IV.2.3

Biossensor Tissular para a Determinação do Conteúdo de Água em Meio Aquo-Restrito

1 Introdução

A determinação de umidade é uma das análises mais freqüentemente requeridas em numerosos processos de controle em laboratórios químicos. Vários métodos físicos ou químicos são empregados para determinar a umidade, muitos dos quais necessitam de equipamentos especiais, são laboriosos e sofrem interferências de reações secundárias^{211,284-286}.

Tem sido demonstrado por Klibanov¹²⁴ e Dordick¹²⁵ que enzimas podem ser cataliticamente ativas em meios não aquosos. Esta constatação tem proporcionado o desenvolvimento de novos biossensores que operam em meios orgânicos para a determinação de importantes analitos (fenóis, peróxidos orgânicos) com pouca solubilidade em água e de matrizes de amostras hidrofóbicas (manteiga, óleo, azeite de oliva, gasolina)^{130,193,197,205,212,287}. Outras importantes vantagens oferecidas são o aumento da estabilidade e a simplificação dos métodos de imobilização.

Há inúmeros fatores que governam as reações enzimáticas e a estabilidade da enzima em meio orgânico. Estes incluem, entre outros, a influência do solvente, do conteúdo de água e do pH. Em relação a água, algumas enzimas devem ser hidratadas para assegurar a sua atividade. Esta água fica localizada ao redor da molécula proteica, constituindo uma camada de hidratação. A extensão desta hidratação depende, basicamente, da enzima e do solvente. A manutenção desta camada e das interações não covalentes, segundo Dordick¹²⁵, são essenciais para a atividade biocatalítica.

Alguns autores^{125,191,197} têm verificado que a resposta de eletrodos enzimáticos em meio orgânico é fortemente dependente do conteúdo de água. Mannino et al.²¹¹ e Wang e Reviejo²¹⁸, têm demonstrado que a água proporciona uma amplificação na atividade enzimática em meios aquo-restritos. Assim, a água se comporta como um ativador da atividade enzimática podendo ser quantificada de maneira análoga a ativadores ou inibidores²⁸⁸.

Inúmeros eletrodos enzimáticos têm sido desenvolvidos^{136,197,205-213} para o monitoramento de alguns substratos pouco solúveis ou insolúveis em água. A maioria destes trabalhos enfatiza a utilização de enzimas isoladas ou preparações com células íntegras de fontes vegetais como materiais biocatalíticos para a construção de biossensores. Os biossensores baseados em tecidos vegetais foram construídos pela retenção física de uma fatia do tecido na superfície do eletrodo usando

uma membrana porosa¹³⁶. Eletrodos à base de tirosinase têm sido empregados para quantificar o conteúdo de água em meio orgânico^{211,218}.

Uma nova estratégia para a utilização de um biossensor amperométrico, usando um reator empacotado com o MFC desidratado, rico em PPO, em um sistema de soluções em fluxo, em meio não-aquoso, para a quantificação indireta de água é descrita pela primeira vez. O reator empacotado é rapidamente e facilmente preparado. Na ausência de água, a PPO contida no tecido vegetal não é capaz de catalisar a oxidação aeróbica do substrato (catecol). Entretanto, pequenos incrementos no conteúdo de água estimulam a atividade biocatalítica e a *o*-quinona produzida pode ser relacionada, de forma proporcional, à concentração de água.

2 Resultados e Discussão

Os desenvolvimentos no campo da enzimologia não-aquosa têm revelado a versatilidade dos biocatalisadores empregados em meio orgânico. A PPO retém sua atividade em vários solventes, desde que, como a maioria das enzimas, uma pequena proporção de água esteja presente no sistema¹⁹⁸. Além disto, a *o*-quinona produzida pela oxidação catalítica do catecol é detectada em potenciais baixos, minimizando interferências de constituintes eletroativos.

A Figura 41A mostra os resultados experimentais relativos a uma série prolongada de injeções repetitivas ($n = 44$), em um período de 22 min, de uma solução de acetonitrila contendo cloreto de benzalcônio (50 mmol L^{-1}) e catecol. Os picos correspondem a soluções idênticas às da solução carreadora, mas contendo também 0,7 % de água, v/v. Os resultados evidenciam que a resposta é altamente reprodutível produzindo um sinal de corrente médio de 17 nA, com intervalo de 16,7 - 17,2 nA e um desvio padrão relativo de, apenas, 0,65 %. Uma possível explicação para a deriva verificada seria uma lenta e gradual perda de água residual presente, ainda, no MFC não afetando, no entanto, o sinal transiente quando na presença de água. O comportamento da injeção em fluxo de conteúdos de água diferentes no sistema mostra a rápida adequação da atividade enzimática (Figura 41B). Estes resultados podem ser atribuídos a melhor termoestabilidade da enzima em meio orgânico e a minimização de reações secundárias como a polimerização da *o*-quinona.

Figura 41. (A) Injeções repetitivas de uma solução padrão contendo 0,7 % de água, v/v ($n = 44$, C.V. = 0,65 %). (B) Injeções de soluções contendo 0,1 (a) e 0,8 % (b) de água, v/v.

A Figura 42A mostra as respostas amperométricas típicas do incremento dos níveis de concentração das soluções de água (0,1 a 0,8 %). Verifica-se que o bioreator responde rapidamente a estas modificações. Tempos de respostas curtos e rápido retorno à linha base indicam facilidade de transporte do substrato (catecol) e lavagem da *o*-quinona gerada. A curva de calibração resultante (Figura 42B) mostra uma boa linearidade ($r = 0,997$) no intervalo de 0,1 a 0,8 % e limite de detecção de 0,03 % (v/v) de água (sinal/ruído = 3). Em concentrações superiores a 0,8 % verificou-se um aumento do coeficiente angular.

Reatores tissulares para catecol utilizados em meio de acetonitrila apresentaram vida útil muito mais longa, se comparados com o observado em meio aquoso onde a polimerização das quinonas bloqueia o centro ativo da PPO do tecido vegetal. Em solventes orgânicos hidrofílicos (caso da acetonitrila que possui um coeficiente de partição igual a - 0,33) a *o*-quinona gerada é solubilizada contribuindo para minimizar reações secundárias entre o produto da reação enzimática com o sítio ativo e/ou resíduos de aminoácidos da PPO. Reatores mantidos durante dois meses sob refrigeração, em meio de acetonitrila e elevadas concentrações de catecol mostraram pouco escurecimento e não apresentaram perda de sua atividade biocatalítica.

Resultados obtidos da análise de álcool comercial, usando o método proposto, evidenciam uma boa concordância com os valores de conteúdo de água registrados nos rótulos (Tabela XXI). Subsequentemente, amostras de alguns produtos alimentícios como manteiga e azeite de oliva foram testadas com o procedimento proposto. Acetonitrila foi utilizada com o objetivo de solubilizar a água retida nestas amostras. Diluições de 10, 20 e 50 vezes e filtrações em papel de filtro comum, em papel semi-quantitativo e em membrana Millipore (0,45 μm) foram realizadas antes das injeções visando minimizar interferências no sinal amperométrico. Apesar da comprovação de atividade do material biocatalítico após injeções destas amostras, a não solubilização delas neste solvente, a não eficiência dos processos de filtração utilizados bem como a adsorção de partículas de proteínas (no caso da manteiga) na superfície do eletrodo de carbono vítreo não viabilizaram a utilização do bioreator de MFC desidratado para a quantificação do conteúdo de água nestas amostras complexas.

A

B

Figura 42. (A) Injeções de soluções padrão de água nas concentrações de 0,1 % (a); 0,2 % (b); 0,3 % (c); 0,5 % (d); 0,6 % (e); 0,8 % (f) v/v, obtida usando a *polifenoloxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco. (B) Curva de calibração desta série.

TABELA XXI. Conteúdo de água (%) de amostras de álcool comercial determinado usando um reator empacotado com o mesocarpo fibroso do coco desidratado, rico em PPO, em um sistema de soluções em fluxo, em meio acetonitrila.

Amostra / (número)	Método proposto	Valor declarado no rótulo / %
Álcool		
(1)	7,6	
(2)	8,1	
(3)	7,7	
(4)	8,2	
		8,0
(5)	7,8	
(6)	7,7	
(7)	8,2	
(8)	8,1	

3 Conclusões

Os resultados dos experimentos descritos anteriormente evidenciaram a amplificação proporcionada pelo conteúdo de água na atividade enzimática da PPO naturalmente imobilizada no MFC desidratado. Ficou demonstrada, pela primeira vez, a utilização de bioreatores empacotados com tecidos desidratados em meio orgânico para a quantificação do conteúdo de água de amostras de álcool comercial. Este procedimento analítico é uma alternativa atraente em relação a outros métodos de determinação de conteúdo de água visto que possui sensibilidade, boa propriedade dinâmica, vida útil prolongada e simplicidade. Para outras aplicações recomenda-se avaliar (a) os efeitos dos solventes sobre a atividade enzimática; (b) a preparação da amostra; (c) a escolha do eletrólito; (d) o método de filtração. A aplicabilidade de reatores tissulares desidratados para a quantificação do conteúdo de água em fluxo é uma alternativa atraente que deve ser explorada no controle de qualidade e no monitoramento de processos.

IV.2.4.

**Determinação Amperométrica de Sulfito Usando *Polifenol Oxidase*
Naturalmente Imobilizada no Mesocarpo Fibroso do Coco em Fluxo**

1 Introdução

Os biossensores eletroquímicos são amplamente usados para a determinação de compostos biologicamente ativos e, apesar do progresso nesta área, a maioria destes dispositivos é, frequentemente, idealizada para a detecção do substrato enzimático.

O desenvolvimento de biossensores para a quantificação dos inibidores de enzimas, geralmente, está associado a poluentes ambientais. Estes compostos possuem importância prática nas áreas de toxicologia, farmacologia, ciência dos alimentos e nutrição sendo de imenso valor na elucidação dos mecanismos das reações biocatalíticas, na determinação dos grupos dos sítios ativos das enzimas e no estabelecimento das seqüências de reações nas vias metabólicas. São também utilizados no controle de pragas, incluindo insetos e ervas daninhas¹. Os biossensores existentes para a detecção de inibidores não são muito específicos e possuem baixa sensibilidade quando comparados com os projetados para seus substratos.

Os sulfitos (nas formas de dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio, metabissulfito de potássio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio e sulfito de sódio), assim como os cianetos, azidas e monóxido de carbono são capazes de inibir muitas enzimas que contêm ferro, cobre, zinco, molibdênio ou outros cátions di- e trivalentes como grupo essencial. Os sulfitos são empregados como conservantes de alimentos e de bebidas, prevenindo as oxidações, escurecimentos dos tipos enzimático e não enzimático e o crescimento de microrganismos.

Inúmeros métodos para a determinação de sulfito estão registrados na literatura. Entre estes podem ser destacados os enzimáticos que se baseiam na oxidação do sulfito a sulfato catalisada pela sulfito oxidase²⁸⁹⁻²⁹³. As principais características destes sensores estão sumariadas na Tabela XXII. Recentemente, Fatibello-Filho e Vieira²⁹⁴ desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de sulfito em vinhos, sucos e vinagre baseado na inibição da atividade da *polifenol oxidase* do extrato bruto de batata doce obtendo um limite de detecção de $2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Durante a presente tese, foi desenvolvido um procedimento amperométrico em fluxo, utilizando PPO naturalmente imobilizada no MFC, para a determinação de sulfito. Na presença de altas concentrações de sulfito ($1 \text{ a } 100 \text{ mmol L}^{-1}$), este reage com grupos carbonila do fosfatopiridoxal e reduz as ligações dissulfeto das proteínas², levando à inativação da PPO. Na presença de baixas concentrações de sulfito porém, pode-se supor que: (1) a oxidação do substrato, na presença da enzima, pode ser prevenida pela limitação da quantidade de oxigênio disponível na solução e

Tabela XXII. Principais características dos biossensores eletroquímicos para a determinação de sulfito.

Princípio de Detecção	Linearidade	Estabilidade ^a	Aplicação	C.V. / %	Ref. ^b
Elet. ^c de O ₂	60 - 340 µmol L ⁻¹	6 meses (-20° C)	-	-	289
H ₂ O ₂ (FIA)	1 - 10 ppm	20 dias (5° C)	Vinho branco	2,3 (n=10)	290
H ₂ O ₂	5 - 550 µmol L ⁻¹	53 dias (4° C)	Bebidas e alimentos desidratados	3,3 (n=8)	291
Elet. De O ₂	-	-	Cerveja	-	292
Elet. De O ₂	Limite de detecção: 10 ppm	84 dias (4° C)	Alimentos desidratados, vinhos e sucos	1	293

a. entre parênteses temperatura de estocagem; b) referência; c) eletrodo.

(2) ocorre a redução da quinona produzida pela ação catalítica da PPO ao substrato original. O método baseia-se no efeito do sulfito sobre o produto da atividade enzimática. A diminuição do sinal de corrente é proporcional ao aumento da concentração de sulfito. O baixo custo de tal dispositivo, o bom desempenho e a simplicidade do procedimento analítico permite sugerir-lo para possíveis aplicações nas áreas de controle ambiental e de alimentos.

2 Resultados e Discussão

Mecanismo da Reação do Catecol com a *Polifenol Oxidase* e sua Inibição pelo Sulfito

Como visto no item 2.2.1.3 a PPO catalisa a oxidação de catecol a *o*-quinona que sofre rápida condensação e posterior oxidação não enzimática, formando produtos escuros denominados de melaninas. O efeito de agentes redutores como o sulfito sobre a PPO é muito controverso. Quando sulfito é adicionado em um sistema de soluções em fluxo, ele atua como um agente redutor reagindo diretamente com a quinona formando compostos não coloridos²⁹⁵. Ocorrendo a formação deste produto (sulfito ligado à quinona) há uma diminuição da concentração de quinona livre e, conseqüentemente, da corrente medida. Esta diminuição de corrente é proporcional ao sulfito em solução.

O mecanismo de inativação da PPO na presença de sulfito é mostrado na equação a seguir.

Efeito da Concentração do Substrato Sobre as Curvas de Calibração

Foram realizados vários experimentos para verificar os efeitos da concentração de catecol ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sobre a linearidade das curvas de calibração para sulfito. Foi verificado que em altas e baixas concentrações de catecol havia uma diminuição insignificante dos sinais de corrente quando da adição de concentrações crescentes de sulfito ($1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Catecol na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi a que apresentou melhor compromisso entre a concentração de analito e valores de corrente, produzindo curvas com bom coeficiente de linearidade.

Efeitos de Interferentes

Efeitos de açúcares (frutose, glicose, sacarose) e de ácidos orgânicos (ácido benzoico, ácido bórico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido acético), sobre a resposta analítica, em concentrações 10 vezes maiores que a do analito, foram avaliados. Estes compostos são, normalmente, encontrados em vinhos. Verificou-se que não há interferência significativa nos sinais de corrente para sulfito. Isto, provavelmente, se deve ao fato da utilização de baixo potenciais ($-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) associado ao sistema em fluxo empregado.

Curvas de Calibração

O grau de inibição (%) foi calculado como a diminuição relativa do valor do sinal de corrente, utilizando a seguinte equação:

$$I = \frac{I_{catecol} - I_{sulfito}}{I_{catecol}} \times 100\% \quad (50)$$

onde I é o grau de inibição (%) e $I_{catecol}$ e $I_{sulfito}$ são os valores de corrente obtidos antes e após a injeção do inibidor, respectivamente.

A Figura 43 ilustra os dados da curva de calibração para sulfito (1 a 10×10^{-6} mol L⁻¹) obtida em um sistema em fluxo. Picos bem definidos e respostas relativamente rápidas (média de 45 amostras por hora) podem ser verificados. É bom ressaltar que, quando o grau de inibição excede, aproximadamente, 40 % há uma diminuição aparente do coeficiente linear, afetando assim a sensibilidade de resposta do sensor a aumentos na concentração do inibidor (Tabela XXIII). Pode-se supor que, neste caso, deve haver uma maior concentração do analito em relação aos centros ativos da enzima.

TABELA XXIII . Coeficientes lineares em diferentes intervalos de concentração de sulfito.

Intervalo de Concentração (μmol L ⁻¹)	Coeficiente Linear (nA / μmol L ⁻¹)	Correlação
0 - 4	12,1	0,9919
0 - 6	10,2	0,9851
0 - 8	8,6	0,9736
0 -10	7,3	0,9626

Uma relação linear é obtida para o intervalo de concentração do sulfito em estudo quando o grau de inibição é plotado em função do logaritmo da concentração do inibidor, como pode ser verificado na Figura 44.

Figura 43. Picos amperométricos para injeções crescentes de sulfito em soluções de catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. (a) $0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (g) $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando um bioreator com *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco. No detalhe, a curva de calibração resultante.

Figura 44. Dados da figura 43, plotados em função de log [Sulfito].

Nenhum efeito de memória foi verificado quando da injeção repetida de concentrações diferentes de sulfito (Figura 45). Há uma repetibilidade na altura dos picos mostrando uma boa estabilidade do bioreator após uma série prolongada destas injeções. Este comportamento, evidenciado em fluxo, pode caracterizar um biossistema reversível.

Figura 45. Sinais amperométricos para injeções alternadas de soluções de sulfito. (a) $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ obtidos utilizando um bioreator com a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco.

V. CONCLUSÕES

⇒ Nos ensaios espectrofotométricos constatou-se que a *polifenol oxidase* naturalmente imobilizada no mesocarpo fibroso do coco, possui:

* pH ótimo de atividade entre 5,0 e 6,0, à temperatura de 23 °C;

* boa estabilidade térmica;

* boa afinidade pelo substrato (catecol);

* apenas, atividade *cresolase*.

* estudos de inibição mostraram completa inativação na presença de 1 mmol L⁻¹ de cianeto, tiouréia, *l*-cisteína, ascorbato e sulfito.

⇒ A fácil construção e o bom desempenho analítico de reatores tubulares com mesocarpo fibroso do coco e casca/polpa de frutas da palmeira-leque (*Latania* sp) associados com sistemas de soluções em fluxo e detecção amperométrica, podem ser uma alternativa vantajosa para a determinação seletiva de *o*-dihidroxifenóis. Com esta associação, obteve-se um limite de detecção a nível $\mu\text{mol L}^{-1}$, uma frequência analítica de 60 análises h⁻¹ e uma ampla faixa de linearidade (de $\mu\text{mol L}^{-1}$ a mmol L⁻¹). Acima desta concentração observa-se diminuição do coeficiente linear do sinal de corrente em função da concentração de catecol.

⇒ Eletrodos de pasta de carbono com tecidos frescos ou secos de *Latania* sp respondem rapidamente (menos de 30 s) a adições sucessivas e crescentes de catecol, com rápido aumento de corrente seguido de estabilização em um novo patamar.

⇒ Pastas de carbono com tecidos de *Latania* sp possuem vida útil bastante prolongada.

⇒ A casca desidratada da *Latania* sp possui atividade enzimática superior ao da polpa.

⇒ Testes amperométricos evidenciaram atividades *monofenolase* e *cresolase* nos tecidos da palmeira-leque.

⇒ Demonstrou-se, pela primeira vez, a utilização de reatores empacotados com tecidos vegetais desidratados para a quantificação do conteúdo de água em meio orgânico. Este procedi-

mento é uma alternativa atraente por possuir seletividade, boas propriedades dinâmicas e vida útil prolongada.

⇒ Uma nova maneira foi registrada para a quantificação de íons sulfito. Reatores empacotados com mesocarpo fibroso do coco mostraram uma boa relação de corrente com a concentração logarítmica deste analito no intervalo de 1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

⇒ Os estudos envolvendo tecidos vegetais como fonte enzimática se constitui em campo relativamente novo. A presente tese abriu numerosas perspectivas de trabalho, as quais deverão ter continuidade no futuro, tanto nos laboratórios do Instituto de Química da USP, como também na Universidade Federal da Paraíba. Dentre as numerosas possibilidades, podem ser destacadas as seguintes:

⇒ A associação da espectrofotometria e de FIA para a determinação de parâmetros cinéticos de enzimas naturalmente imobilizadas se mostrou, ao mesmo tempo, extremamente simples e muito eficiente. Permite que se trabalhe com volumes elevados (minimizando problemas de homogeneização), reprodutibilidade de condições experimentais e rápida reposição do oxigênio consumido. A utilização direta do material tissular, é vantajosa sob o aspecto operacional, uma vez que elimina a extração e purificação de enzimas e acredita-se que, via de regra, muito mais representativa, uma vez que as alterações sofridas pelas enzimas ao serem extraídas, são minimizadas. O arranjo aqui desenvolvido, deverá ser explorado para avaliar parâmetros cinéticos de novos tecidos vegetais.

⇒ A fácil construção, aliada ao desempenho analítico de reatores empacotados com mesocarpo fibroso de coco e de casca/polpa de frutos de palmeira-leque como biocatalisadores seletivos a dihidroxifenóis apresentam muitas vantagens com relação aos esquemas tradicionais de imobilização enzimática. Aplicações na quantificação de produtos fenólicos em fármacos e medicamentos deverão ser implementadas.

⇒ A utilização dos mesmos reatores para a quantificação de umidade em amostras reais (especialmente em alimentos) em meios aquo-restritos voltará a ser investigada. Planeja-se investigar diversas amostras reais dentre as quais, cabe destacar, o monitoramento do teor de água em gasolina.

⇒ Ainda na mesma linha, a possibilidade de monitorar indiretamente interferentes, se constitui em outro vasto campo de trabalho. Ao longo do presente estudo, verificou-se a potencialidade de quantificar indiretamente não apenas sulfito, mas uma série de outras espécies de interesse analítico. Por exemplo, cianeto pode ser monitorado em baixas concentrações, sem inativar o material enzimático do tecido fibroso de coco. Baixas concentrações de espécies metálicas como mercúrio, cádmio e zinco podem ser quantificados com os reatores desenvolvidos. A inclusão de uma célula de difusão gasosa antes do reator, poderá permitir a quantificação de diversas espécies,

como sulfito e cianeto, com significativo aumento de seletividade. Aplicações como a quantificação de sulfito em alimentos e vinhos e de cianeto em banhos de eletrodeposição podem ser previstas.

⇒ desenvolvimento da forma de secagem dos tecidos estudados, abriu não apenas interessantes perspectivas quanto ao armazenamento, como também de sua aplicação a outros tecidos vegetais.

⇒ Um estudo importante a ser implementado será a avaliação do desempenho do tecido fibroso do coco para a transformação/destruição de resíduos fenólicos. Tais produtos se constituem em sério problema para numerosas empresas, requerendo muitas vezes amplas áreas para armazenamento/decomposição de resíduos. Planeja-se estudar diversas alternativas visando transformar tais produtos em compostos mais facilmente degradáveis ou catalisar a formação de novas espécies menos tóxicas, que possam ser retidas e/ou tratadas mais facilmente.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitaker, J.R. Analytical uses of enzymes. In: Gruenwedel, D.W.; Whitaker, J.R. (eds.). *Food Analysis Principles and Techniques* (v.3 Biological Techniques). New York: Marcel Dekker, 1985. p.297-377.
2. Whitaker, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1994, 625p.
3. Katzin, L.I.; Sandholzer, L.A.; Strong, M.E. *J. Bacteriol.*, v.45, p.265, 1943.
4. George, P. *Oxidases and Related Redox Systems*, vol. 1. In: King, T.E.; Mason, H.S.; Morrison, M. (eds.). New York: John Wiley, 1965.
5. Eichhorn, G.L.; Marzilli, L.G. Method for determining metal ion environments in proteins: structure and function of metalloproteins. In: Eichhorn, G.L.; Marzilli, L.G. (eds.) *Advances in Inorganic Biochemistry* (vol 2). New York: Elsevier, 1980.
6. Enzyme Nomenclature. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. New York: Academic Press, 1992.
7. Knapp, F.W.; Hall, C.B.; Buchanan, D.W.; Biggs, R.H. *Phytochemistry*, v.9, p.1453, 1970.
8. Griffith, T.; Conn, E.E. *Phytochemistry*, v.12, p.1651, 1973.
9. Brooks, D.W.; Dawson, Ch. R. Aspects of tyrosinase biochemistry. In: Peisach, J.; Aisen P.; Blumberg, W.E. (eds.). *The Biochemistry of Copper*. New York: Academic Press, 1966, p.343.
10. Whitaker, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Science*. New York: Marcel Dekker, 1972. Cap.22 e 24.
11. Bendall, D.S.; Gregory, R.P.F. Purification of phenol oxidases. In: Pridham, J.B. (ed.). *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. Oxford: Pergamon Press, 1966, p.7.
12. Robb, D.A.; Mapson, L.W.; Swain, T. *Phytochemistry*, v.4, p.731, 1965.
13. Stelzig, D.A.; Akhtar, S.; Ribeiro, S. *Phytochemistry*, v.11, p.535, 1972.
14. Walker, J.R.L. *Enzyme Technol. Dig.*, v.4, p.89, 1975.
15. Lanzarini, G.; Pifferi, P.G.; Zamorani, A. *Phytochemistry*, v.11, p.89, 1972.
16. Mayer, A.M. *Phytochemistry*, v.1, p.237, 1962.
17. Mason, H.S. *Adv. Enzymol.*, v.16, p.105, 1955.
18. Kahn, V. *J. Food Sci.*, v.42, p.38, 1977.
19. Moutounet, M.; Mondies, H. *Ann. Technol. Agric.*, v.25, p.343, 1976.
20. Griffiths, L.A. *Nature*, v.184, p.58, 1959.
21. Harrison, W.H.; Whisler, W.W.; Ko, S. *J. Biol. Chem.*, v.242, p.1660, 1967.
22. Kaldy, M.S.; Markakis, P. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, v.5, p.37, 1972.
23. Walker, J.R.L. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.17, p.575, 1964.
24. Harel, E.; Mayer, A.M.; Shain, Y. *Phytochemistry*, v.4, p.783, 1965.
25. Lavollay, J.; Legrand, G.; Lehongre, G.; Neumann, J. Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase. In: Pridham, J.B. (ed.). *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. Oxford: Pergamon Press, 1966, p.33.

26. Walker, J.R.L. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.17, p.360, 1964.
27. Rivas, N.J.; Whitaker, J.R. *Plant Physiol.*, v.52, p.501, 1973.
28. Soler, A.; Sabater, F.; Lozano, J.A. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, v.6, p.94, 1966.
29. Montedoro, M. *Ind. Agra.*, v.7, p.259, 1969.
30. Ndubizu, T.O.C. *J. Hortic. Sci.*, v.51, p.311, 1976.
31. Sisler, E.C.; Evans, H.J. *Plant Physiol.*, v.33, p.255, 1958.
32. Chaves, A.A.; Tomás, J. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, v.15, p.434, 1975.
33. Reyes, Ph.; Luh, B.S. *Food Technol.*, v.14, p.570, 1960.
34. Jen, J.J.; Kahler, K.R. *HortScience*, v.9, p.590, 1974.
35. Luh, B.S.; Phithakpol, B. *J. Food Sci.*, v.37, p.264, 1972.
36. Cash, J.N.; Sistrunk, W.A.; Stutte, C.A. *J. Food Sci.*, v.41, p.1398, 1976.
37. Ramaswamy, S.; Rege, D.V. *Ann. Aliment. Acad. Sci. Hung.*, v.4, p.355, 1975.
38. Knapp, F.W. *J. Food Sci.*, v.30, p.930, 1965.
39. Aylward, F.; Haisman, D.R. *Adv. Food Res.*, v.17, p.1, 1969.
40. Kahn, V. *J. Sci. Food Agric.*, v.26, p.1319, 1975.
41. Galeazzi, M.A.; Sgarbieri, V.C. Banana polyphenoloxidase. Varietal differences and partial characterization. In: *5th Int. Cong. Food Sci. Technol.*, Kyoto, Japan, September 1987, p.237.
42. Schaller, K. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, v.150, 211, 1972.
43. Hyodo, H.; Uritani, I. *J. Biochem.*, v.58, p.388, 1965.
44. Dawson, Ch. R.; Mager, R.J. *Methods in Enzymology*, v.5, p.817, 1962.
45. Joshi, P.R.; Shiralkar, N.D. *J. Food Sci. Technol. India*, v.14, p.77, 1977.
46. Thomas, P.; Janave, M.T. *J. Food Sci.*, v.38, p.1149, 1973.
47. Luh, B.S.; Tate, J.N.; Villareal, F. *Fruchtsaft-Ind. ver Confructa*, v.8, p.274, 1963.
48. Mihályi, K.; Vámos-Vigyázó, L.; Kiss-Kutz, N.; Babos-Szebenyi, É. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, v.7, p.57, 1978.
49. Palmer, J.K. *Plant Physiol.*, v.38, p.508, 1963.
50. Dimick, K.P.; Ponting, J.D.; Makover, B. *Food Technol.*, v.5, p.237, 1950.
51. Strübi, P.; Escher, F.; Neukom, H. *Ind. Obst-Gemüseverwert.*, v.60, p.349, 1975.
52. Dang, F.; Yankov, St. *Nauchni. Tr. Vissh. Inst. Khranit. Vkusova Promst.*, v.17, p.297, 1970.
53. Biedermann, W. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, v.47, p.86, 1956.
54. Schaller, A.; Vámos-Vigyázó, L. *Confructa*, v.23, p.90, 1978.
55. Kahn, V. *J. Sci. Food Agric.*, v.28, p.233, 1977.
56. Ishiguro, R.; Shinohara, R.; Aoyama, Y. *Eijo To Shokuryo*, v.23, p.13, 1970.
57. Weaver, M.L.; Brown, R.C.; Steen, H.A. *Am. Potato J.*, v.45, p.132, 1968.

58. Mathew, A.G.; Parpia, H.A.B. *Adv. Food Res.*, v.19, p.75, 1971.
59. Palladina, T.A.; Pervova, Yu. A. *Fiziol. Rast.*, v.13, p.238, 1966.
60. Ivanickaya, E.A.; Kuzin, A.M.; Kolomiiceva, I.K. *Chem. Abstr.*, v.66, p.16894t, 1967.
61. Duckworth, H.W.; Coleman, J.E. *J. Biol. Chem.*, v.245, p.1613, 1970.
62. Sorensen, H.A. *Biochem. Z.*, v.21, p.31, 1909.
63. Heyrousky, J. *Chem. Listy*, v.16, p.256, 1922.
64. Davies, P.W.; Brink Jr., F. *Rev. Sci. Instrum.*, v.13, p.524, 1942.
65. Free, A.H.; Free, H.M. *Gastroenterologia*, v.24, p.414, 1953.
66. Clark Jr., L.C. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, v.2, p.41, 1956.
67. Updike, S.J.; Hicks, G.P. *Nature*, v.214, p.986, 1967.
68. Janata, J. *J. Am. Chem. Soc.*, v.97, p.2914, 1975.
69. Lowe, C.R.; Goldfinch, M.J. *Biochem. Soc. Trans.*, v.11, p.446, 1983.
70. Lowe, C.R. *Biosensors*, v.1, p.3, 1985.
71. Kauffman, J.-M.; Guilbault, G.G. *Meth. Biochem. Anal.*, v.36, p.63, 1992.
72. Keating, M.Y.; Rechnitz, G.A. *Anal. Lett.*, v.18, p.1, 1985.
73. Fonong, T.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chem.*, v.56, p.148, 1984.
74. Scheller, F.W.; Schubert, F.; Renneberg, R.; Müller, H.-G.; Jänchen, M.; Weise, H. *Biosensors*, v.1, p.135-60, 1985.
75. Clark Jr., L.C.; Lyons, C. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.102, p.29, 1962.
76. Blaedel, W.J.; Jenkins, R.A. *Anal. Chem.*, v.48, p.124, 1976.
77. Durlat, H.; Comtat, M. *Anal. Chem.*, v.56, p.2586, 1984.
78. Briggs, J. *Nature*, v.329, p.565, 1987.
79. Ho, M.Y.K.; Rechnitz, G.A. An introduction to biosensors. In Nakamura, R.M.; Kasahara, Y.; Rechnitz, G.A. (eds.) *Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*. Washington: Am. Soc. Microbiol., 1992. 411p.
80. Sidwell, J.S.; Rechnitz, G.A. *Biosensors*, v.2, p.221, 1986.
81. Rechnitz, G.A. *Chem. Eng. News*, v.56 (oct.16), p.16, 1978.
82. Eggins, B.R.; Hickey, C.; Toft, S.A.; Min-Zhou, D. *Anal. Chim. Acta*, v.347, p.281, 1997.
83. Chen, Y.; Tan, T.-C. *Chem. Eng. Sci.*, v.51, p.1027, 1996.
84. He, X.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chim. Acta*, v.316, p.57, 1995.
85. Botre, F.; Botre, C.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Porcelli, F.; Scibona, G. *Sens. Actuators B*, v.15, p.135, 1993.
86. Wang, A.J.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chem.*, v.65, p.3067, 1993.
87. Tu, Y.F. *Anal. Lett.*, v.26, p.1557, 1993.
88. Mazzei, F.; Botre, F.; Botre, C. *Anal. Chim. Acta*, v.336, p.67, 1996.

89. Ozsoz, M.; Eadem, A.; Kilina, E.; Gokgunnec, L. *Electroanalysis*, v.8, p.147, 1996.
90. Oungpipat, W.; Alexander, P.W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta*, v.309, p.35, 1995.
91. Xu, Y.J.; Lu, C.Y.; Hu, Y.; Nie, L.H.; Yao, S.Z. *Anal. Lett.*, v.29, p.1069, 1996.
92. Horie, H.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chim. Acta*, v.306, p.123, 1995.
93. Oungpipat, W.; Alexander, P.W. *Anal. Chim. Acta*, v.295, p.37, 1994.
94. Wang, J.; Lu, F.; Lopez, D. *Biosens. Bioelectron.*, v.9, p.9, 1994.
95. Tan, T.C.; Chen, Y. *Sens. Actuators B*, v.17, p.101, 1994.
96. Uchiyama, S.; Hasebe, Y.; Shimizu, H.; Ishihara, H. *Anal. Chim. Acta*, v.276, p.341, 1993.
97. Fernandes, J.R.; de Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T.; Tubino, M. *Anal. Commun.*, v.33, p.397, 1996.
98. Mazzei, F.; Botre, F.; Lorenti, G.; Simonetti, G.; Porcelli, F.; Scibona, G.; Botre, C. *Anal. Chim. Acta*, v.316, p.79, 1995.
99. Chen, Y.; Tan, T.C. *Talanta*, v.42, p. 1181, 1995.
100. Chen, Y.; Tan, T.C. *Sens. Actuators B*, v.28, p.39, 1995.
101. Wang, J.; Kane, S.A.; Jie-Lin; Smyth, M.R.; Rogers, K. *Food Technol. Biotechnol.*, v.34, p.51, 1996.
102. Chut, S.L.; Li, J.; Tan, S.N. *Anal. Lett.*, v.30, p.1993, 1998.
103. Garguillo, M.G.; Michael, A.C. *Anal. Chim. Acta*, v.307, p.291, 1995.
104. Arnold, M.A.; Rechnitz, G.A. Biosensors based on plant and animal tissue. In: Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. (eds.) *Biosensors Fundamentals and Applications*. Oxford: Oxford University, 1987. p.30-59.
105. Smit, N.; Rechnitz, G.A. *Biotechnol. Lett.*, v.6, p.209, 1984.
106. Fang, Y.; Cai, R.; Deng, J.Q.; Deng, Z.F. *Electroanalysis*, v.4, p.819, 1992.
107. Uchiyama, S.; Rechnitz, G.A. *J. Electroanal. Chem.*, v.222, p.343, 1987.
108. Schubert, F.; Wollenberg, U.; Scheller, F. *Biotechnol. Lett.*, v.5, p.239, 1983.
109. Sidwell, J.S.; Rechnitz, G.A. *Biotechnol. Lett.*, v.6, p.209, 1984.
110. Wijesuriya, D.; Lin, M.S.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chim. Acta*, v.234, p.453, 1990.
111. Adams, R.N. *Anal. Chem.*, v.30, p.1576, 1958.
112. Adams, R.N. *Electrochemistry of Solid Electrodes*, New York: Marcel Dekker, 1969.
113. Adams, R.N. *Rev. Polarog.*, v.11, p.714, 1963.
114. Kalcher, K.; Kauffman, J.-M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z. *Electroanalysis*, v.7, p.5-22, 1995.
115. Olson, C.; Adams, R.N. *Anal. Chim. Acta*, v.29, p.358, 1963.
116. Kalcher, K. *Electroanalysis*, v.2, p.419, 1990.
117. Jacobs, E.S. *Anal. Chem.*, v.35, p.2112, 1963.
118. Gurentsova, O.I.; Prokhorova, G.V.; Osipova, E.A. *Zh. Anal. Khim.*, v.47, p.1671, 1992.
119. Kuwana, T.; French, W.G. *Anal. Chem.*, v.36, p.241, 1964.

120. Schultz, F.A.; Kuwana, T. *J. Electroanal. Chem.*, v.10, p.95, 1965.
121. Cheek, G.T.; Nelson, R.F. *Anal. Lett. A*, v.11, p.393, 1978..
122. Yao, T.; Musha, S. *Anal. Chim. Acta*, v.110, p.203, 1979.
123. Ravichadran, K.; Baldwin, R.P. *J. Electroanal. Chem.*, v.126, p.293, 1981.
124. Klibanov, A.M. *Chemtech*, v.16, p.354, 1986.
125. Dordick, J.S. *Enzyme Microb. Technol.*, p.11, p.194, 1989.
126. Wong, C.-H. *Science*, v.244, p.1145, 1989.
127. Mattiasson, B., Adlercreutz, P. *TIBTECH*, v.9, p.394, 1991.
128. Tramper, J.; Vermue, M.H.; Beekink, M.H.; Von Stockar, U. *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (eds.). Amsterdam: Elsevier, 1992.
129. Bremle, G.; Persson, B.; Gorton, L. *Electroanalysis*, v.3, p.77, 1991..
130. Wang, J.; Freiha, B.; Naser, N.; Gonzalez-Romero, E.; Wollenberg, U.; Ozsoz, M.; Evans, O. *Anal. Chim. Acta*, v.254, p.81, 1991.
131. Bonadkar, M.; Vilchez, J.; Mottola, H. *J. Electroanal. Chem.*, v.266, p.47, 1989.
132. Wang, J.; Romero, E.; Reviejo, A. *J. Electroanal. Chem.*, v.353, p.113, 1993.
133. Kacamikle, V.; Johansson, K.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Petersson, G.; Csoregi, E. *Electroanalysis*, ????
134. Wang, J.; Lin, M. *Anal. Chem.*, v.60, p.1545, 1988.
135. Wang, J.; Lin, M. *Electroanalysis*, v.1, p.43, 1989.
136. Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H.S.; Cho, M.Y. *Anal. Chim. Acta*, v.264, p.7, 1992.
137. Wang, J.; Brennsteiner, A. *Anal. Lett.*, v.21, p.1773, 1988.
138. Wang, J.; Naser, N.; Wollenberg, U. *Anal. Chim. Acta*, v.281, p.19, 1993,
139. Wang, J.; Ciszewski, A.; Naser, N. *Electroanalysis*, v.4, p.777, 1992.
140. Glazier, S.A.; Rechnitz, G.A. *Anal. Lett.*, v.22, p.2929, 1989.
141. Wang, J.; Naser, N.; Ozsoz, M. *Anal. Chim. Acta*, v.234, p.315, 1990.
142. Lin, M.S.; Tham, S.Y.; Rechnitz, G.A. *Electroanalysis*, v.2, p.511, 1990.
143. Navaratne, A.; Lin, M.S.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chim. Acta*, v.237, p.107, 1990.
144. Chen, L.; Lin, M.S.; Hara, M.; Rechnitz, G.A. *Anal. Lett.*, v.24, p.1, 1991.
145. Ozsoz, M.; Wang, J. *Electroanalysis*, v.3, p.655, 1991.
146. Wijesuriya, D.; Rechnitz, G.A. *Anal. Chim. Acta*, v.243, p.1, 1991.
147. Wang, J.; Wu, L.H.; Martinez, S.; Sanchez, J. *Anal. Chem.*, v.63, p.398, 1991.
148. Wang, J.; Naser, N. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v.27, p.441, 1992.
149. Lin, Z.H.; Qiao, W.J.; Wu, M. *Anal. Lett.*, v.25, p.1171, 1992.
150. Oungpipat, W.; Alexander, P.W. *Anal. Chim. Acta*, v.295, p.37, 1994.
151. Lin, M.S.; Hare, M.; Rechnitz, G.A. *Electroanalysis*, v.4, p.521, 1992.

152. Braco, L. *Mikrochim. Acta*, v.120, p.231, 1995.
153. Kazandjian, R.Z.; Dordick, J.S.; Klivanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.*, v.28, p.417, 1986.
154. Zaks, A.; Klivanov, A.M. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.3194, 1988.
155. Ross, N.W.; Schneider, H. *Enzyme Microb. Technol.*, v.13, p.370, 1991.
156. Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Macrae, A.R. *FEBS Lett.*, v.301, p.258, 1992.
157. Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D.; Macrae, A.R. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1122, p.143, 1992.
158. Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Macrae, A.R. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1118, p.218, 1992.
159. Zaks, A.; Klivanov, A.M. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.8017, 1988.
160. Zaks, A.; Klivanov, A.M. *Science*, v.224, p.1249, 1984.
161. Volkin, D.B.; Staubli, A.; Langer, R.; Klivanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.*, v.37, p.843, 1991.
162. Yang, Z.; Robb, D.A.; Halling, P.J. In: Tramper, J.; Vermue, M.H.; Beeftink, H.H.; von Stöckar, V. (Eds.). *Biocatalysis in Non-conventional Media*. Elsevier: Amsterdam, 1992.
163. Simonyan, M.A.; Naibandyan, R.M. *Biochim. Biophys. Acta*, v.446, p.432, 1976.
164. Dastoli, F.R.; Price, S.; *Arch. Biochem. Biophys.*, v.118, p.163, 1967.
165. Zaks, A.; Klivanov, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.82, p.3192, 1985.
166. Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A.P.G.; Klivanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.*, v.110, p.584, 1988.
167. Vasquez-Duhalt, R.; Fedorak, P.M.; Westlake, D.W.S. *Enzyme Microb. Technol.*, v.45, p.837, 1992.
168. Hockmull, M.D.; Lilly, M.D. In: Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M.D. (Eds.). *Biocatalysis in Organic Media*. Elsevier; Amsterdam, 1987.
169. Mozhaev, V.V.; Klmelnitsky, Y.L.; Sergeeva, M.V.; Belova, A.B.; Klyachko, N.L.; Levashov, A.V.; Martinek, K. *Eur. J. Biochem.*, v.184, p.597, 1989.
170. Klmelnitsky, Y.L.; Mozhaev, V.V.; Belova, A.B.; Sergeeva, M.V.; Martinek, K. *Eur. J. Biochem.*, v.198, p.31, 1991.
171. Belova, A.B.; Mozhaev, V.V.; Levashov, A.V.; Shergeeva, M.V.; Martinek, K.; Klmelnitsky, Y.L. *Biokhim. (Eng.)*, v.56, p.1357, 1991.
172. Kasche, V.; Michaelis, G.; Gahnski, B. *Biotechnol. Lett.*, v.13, p.75, 1991.
173. Klmelnitsky, Y.L.; Levashov, A.Y.; Klyachko, N.M.L.; Martinek, K. *Enzyme Microb. Technol.*, v.10, p.710, 1988.
174. Reichardt, C. *Solvents Effects in Organic Chemistry*. Verlag Chemie; Weinheim, 1979.
175. Laane, C.; Boeren, S.; Hilhorst, R.; Veeger, C. In: Laane, J.; Tramper, J.; Lilly, M.D. (Eds.). *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier: Amsterdam, 1987.
176. Martinek, K.; Semenov, A.N.; Beresin, I.V. *Biochim. Biophys. Acta*, v.76, p.658, 1978.
177. Kazandjian, R.Z.; Klivanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.*, v.107, p.5448, 1985.
178. Duff, S.J.B.; Murray, W.D. *Biotechnol. Bioeng.*, v.34, p.153, 1989.

179. Cantarella, M.; Cantarella, L.; Alfani, F. *Enzyme Microb. Technol.*, v.13, p.547, 1991.
180. Bonneau, P.R.; Eyer, M.; Graycar, T.P.; Stell, D.A.; Jones, J.B. *Bioorg. Chem.*, v.21, p.431, 1993.
181. Guinn, R.M.; Skerker, P.S.; Kavanaugh, P.; Clark, D.S.; *Biotechnol. Bioeng.*, v.37, p.303, 1991.
182. Martins, J.F.; de Sampaio, T.C.; de Carvalho, I.B.; Barreiros, S.; *Biotechnol. Bioeng.*, v.44, p.119, 1994.
183. Schneider, L.V. *Biotechnol. Bioeng.*, v.37, p.627, 1991.
184. Yennawar, H.P.; Yennawar, N.H.; Farber, G.K. *J. Am. Chem. Soc.*, v.117, p.577, 1995.
185. Volkin, D.B.; Klibanov, A.M. In: Creighton, T.E. (Ed.). *Protein Function, A Practical Approach*. IRL Press: Oxford, 1989.
186. Yang, Z.; Robb, D.A. *Enzyme Microb. Technol.*, v.15, p.1030, 1993.
187. Klibanov, A.M. *Chem. Tech.*, v.16, p.354, 1986.
188. Klibanov, A.M. In: Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M.D. (Eds.). *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier: Amsterdam, 1987.
189. Dordick, J.S. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.19, p.103, 1988.
190. Tanaka, A.; Kawamoto, T. In: Taylor, R.F. (Ed.). *Protein Immobilization: Fundamentals And Applications*. Marcel Dekker: New York, 1991.
191. Saini, S.; Hall, M.F.; Downs, M.E.A.; Turner, A.P.F. *Anal. Chim. Acta*, v.249, p1, 1991.
192. Hall, G.F.; Best, D.J.; Turner, A.P.F. *Enzyme Microb. Technol.*, v.10, p.543, 1988.
193. Hall, G.F.; Best, D.J.; Turner, A.P.F. *Anal. Chim. Acta*, v.213, p.113, 1988.
194. Díaz-García, M.E.; Valencia-González, M.J. *Talanta*, v.42, p.1763, 1995.
195. Connor, M.P.; Sanchez, J.; Wang, J.; Smyth, M.R.; Mannino, S. *Analyst*, v.114, p.1427, 1989.
196. Hall, G.F.; Turner, A.P.F. In *Biosensor '90: First World Conference on Biosensor*. Elsevier: Oxford; 1990. p.331.
197. Schubert, F.; Saini, S.; Turner, A.P.F. *Anal. Chim. Acta*, v.245, p.133, 1991.
198. Dong, S.; Guo, Y. *Anal. Chem.*, v.66, p.3895, 1994.
199. Miyabayashi, A.; Reslow, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. *Anal. Chim. Acta*, v.219, p.27, 1989.
200. Flygare, L.; Danielsson, B. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.542, p.485, 1989.
201. Danielsson, B.; Flygare, L. *Anal. Lett.* v.22, p.1417, 1989.
202. Taylor, R. F.; Marenchic, I. G.; Spencer, R. H. *Anal. Chim. Acta*, v.249, p.67, 1991.
203. Boeriu, C.G.; Dordick, J.S.; Klibanov, A.M. *Bio/Technology*, v.4, p.997, 1986.
204. Barzana, E.; Klibanov, A.M.; Karel, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.15, p.25, 1987.
205. Wang, J.; Wu, L.H.; Angnes, L. *Anal. Chem.*, v.63, p.2993, 1991.
206. Wang, J.; Lin, L.; Chen, Q. *Electroanalysis*, v.5, p.23, 1993.

207. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M.R. *Talanta*, v.41, p.1603, 1994.
208. Campanella, L.; Favero, G.; Sammartino, M.; Tommasetti, M. *Talanta*, v.41, p.1015, 1994.
209. Campanella, L.; Fortune, A.; Sammartino, M.; Tommasetti, M. *Talanta*, v.41, p.1397, 1994.
210. Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R. *Analyst*, v.119, p.265, 1994.
211. Mannino, S.; Cosio, M.S.; Wang, J. *Analyst*, v.119, p.2001, 1994
212. Hall, G.; Turner, A.P.F. *Anal. Lett.*, v.24, p.1375, 1991.
213. Wang, J.; Lin, Y.; Eremenko, A. V.; Ghindilis, A.L.; Kurochkin, I.N. *Anal Lett.*, v.26, p.197, 1993.
214. Stancik, L.; Macholán, L.; Scheller, F. *Electroanalysis*, v.7, p.649, 1995. .
215. Wang, J. *Talanta*, v.40, p.1905, 1993.
216. Wang, J.; Reviejo, A.J.; Mannino, S. *Anal. Lett.*, v.25, p.1399, 1992.
217. Wang, J.; Lin, Y.; Chen, L. *Analyst*, v.118, p.277, 1993.
218. Wang, J.; Reviejo, A.J. *Anal. Chem.*, v.65, p.845, 1993.
219. Wang, J.; Dempsey, E.; Eremenko, A.; Smyth, M.R. *Anal. Chim. Acta*, v.279, p.203, 1993.
220. Braco, L.; Darós, J.A.; de la Guardia, M. *Anal. Chem.*, v.64, p.129, 1992.
221. Valencia-Gonzalez, M.J.; Diaz-Garcia, M.E. *Anal. Chem.*, v.66, p.2726, 1994.
222. Woodroof, J. G. *Cocomuts: Production, Processing, Products*, Avi: Connecticut, 1970.
223. Mayer, A.M.; Harel, R. E. *Phytochemistry*, v.18, p.193, 1979.
224. Vámos-Vigyazo, L. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.15, p.49-127, 1981.
225. Robb, D.A. In: Lontie, R. (Ed.). *Copper Proteins Copper Enzymes*. vol II, CRC Press: Boca Ratón, FL, 1984. p.207.
226. Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. J.; Aubert, S.Y. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.34, p.109, 1994.
227. Sanchez-Ferrer, A.; Rodriguez-López, J. N.; Garcia-Carmona, F. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1247, p.1, 1995.
228. Kahn, V. *J. Food Sci.*, v.50, p.111, 1985.
229. Garcia-Carmona, F.; Pedreño, E.; Gallindo, J. D.; Garcia-Cánovas, F. *Anal. Biochem.*, v.95, p.433, 1979.
230. Mason, H. S. *J. Biol. Chem.*, v.172, p.83, 1948.
231. Vachtenheim, J.; Duchon, J.; Matous, B. *Anal. Biochem.*, v.146, p.405, 1985.
232. El-Bayoumi, M. A.; Frieden, E. *J. Am. Chem. Soc.*, v.79, p.4854, 1957.
233. Carlson, B. W.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, v.107, p.479, 1985.
234. Rzepecki, L. M.; Waite, J. H. *Anal. Biochem.*, v.179, p.375, 1989.
235. Gaillard, F.; Richard-Forget, F.; Nicolas, J. *Anal. Biochem.*, v.215, p.59, 1993.
236. Shin, T.; Murao, S.; Matsumura, E. *Anal. Biochem.*, v.116, p.380, 1987.

237. Gauillard, F.; Richard-Forget, F.; Nicolas, J. *Anal. Biochem.*, v.215, p.59, 1993.
238. Lee, P. M.; Lee, K.; Karim, M. I. A. *J. Sci. Food Agric.*, v.55, p.251, 1991.
239. Benjamin, N. D.; Montgomery M. W. *J. Food Sci.*, v.38, p.799, 1973.
240. Wood, B.J.; Ingraham, L.L. *Nature*, v.205, p.291, 1965.
241. Lerch, K. In: Lory, J.; Lamp, J. (Eds.). *Invertebrate oxygen binding proteins. Proceedings Workshop*. New York: Marcel Dekker, 1981, p.259-65.
242. Oktay, M.; Küfrevioglu, I.; Kocaçaliskan, I.; Sakiroglu, H. *J. Food Sci.*, v.60, p.494, 1995.
243. McCord, J.D.; Kilara, A. *J. Food Sci.*, v.48, p.1479, 1983.
244. Yemenicioglu, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B. *J. Food Sci.*, v.62, p.508, 1997
245. Aquilera, J.M.; Oppermann, K.; Sanchez, F. *J. Food Sci.*, v.52, p.990, 1025, 1987
246. Ansah, Y.J.O. *J. Agric. Food Chem.*, v.37, p.901, 1989.
247. Strübi, P.; Escher, F.; Neukom, H. *Herstellung. Ind. Obst-Gemüseewert.*, v.60, p.349, 1975.
248. Heil, J.R.; McCarthy, M.J.; Merson, R.L. *J. Food Sci.*, v.53, p.1717, 1988.
249. Shaldom, B.; Kahn, N.; Harel, E.; Mayer, A. M. *Phytochemistry*, v.16, p.1153, 1977.
250. Oda, Y.; Kato, H.; Isoda, Y.; Takahashi, N.; Yamamoto, T.; Takada, Y.; Kudo, S. *Agric. Biol. Chem.*, v.53, p.2053, 1989.
251. Chaplin, M. F. *Phytochemistry*, v.17, p.1987, 1978.
252. Lourenço, E. J.; Neves, V. A.; Silva, M. A. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p.2329, 1992.
253. Lourenço, E. J.; Leão, J. S.; Neves, V. A. *J. Sci. Food Agric.*, v.52, p.249, 1990.
254. Batisti, J. P.; Lourenço, E. J. *Food Chem.*, v.18, p.251, 1985.
255. Sharma, R.C.; Ali, R. *Phytochemistry*, v.19, p.1597, 1980.
256. Anosike, E.O.; Ayaebene, A.O. *Phytochemistry*, v.20, p.2625, 1981.
257. Hasegawa, S.; Maier, V.P. *J. Agric. Food Chem.*, v.28, p.891, 1980.
258. Park, E. Y.; Luh, B.S. *J. Food Sci.*, v.50, p.678, 1985.
259. Sharma, R.; Rashid, A. *Phytochemistry*, v.19, p.1597, 1980.
260. Lourenço, E.J.; Neves, V.A.; Silva, M.A. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.12, p.83, 1992.
261. Robb, D.A.; Swain, T.; Mapson, L.W. *Phytochemistry*, v.5, p.665, 1966.
262. Fresenius, W.; Quentin, K.E.; Schneider, W. (eds.). *Water Analysis: A Practical Guide To Physico-Chemical, Chemical And Microbiological Water Examination And Quality Assurance*. Springer-Verlag: Berlin, 1988.
263. Berger, T.A.; Deye, J.F. *J. Chromatograph. Sci.*, v.29, p.54, 1991.
264. Buchholz, K.D.; Parwllszyn, J. *Anal. Chem.*, v.66, p.160, 1994.
265. Welasco, A.; Rui, X.; Silva, M.; Perez-Bendit, D. *Talanta*, v.40, p.1505, 1993.
266. Ettinger, M.B.; Ruchoft, C.C.; Lischka, R.J. *Anal. Chem.*, v.23, p.1783, 1951.
267. Kotte, H.; Grundig, B.; Vorlop, K.-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U. *Anal. Chem.*, v.67, p.65, 1995.

- 268.Ortega, F.; Dominguez, E.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. *J. Chromatograph.*, v.675, p.65, 1994.
- 269.Önnerfjord, P.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Dominguez, E. *Bios. Bioelectron.*, v.10, p.607, 1995.
- 270.Campanella, L.; Su, Y.; Tomassetti, M.; Crescentini, G.; Sammartino, M.P. *Analisis*, v.22, p.58, 1994.
- 271.Yaropolov, A.; Kharybin, A.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L. *Anal. Chim. Acta*, v.308, p.137, 1995.
- 272.Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. *Anal. Chim. Acta*, v.311, p.245, 1995.
- 273.Cosnier, S.; Innocent, Ch. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v.31, p.147, 1993.
- 274.Skládál, P. *Collect. Czech. Commun.*, v.56, p.1427, 1991.
- 275.Kulys, J.; Schmid, R.D. *Anal. Lett.*, v.23, p.589, 1990.
- 276.Sidwell, J.S.; Rechnitz, G.A. *Biotechnol. Lett.*, v.7, p.419, 1985.
- 277.Uchiyama, S.; Tamata, M.; Tofuku, Y.; Suzuki, S. *Anal. Chim. Acta*, v.208, p.287, 1988
- 278.Horowitz, N.; Fling, M.; Horn, G. *Methods Enzymol.*, v.17A, p.615, 1970.
- 279.Bell, G.H.; Davidson, J.N.; Emslie-Smith, D. *Textbook of Physiology and biochemistry*. 8th ed. Churchill Livingstone: London, 1968. p.114.
- 280.Bohinski, R.C. *Modern Concepts in Biochemistry*. 5th ed. Allyn Bacon: Boston, 1987, p.215.
- 281.Mason, H.S. *Adv. Enzymol.*, v.19, p.79, 1957.
- 282.Solomon, E.I. In: King, T.E., Mason, H.S.; Morrison, M. (Eds.). *Oxidases and Related Redox Systems*. (Vol 274.) A.R. Liss: New York, 1988. p.309-29.
- 283.Espín, J.C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; Garcia-Cánovas, F. *Anal. Biochem.*, v.231, p.237, 1995.
- 284.Koupparis, M.A.; Malmstadt, H.V.; *Anal. Chem.*, v.54, p.1914, 1982.
- 285.Isenggaard, H.-D. *Trends Food Sci. Technol.*, v.6, p.155, 1995.
- 286.Isenggaard, H.-D.; Schmitt, K. *Mikrochim. Acta*, v.120, p.329, 1995.
- 287.Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H.; Cho, M. *Anal. Chim. Acta*, v.213, p.113, 1988.
- 288.Dolmanova, I.; Shekhovtsova, T.; Kutcheryaeva, V. *Talanta*, v.34, p.201, 1987.
- 289.Karube, I.; Sogabe, S.; Matsunaga, T.; Suzuki, S. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.17, p.216, 1983.
- 290.Matsumoto, K.; Matsubara, H.; Ukeda, H.; Osajima, Y. *Agric. Biol. Chem.*, v.53, p.2347, 1989.
- 291.Mulchandani, A.; Groom, C.A.; Luong, J.H.T. *J. Biotechnol.*, v.18, p.91, 1991.
- 292.Fassnidge, J.; van Engel, E. *ASBC J.*, v.48, p.122, 1990.
- 293.Smith, V.J. *Anal. Chem.*, v.59, p.2256, 1987.
- 294.Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C. *Anal. Chim. Acta*, v.354, p.51, 1997
- 295.LuValle, J.E. *J. Am. Chem. Soc.*, v.74, p.2970, 1952.

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais:

ANTONIO WILLIAM OLIVEIRA LIMA

Local e Data de Nascimento: Fortaleza (Ce) - 22 de novembro de 1949.

2. Educação:

1º Grau (1956 - 1963): Colégio Diocesano de Patos (Patos - PB) e Colégio Salesiano São João Bosco (Juazeiro do Norte - Ce)

2º Grau (1964 - 1966): Colégio Castelo Branco (Fortaleza - Ce)

Graduação (1968 - 1971): Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza - Ce)

Mestrado (1978 - 1981): Escola Superior de Agricultura de Lavras (Universidade Federal de Lavras): M.Sc. Ciência dos Alimentos (Lavras - MG). (Predição de vida de prateleira de banana nanica (*Musa cavendish*, L.) liofilizada com base na cinética de transferência do vapor d'água em filmes flexíveis). Orientador: Prof. Dr. José Cal-Vidal.

3. Ocupação:

Professor Adjunto do Departamento de Tecnologia Química e Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (1976 até o presente)

Bolsista: CAPES

4. Publicações:

4.1 Congressos Nacionais (últimos quatro anos):

Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L. Determinação amperométrica em fluxo de catecol mediante bio-conversão com polifenol oxidase de coco (*Cocos nucifera*, L.). *VIII Encontro Nacional de Química Analítica*, Belo Horizonte, MG, 1995. Resumos, p.101.

- Lima, A.W.O.; Vidsiunas, E.K.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L. Biorreatores de tecido vegetal da *Latania* sp para a quantificação amperométrica de catecol. *XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 1996. Resumos, EQ 053.
- Lima, A.W.O.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L. Biossensores de tecidos vegetais em meio orgânico para a determinação de umidade. *XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, 1996. Resumos, EQ 054.
- Vidsiunas, E.K.; Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Angnes, L. Biossensores de tecido vegetal para a detecção amperométrica de catecol. *13ª. Semana da Química, Instituto de Química, IQ/USP*, São Paulo, 21 a 25 de Out. 1996..
- Lima, A.W.O.; Richter, E.M.; Angnes, L. Determinação das características bioquímicas de polifenoloxidase naturalmente imobilizada empregando análise em fluxo contínuo com detecção espectrofotométrica. *XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Poços de Caldas, MG, 1998. Resumos, QA-103.
- Lima, A.W.O.; Matos, R.C.; Angnes, L. Resolução voltamétrica de ácido ascórbico e dopamina sobre eletrodos modificados com paládio. *XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Poços de Caldas, MG, 1998. Resumos, QA-?

4.2 Congresso Internacional

- Lima, A.W.O.; Vidsiunas, E.K.; Nascimento, V.B.; Angnes, L. Tissue electrodes from *Latania* sp. An extraordinary source of naturally immobilized polyphenoloxidase. *Fifth World Congress on Biosensors*, Berlin, 03 a 05 jun 1998 (trabalho aceito).

4.3 Publicações em Revistas Nacionais:

- Sousa, C.P.; Lima, A.W.O.; Carbajal, F.R. Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em I. águas marinhas costeiras e II. em carne de caranguejo na cidade de João Pessoa-Pb. *B. CEPPA*, v.9, p.39, 1991 e v.9, p.128, 1991.
- Delgado da Silva, M.C.; Stanford, T.L.M.; Lima, A.W.O. Condições sanitárias de carne de sol comercializada no município de Recife - Pe.I. Indicações de contaminação e II. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. *Arquivo Biologia e Tecnologia*, v.35, p.361, 1992 e v.35, p.375, 1992.
- Silva, J.A.; Lima, A.W.O.; Carbajal, F.A.R.; Leuthier, S.M.F. Processamento de mortadelas formuladas com matérias primas vegetais. *Bol. SBCTA*, v.26, p.13, 1992.
- Silva, J.A.; Lima, A.W.O.; Carbajal, F.A.R.; Leuthier, S.M.F. Avaliação microbiológica de mortadelas formuladas com matérias primas vegetais. *Bol. CEPPA*, v.11, p.71, 1993.
- Travassos, A.E.R.; Lima, A.W.O.; Sousa, C.P. Modificações da microbiota láctica e contaminante durante a fermentação natural de hortaliças. *Bol CEPPA*, v.11, p.53, 1993.

- Lima, A.W.O.; Angnes, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em Química Analítica. *Química Nova* (aceito para publicação; artigo já revisado).
- Lima, A.W.O.; Angnes, L. Aplicações potenciais de biossensores na indústria de alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* (artigo aceito para publicação; em revisão).
- Lima, A.W.O.; Angnes, L. Biossensores microbianos: aplicações em Química Analítica. (*Arquivos de Ciência e Tecnologia* (artigo de revisão).

4.4 Publicações em Revistas Internacionais

- Lima, A.W.O.; Cal-Vidal, J. Hygroscopic behaviour of freeze dried bananas. *Journal of Food Technology*, v.18, p.687, 1983.
- Lima, A.W.O.; Cal-Vidal, J. Estimation of shelf-life of film packaged freeze dried banana. *Journal of Stored Products Research*, v.24, p.73, 1988.
- Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L. Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v.354, p.325-331, 1997