UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FISICA DE SÃO CARLOS
INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
GRUPO DE POLÍMEROS BERNHARD GROSS

ELYS RAQUEL ANDRADE FERREIRA

Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação como biossensores amperométricos na análise de compostos fenólicos

São Carlos-SP
2007

ELYS RAQUEL ANDRADE FERREIRA

Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação como biossensores amperométricos na análise de compostos fenólicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais
Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Débora Gonçalves

São Carlos-SP

2007

CLASS. TE 1898
CUTTER.....
TOMBO. 1898

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Ferreira, Elys Raquel Andrade
Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação de biosensores amperométricos na análise de compostos fenólicos/Elys Raquel Andrade Ferreira; orientadora Débora Gonçalves. São Carlos, 2007.
62p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos,Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Polifenol oxidase (PFO). 2. Biosensores. 3. Polipirrol (PPI). I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elys Raquel Andrade Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovado em: 14/12/2007

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Débora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro

Instituição: UFSCar Assinatura_____

DEDICATÓRIA

Á minha Família Sr. Ferreira, Dona Raimundinha, Cláudia, Marcus e ao Prof. Dr. Célio Borges pelo apoio, compreensão, amor e oportunidade concedida.

AGRADECIMENTOS

- A Profª. Drª. Débora Gonçalves, minha orientadora, pela transmissão de conhecimento, confiança e paciência depositada em mim.
- Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães pelo apoio e discussões levantadas.
- Ao meu querido esposo Prof. Dr. Célio Borges pelas discussões, sugestões, pelo incentivo, amor, carinho, paciência e por estar ao meu lado ao longo desses anos.
- A todos os amigos pelas valiosas colaborações e apoio oportunos:

  Gustavo, Rodrigo (Guidoval), André, Juliana, Vananélia, Valquiria e Vitor, Marli, Pagliai, Edivaldo, Miguel, Alexandre, Bruna Vicente e Deuzuita, Karla, Thais e em especial ao meu amigo Edson Fernandes.
- Ao Pessoal Técnico:

  Ademir, Níbio, Bertho, Débora Balogh, Rosângela e a todos da biblioteca.

A todos meus agradecimentos

USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

RESUMO

Nesta dissertação, a polifenol oxidase (PFO) como extrato bruto de abacate (*Persea americana*) foi imobilizada em filmes de polipirrol (PPI) sintetizados eletroquimicamente utilizando o glutaraldeído (GA) como um agente de ligação entrecruzada. Os filmes PPI e PPI/PFO-GA foram caracterizados por eletroquímica, principalmente voltametria cíclica, sendo avaliadas a eletroatividade e a reversibilidade eletroquímica. A detecção de compostos fenólicos em soluções padrão foi feita por cronoamperometria, tendo um controle sobre a concentração dos compostos. O processo de transferência de massa foi monitorado com uma microbalança de cristal de quartzo eletroquímica. Os resultados indicaram uma boa reprodutibilidade das medidas na detecção dos compostos fenólicos. A estabilidade do biossensor em uma solução tampão manteve-se durante 27 dias, um resultado aceitável já que é encontrado na literatura um tempo de vida estável para sistemas semelhantes em torno de 30 dias.

Palavras - chave: Polifenol oxidase (PFO). Biossensores. Polipirrol (PPI).

ABSTRACT

In this dissertation, polyphenol oxidase (PPO) as crude extract of avocado (Persea americana) was immobilized on electrochemically synthesized polypyrrole (PPY) films using glutaraldehyde (GA) as a crosslinking agent. PPY and PPY/PPO-GA films were electrochemically characterized, mainly by cyclic voltametry, where electroactivity and electrochemical reversibility were evaluated. The detection of phenolic compounds in standard samples was made by chronoamperometry with a control over the compound concentration. The process of mass transfer was monitored with an electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM). Our results indicated a good repeatability of the measurements for the detection of phenolic compounds. The stability of biosensor in a buffer solution has remained for 27 days, a result acceptable since it is found in the literature a time of life stable for similar systems around 30 days.

Keywords: Polyphenol oxidase (PPO). Biosensors. Polypyrrole (PPY).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um biossensor 15

Figura 2. Modelo esquemático do sítio ativo da tirosinase (PFO) [18] 17

Figura 3. Mecanismo das reações nos eletrodos enzimáticos para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente, das enzimas, CF = composto fenólico [25] 19

Figura 4. Estrutura das unidades monoméricas dos polímeros orgânicos condutores mais estudados 20

Figura 5. Ilustração de uma célula eletroquímica mostrando os eletrodos de trabalho (a),de referência (b),calomelano (c) além da entrada (d) e saída (e) de N_2 24

Figura 6. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática [10] 26

Figura 7. Gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk 28

Figura 8. Molécula de glutaraldeído (GA) 28

Figura 9. Voltamograma cíclico mostra a curva de resposta corrente–voltagem sendo J_{pa} e J_{pc} as densidades de corrente de pico anódica e catódica, respectivamente. No detalhe, a forma do potencial elétrico aplicado é mostrado com o potencial inicial (E_{in}), o potencial de inversão (E_{inv}) e o potencial final (E_{fn}) 31

Figura 10. Estudo do efeito do pH de 4,5 a 8,0 em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$, 0,02 mol L^{-1} de glutaraldeído (25%), 600μ mol L^{-1} de catecol, v=50 mV s^{-1} 35

Figura 11. Influência da temperatura na resposta do biossensor. Condições: tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}) em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,02 mol L^{-1} de glutaraldeído (25%), v=50 mV s^{-1} 37

Figura 12. Efeito da quantidade de enzima (PFO) na resposta do biossensor em solução tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}) em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol 38

Figura 13. Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,1 mol L^{-1}) em tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1})..... 39

Figura 14. Máximo da absorbância a um comprimento de onda fixo (λ = 402nm) em função do tempo para uma solução contendo 0,2 mL de extrato bruto (PFO) e 0,1 mol L^{-1} de catecol..... 40

Figura 15. Efeito do potencial operacional sobre a resposta do biossensor determinação do catecol em uma solução contendo 600 μmol L^{-1} de catecol e 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5). 41

Figura 16. Estabilidade do biossensor PPI/PFO-GA obtida em 600 μmol L^{-1} de catecol e 0,1 mol..... 42

Figura 17. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ a v = 50 mV s^{-1}..... 44

Figura 18. Curva de corrente máxima em função do número de ciclos obtidos pelo voltamograma cíclico da Figura 17..... 44

Figura 19. Dependência da densidade de corrente a um potencial fixo com concentração de glutaraldeído (20 a 200 μmol L^{-1}) usado durante a síntese dos filmes de PPI..... 45

Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos filmes: a) PPI e PPI/PFO, b) PPI/PFO-GA foram preparados em 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,02 mol L^{-1} de GA (25%) para os filmes com GA..... 46

Figura 21. Perfil da estabilidade do biossensor PPI/PFO/GA comparado com o biossensor PPI/PFO em função do numero de determinações. Respostas amperométrica foram obtida em solução de tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}), v = 50 mV s^{-1}..... 47

Figura 22. Cronoamperogramas dos filmes PPI/PFO-GA em meios de diferentes concentrações de (A) atrazina, (B) catecol, (C) pirogalol e (D) hidroquinona após variar a concentração de 200-4000 μmol L^{-1} em tampão fosfato com pH 6,5..... 49

Figura 23. Curva de calibração para os compostos fenólicos (a) catecol, (b) atrazina, (c) pirogalol e (d) hidroquinona em tampão fosfato pH 6,5..... 50

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Figura 24. Curvas eletrogravimétricas durante o processo de formação do filme de PPI sobre o eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$,de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, v = 50 mV s^{-1}... 52

Figura 25. Variação de massa em função do tempo para o crescimento do filme de PPI em solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,1 mol L^{-1} de PPI, v = 50 mV s^{-1} 53

Figura 26. Variação da freqüência em função do potencial para o filme de PPI em solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,1 mol L^{-1} de pirrol, = 50 mV s^{-1}. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Reprodutibilidade de medidas obtidas com o filme PPI/PFO-GA em compostos fenólicos 48

Tabela 2 – Principais características analíticas do filme PPI/PFO-GA..... 50

Sumário

CAPÍTULO 1 ..... **13**

1.1 MOTIVAÇÃO 13
1.2 INTRODUÇÃO 14
1.3 OBJETIVOS 21

CAPÍTULO 2 ..... **23**

2.1 MATERIAIS 23
2.1.1 Compostos *23*
2.1.2 Enzima *23*
2.1.3 Eletrossíntese dos filmes de polipirrol e medidas eletroquímicas *24*
2.2 MÉTODOS 25
2.2.1 Cinética Enzimática *25*
2.2.2 Equação de Michaelis-Menten *25*
2.2.3 Equação de Lineweaver-Burk *27*
2.2.4 Glutaraldeído *28*
2.2.5 Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase *29*
2.2.6 Imobilização da polifenol oxidase *29*
2.2.7 Voltametria cíclica *31*
2.2.8 Cronoamperometria *32*
2.2.9 Microbalança de Cristal de Quartzo *32*

CAPÍTULO 3 ..... **34**

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
3.1.1 Otimização de parâmetros para o biossensor *34*
3.1.2 Eletrossíntese do polipirrol *42*
3.1.3. Imobilização enzimática *45*
3.1.4 Concentração de glutaraldeído *45*
3.1.5 Imobilização da enzima na matriz polimérica *46*
3.1.6.Desempenho do biossensor *47*
3.1.7 Resposta do biossensor PPI/PFO-GA em presença de diferentes compostos fenólicos. *48*
3.1.8 Curvas de calibração para diferentes compostos fenólicos *49*
3.1.9 Monitoramento do processo de formação e de resposta dos filmes de PPI por medidas eletrogravimétricas *52*

CAPÍTULO 4 ..... **55**

4.1 CONCLUSÕES 55

CAPÍTULO 5 ..... **56**

5.1 REFERÊNCIAS 56

EESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

CAPÍTULO 1

Este capítulo trata dos aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de biossensores, dentro de um contexto histórico. O objetivo e a motivação deste trabalho são também apresentados.

Esta dissertação foi dividida da seguinte forma: no CAPITULO 1, apresentamos um breve levantamento histórico sobre biossensores, a motivação e os objetivos que nos levaram à realização deste trabalho. No CAPITULO 2, destacam-se os materiais e métodos utilizados na preparação dos sistemas polímeros/enzimas, além da parte instrumental. Os resultados e discussão são apresentados no CAPITULO 3. O CAPITULO 4 apresenta as conclusões desta dissertação e, finalmente, o CAPITULO 5, as referências bibliográficas.

1.1 MOTIVAÇÃO

Os fenóis são contaminantes do solo e da água e amplamente usados como herbicidas e pesticidas[1,2]. Para a detecção destes compostos, as técnicas de espectroscopia e de cromatografia exigem instrumentos caros e consomem tempo. Portanto, é de interesse o desenvolvimento de dispositivos simples, sensíveis e apurados, porém, portáveis, para a determinação de fenóis.

Neste sentido, o desenvolvimento de novos biossensores tem merecido bastante destaque na literatura especializada, porém, relativamente poucos pesquisadores têm se voltado para sistemas enzima/polímero. Os polímeros mais utilizados em sensores

enzimáticos são os denominados condutores, tais como a polianilina, politiofeno, polipirrol e os seus derivados. O interesse em polímeros como matrizes de enzimas se justifica pela perspectiva de se preparar sistemas com diferentes áreas, tamanhos, flexíveis, a um baixo custo, com materiais relativamente estáveis e em diferentes áreas de aplicação, como em medicina, meio ambiente, alimentos e bebidas [3,4].

Embora necessite apresentar melhoras, em particular em suas características de permeação, seletividade e durabilidade, o polipirrol (PPI) e os seus derivados são ainda os polímeros mais viáveis para aplicação em biossensores, pois podem ser facilmente eletrossintetizados sob condições brandas, ou seja, em vários meios (inclusive aquoso) a relativamente com baixos potenciais e com diferentes técnicas – potenciometria, amperometria ou voltametria cíclica. Além disso, são compatíveis com uma série de compostos biológicos.

1.2 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a aplicação de novos materiais como os sensores têm proporcionado significativos avanços em diversos setores da sociedade. Nas últimas décadas, estes avanços têm contribuído para uma melhora na qualidade de vida, particularmente em setores como alimentos, medicina, meio ambiente, biotecnologia, comunicação, etc. As indústrias, de um modo geral, se beneficiam pelo uso destes sensores como, por exemplo, na determinação de glicose em café instantâneo[5] e de sulfito em alimentos[6,7]. Na área farmacêutica, pode-se vir a determinar o ácido ascórbico, a dopamina e a adrenalina em fármacos. Na medicina, os sensores são úteis na determinação de uréia em urina e em soro humano como medidores de glicose. Por último, eles podem ser usados no controle ambiental na determinação de pesticidas. Este interesse crescente em sensores deve-se a uma capacidade

de resposta rápida e seletiva na presença de um composto especifico em uma mistura de componentes sem perturbar o sistema.

Os biossensores combinam um elemento de reconhecimento biológico (o receptor) a um transdutor. Um esquema geral de um biossensor é ilustrado na Figura 1.

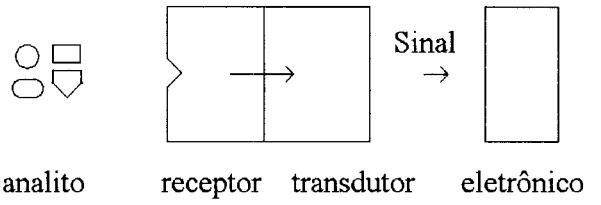

Figura 1. Ilustração de um biossensor.

Os biossensores podem ser considerados um subgrupo dos sensores químicos e que apresentam definição e classificação estabelecidas [8]. Eles apresentam moléculas biológicas imobilizadas (freqüentemente enzimas) que interagem com um analito de interesse e produzem um sinal químico detectado por um transdutor. O transdutor converte o sinal em uma resposta mensurável, freqüentemente em um sinal elétrico[9]. Este sinal pode resultar em uma mudança da concentração de prótons, liberação ou absorção de gases, como amônia ou oxigênio, emissão, absorção de luz, emissão de calor, trazendo assim uma informação sobre a reação catalisada pela enzima.

As enzimas foram os primeiros componentes biológicos a serem usados na construção de biossensores, seja na forma purificada, seja na forma de extratos brutos de plantas e de vegetais, tecidos animais e de anticorpos como fontes enzimáticas. Elas são catalisadoras especiais de origem biológica, existem em todos os organismos vivos, aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, dentre outros, e têm uma massa molar que varia de cerca de doze mil até acima de um milhão[10]. Algumas enzimas não contêm nenhum outro grupo químico, além de resíduos de aminoácidos; outras, para terem uma atividade, necessitam de um componente químico

adicional, chamado de cofator, não ligado à molécula da enzima, mas na ausência dele, a enzima fica inativa[10].

Na década de 60, surgiu o primeiro biossensor desenvolvido por Updike e Hicks[11], utilizando a glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrimalida. O consumo de oxigênio foi detectado pela aplicação de um potencial alto o suficiente para haver a redução do mesmo na superfície de um eletrodo de Pt. A resposta do sistema quantificou a variação de concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, era proporcional à concentração de glicose. Desde então, diferentes biossensores têm sido desenvolvidos, pois, em princípio, qualquer componente biológico pode ser combinado com um transdutor para produzir um biossensor operacional.

A enzimologia sistemática começou a ser divulgada no século XIX, com os procedimentos de purificação e determinação de estruturas protéicas. Hoje, cerca de 600 substâncias são determinadas por processos enzimáticos[12,13]. A classificação das enzimas envolve uma divisão em seis grupos principais, de acordo com o tipo de reações que elas catalisam: oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases[14]. A classe das enzimas oxido-redutases é muito interessante, sendo muito utilizada na construção de biossensores amperométricos, já que elas catalisam reações químicas redox, envolvendo uma etapa de transferência de elétrons no ciclo natural da enzima. Os três grupos de oxido-redutases mais usados em configurações de biossensores são as oxidases, desidrogenases e peroxidase[14]. Nesta dissertação, estudamos a polifenol oxidase (tirosinase).

Em 1895, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina[15]. Em 1896, foi atribuído o nome tirosinase à enzima presente no cogumelo[15]. Atualmente, a enzima denominada polifenol oxidase é conhecida também como tirosinase, cresolase, catecolase, difenolase e fenolase[16].

A tirosinase, ou polifenol oxidase (PFO), é uma enzima tetramérica com uma massa molar da ordem de 128 kDa[16]. Os sítios ativos desta molécula consistem de dois átomos de cobre coordenados com histidinas, conforme mostra esquematicamente a Figura 2. A PFO exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenolase) para *o*-difenóis, que são convertidos a *o*-quinonas[17].

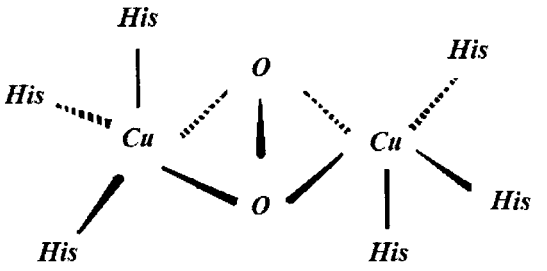

Figura 2. Modelo esquemático do sítio ativo da tirosinase (PFO)[18].

A PFO é uma enzima que catalisa a conversão de um composto fenólico (substrato) a uma quinona, que pode ser reduzida eletroquimicamente e permite assim a detecção do analito fenólico[19]. Os esforços para se usar a PFO como uma ferramenta analítica na determinação de fenóis e catecóis com transduções eletroquímicas tiveram início em 1977[20]. Desde então, biossensores baseados na PFO têm sido elaborados na detecção de fenóis com várias formas eletroquímicas de detecção[21].

No Brasil, destaca-se o trabalho sobre um sistema para a determinação de dopamina em amostras farmacêuticas utilizando extrato bruto de abacate (*Persea americana*) como fonte da PFO[16]. Neste caso, os trabalhos de Fatibello *et al* [21,22] foram os pioneiros no desenvolvimento de biossensores com o uso de fontes naturais de enzimas (vegetais e frutas). Em geral, estes biossensores se mostram mais eficientes, pois as enzimas em seu ambiente natural tendem a atuar com maior eficiência. Além disto, é sempre uma opção atraente se substituir uma enzima purificada, de alto custo, por materiais orgânicos naturalmente ricos em enzimas [21].

Nos últimos anos, vários materiais biológicos, tais como, células bacterianas, tecidos animais e de plantas, têm sido testados como componentes biocatalíticos de biossensores. Neste sentido, o Brasil é muito rico em fonte de enzimas de extrato bruto enzimático para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento[23]. Embora o uso de extratos brutos possa apresentar certa desvantagem na seletividade do método analítico, é extremamente econômico, simples e geralmente com um tempo de vida longo [23].

Para a determinação de compostos fenólicos pode-se utilizar biossensores amperométricos, cuja principal vantagem está na possibilidade de se medir a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo em potenciais próximos a 0,0 mV *vs* ECS. Nesta região de potenciais, o efeito de interferentes, ocasionado pela oxidação ou a redução de outras espécies presentes no meio, é minimizado[14].

Os biossensores podem ser classificados conforme a natureza do transdutor físico: potenciométrico, amperométrico, calorimétrico, piezelétrico ou óptico. Um biossensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e mais preciso do que um biossensor potenciométrico, pois não há a necessidade de esperar que o equilíbrio termodinâmico seja atingido. Além disto, a sua resposta é linear em função da concentração do analito.

Como desvantagem deste tipo de biossensor está o fato da sua resposta ser governada somente pelo potencial redox do composto eletroativo presente, ou seja, a corrente medida pode incluir a contribuição de muitas espécies além daquela de interesse, levando a uma baixa seletividade [24]. Em um biossensor amperométrico a enzima imobilizada na superfície do eletrodo catalisa a reação dos substratos, sendo possível o monitoramento da corrente elétrica; porém, a corrente obtida é afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo.

BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Na construção de biossensores amperométricos para fenóis, as enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas e apesar de possuírem diferentes mecanismos de atuação, elas têm sido esquematizadas por meio de uma seqüência de reações similares, conforme Figura 3.

Para se conseguir um biossensor viável, com boa sensibilidade e estabilidade operacional, a enzima deve estar apropriadamente ligada ao transdutor facilitando a transferência de elétrons. Portanto, a imobilização da enzima sobre o transdutor é uma das etapas cruciais na preparação de um biossensor.

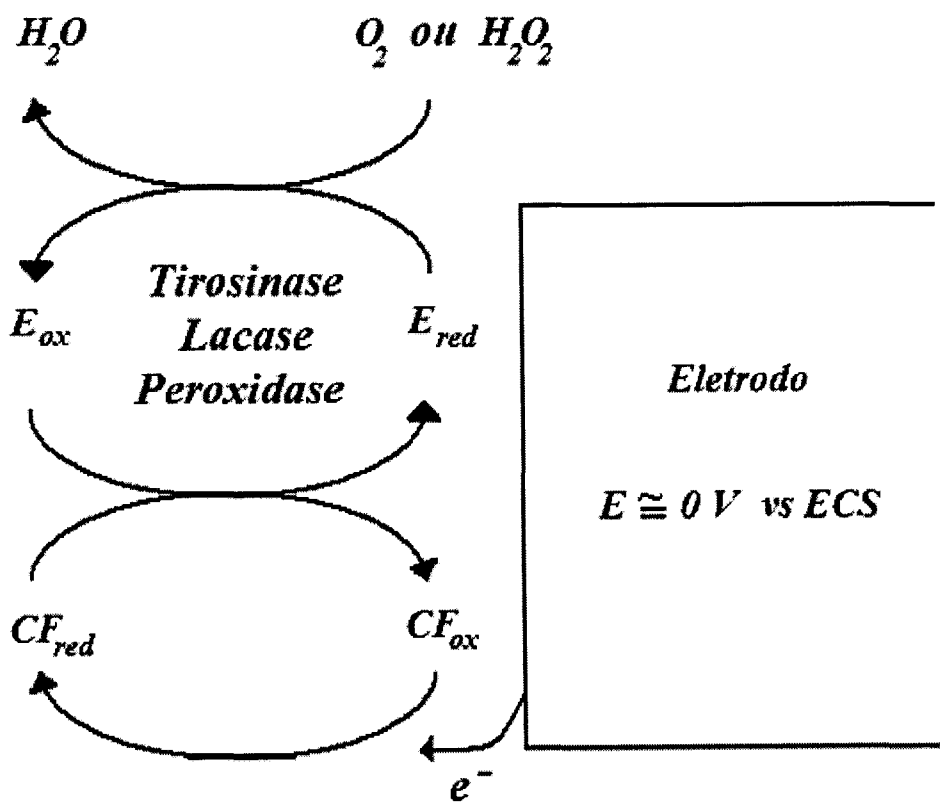

Figura 3. Mecanismo das reações nos eletrodos enzimáticos para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente, das enzimas, CF = composto fenólico [25].

Os processos de imobilização de enzimas em diferentes tipos de matrizes se desenvolveram muito nos últimos trinta anos. Uma das razões para a grande expansão da tecnologia da imobilização está ligada ao material de suporte, que pode agir sobre a

estabilidade e eficiência da enzima imobilizada. No caso dos biossensores, a escolha de um método de imobilização depende do tipo de transdutor, natureza do analito e condições de operação do biossensor [26].

Os biossensores tendo polímeros condutores como matrizes enzimáticas são bastante atrativos, pois muitas enzimas podem ser incorporadas ao polímero durante a sua deposição eletroquímica sobre um eletrodo apropriado[27]. Além disso, eles podem ser usados como materiais eletroativos em biossensores eletroquímicos devido a uma flexibilidade em suas estruturas químicas e características redox [9].

Dentre os polímeros usados como matrizes de enzimas, o polipirrol (PPI) é um dos mais aplicados pela sua boa estabilidade ambiental[9], versatilidade de aplicações e disponibilidade de uma ampla variedade de espécies moleculares (redox) que se ligam covalentemente ao pirrol [28]. A vantagem do PPI em relação a outros polímeros, como o politiofeno e a polianilina, está na variedade de uso de solventes, inclusive água (em meio neutro), que podem ser usados em sua síntese, pela possibilidade de incorporação de vários tipos de contra-íons, afetando diretamente as suas propriedades como adesão, condutividade, morfologia, resistência mecânica e reatividade química [25, 29].

A Figura 4 ilustra estruturas de alguns dos polímeros condutores onde n representa um número de unidades monoméricas que se repetem para formar a cadeia principal do polímero[30].

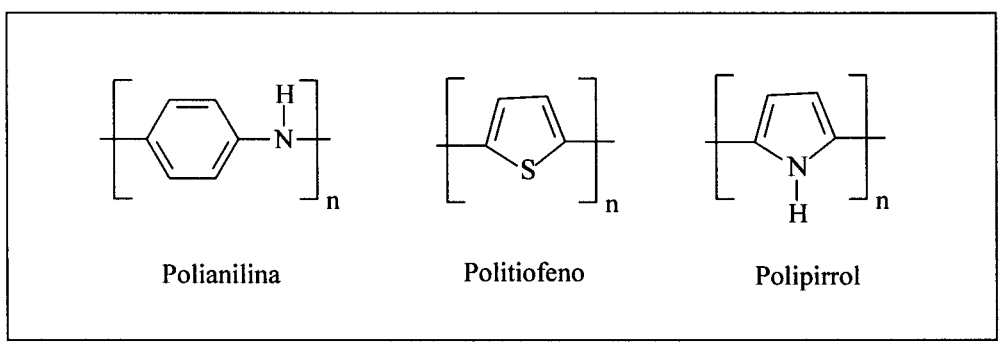

Figura 4. Estrutura das unidades monoméricas dos polímeros orgânicos condutores mais estudados.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

A boa processabilidade, flexibilidade estrutural e relativamente baixo custo são algumas das vantagens encontradas e que conferem a aplicabilidade dos polímeros [27].

Os polímeros condutores podem ser sintetizados química ou eletroquimicamente. A síntese química é a mais empregada quando se visa uma aplicação tecnológica de um material em uma maior quantidade. Já a síntese eletroquímica oferece um material na forma de um filme sem contaminantes, como catalisadores ou agentes oxidantes, tendo um maior controle dos parâmetros de síntese.

Neste trabalho, foi utilizado o PPI como matriz de imobilização da polifenol oxidase (PFO). O PPI foi primeiramente sintetizado em 1968[31], mas o interesse na sua caracterização e aplicação surgiu depois dos trabalhos de Diaz *et al* [32, 33]. Em 1979, Diaz *et al* [32] relataram a eletropolimerização do pirrol sobre um substrato de Pt em meio não-aquoso. A forma condutora do PPI só foi mesmo conhecida após este trabalho e, desde então, a polimerização eletroquímica foi estendida a outros compostos aromáticos como a anilina, tiofenos, furano e outros. O procedimento eletroquímico de síntese é, sem dúvida, um dos mais empregados na obtenção de filmes de PPI com alta condutividade elétrica, e as generalidades da eletrossíntese do PPI são similares às dos demais polímeros condutores. A ciclagem de potencial do PPI e de seus derivados entre os estados isolante e condutor pode ser repetida sem que haja perda da eletroatividade do material.

1.3 OBJETIVOS

Neste trabalho, avaliamos o processo de imobilização da polifenol oxidase (PFO) em filmes de polipirrol (PPI) sintetizados eletroquimicamente e utilizando o glutaraldeído (GA) para a formação de ligação covalente cruzada. Foram construídos biossensores amperométricos a base de extrato bruto de abacate (*Persea americana*) como fonte

enzimática. Para estes estudos, foram variados os parâmetros concentração de enzima, temperatura, pH e potencial visando otimizar a detecção de compostos fenólicos, tais como catecol, hidroquinona, pirogalol e atrazina.

CAPÍTULO 2

Neste capítulo, apresentamos os materiais e métodos utilizados no preparo do filme e na imobilização da enzima nos filmes de polipirrol, discriminando os equipamentos.

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Compostos

Perclorato de lítio ($LiClO_4$) foi utilizado como eletrólito de suporte. Pirrol foi destilado sob pressão reduzida e armazenado ao abrigo de luz e do calor a uma temperatura de 22 °C. Glutaraldeído foi utilizado a 25% v/v em água purificada pelo sistema de destilação Milli-Q da Milli-Pore. Os compostos fenólicos utilizados foram catecol M_w = 110,11g/mol (Aldrich), atrazina M_w= 215,68g/mol (Aldrich), pirogalol M_w = 126,11g/mol (Aldrich) e hidroquinona M_w =110,11g/mol (Aldrich).

2.1.2 Enzima

Utilizamos o extrato bruto de abacate como fonte da PFO gentilmente cedido pelo Professor Dr. Orlando Fatibello Filho da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). Os procedimentos para a obtenção de extrato bruto de vegetais e legumes são descritos na literatura [23,34]. A PFO como extrato bruto de abacate (*Persea americana*) foi obtida de acordo com o procedimento descrito por Lupetti *et al* [16], que sugere um método simples e rápido. Neste método, 25g de polpa de abacate foi homogeneizada com 100 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 2,5 g de agente protetor Polyclar Super R, em um liqüidificador durante três minutos. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 15000 rpm

durante 30 min a 4° C[16]. Este procedimento foi utilizado por vários autores para a obtenção de outras fontes de enzimas [35-37].

2.1.3 Eletrossíntese dos filmes de polipirrol e medidas eletroquímicas

A síntese eletroquímica dos filmes de polipirrol (PPI) foi realizada pela técnica de voltametria cíclica em meio de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,1 mol L^{-1} de pirrol em meio aquoso até se atingir dez ciclos voltamétricos completos em uma varredura de potenciais a 50 mV s^{-1} de -0,2 a 0,2 V *vs* ECS. Para analisar a eficiência de resposta dos filmes, foram obtidas as respostas voltamétricas dos filmes de PPI/PFO sem e com glutaraldeído (GA) até cinco ciclos de varredura completos a 50 mV s^{-1} de 0,0 a 0,9 V *vs* ECS.

A Figura 5 ilustra a célula de vidro de compartimento único com capacidade de 10 mL utilizada para a realização dos experimentos eletroquímicos. Foram utilizados três tipos de eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência, calomelano saturado, ECS, e um contra-eletrodo, uma placa de Pt.

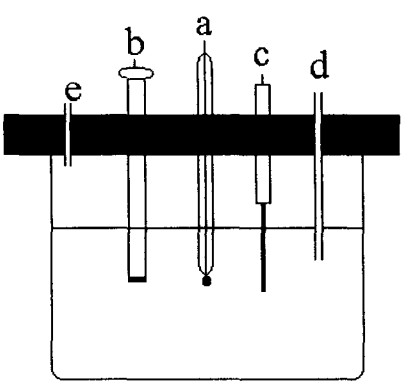

Figura 5. Ilustração de uma célula eletroquímica mostrando os eletrodos de trabalho (a), de referência (b), calomelano (c) além da entrada (d) e saída (e) de N_2.

Nas medidas eletrogravimétricas, a síntese do filme de PPI foram realizadas em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e em solução aquosa de $LiClO_4$ de 0,02 mol L^{-1}. Um fio de Pt foi usado como eletrodo auxiliar e todos os potenciais foram medidos com relação ao eletrodo

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

de calomelano saturado, ECS. As variações de corrente e de freqüência foram medidas simultaneamente às medidas de varredura de potenciais.

O eletrodo de trabalho utilizado era um disco de Au com 0,283 cm^2 de área geométrica. Os eletrodos de trabalho e o contra-eletrodo foram polidos com soluções de alumina em suspensão de 1,0 μm, 0,3 μm e 0,05 μm.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cinética Enzimática

O conhecimento da cinética enzimática é importante para o entendimento do comportamento e das propriedades da enzima, bem como do seu mecanismo de ação. Em 1913, foi desenvolvida uma teoria geral das ações enzimática e cinética por Michaelis-Menten[38] e estendida mais tarde, em 1925, por Briggs e Haldane [39].

2.2.2 Equação de Michaelis-Menten

A teoria de Michaelis-Menten considera que uma enzima (*E*) se combina com um substrato (*S*), para formar um complexo intermediário enzima-substrato (*ES*), e depois se quebra para formar o produto (*P*) e regenerar a enzima. Para uma reação enzimática, envolvendo apenas um substrato, tem-se a seguinte expressão geral.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E \qquad (1)$$

onde K_1, K_{-1} e K_2 são as constantes de velocidades das reações iniciadas.

A equação de Michaelis-Menten expressa a relação entre a velocidade inicial de uma reação, catalisada por enzimas e a concentração de substrato [10]. Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática pode ser expressa como:

$$V_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad (2)$$

onde $V_{máx}$ é a velocidade máxima, quando toda enzima está presente como ES e logo é igual a $K_2[E]$, [S] é a concentração do substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \qquad (3)$$

Os valores de K_m e de $V_{máx}$ podem ser obtidos pelo gráfico da velocidade em função da concentração do substrato, como mostra a Figura 6.

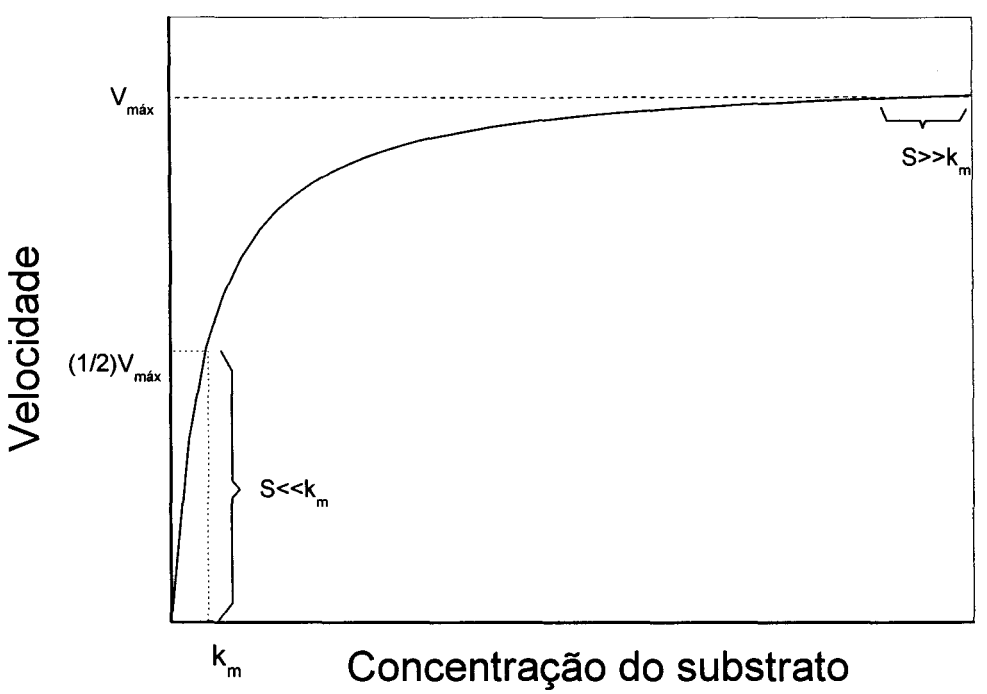

Figura 6. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática [10].

Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da concentração de substrato até atingir um valor limite, a partir do qual a adição de mais substrato não afeta mais a velocidade. Quando a velocidade de reação atinge a metade da velocidade máxima, $V = V_{máx}/2$, o coeficiente de Michaelis-Menten (K_m) é igual à concentração de substrato, isto é, $K_m = S$. O termo K_m indica o grau de afinidade da enzima pelo substrato; quanto menor o K_m, maior será afinidade da enzima pelo substrato. No caso de biossensores, K_m é um parâmetro quantitativo importante não dependendo da concentração de enzima.

2.2.3 Equação de Lineweaver-Burk

A equação de Michaelis-Menten pode ser reescrita de uma forma mais apropriada para que os valores de K_m e $V_{máx}$ sejam obtidos. Pela sua linearização, temos que:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{máx}} \qquad (4)$$

onde V_o é a velocidade inicial de reação e esta equação é chamada de Lineweaver-Burk.

Ao ser traçado um gráfico de $1/V_0$ em função de 1/[S], obtém-se uma reta com coeficiente angular de $K_m/V_{máx}$, com intersecção de $1/V_{máx}$ no eixo de $1/V_0$ e de $-1/K_m$ no eixo de 1/[S], como mostra a Figura 7.

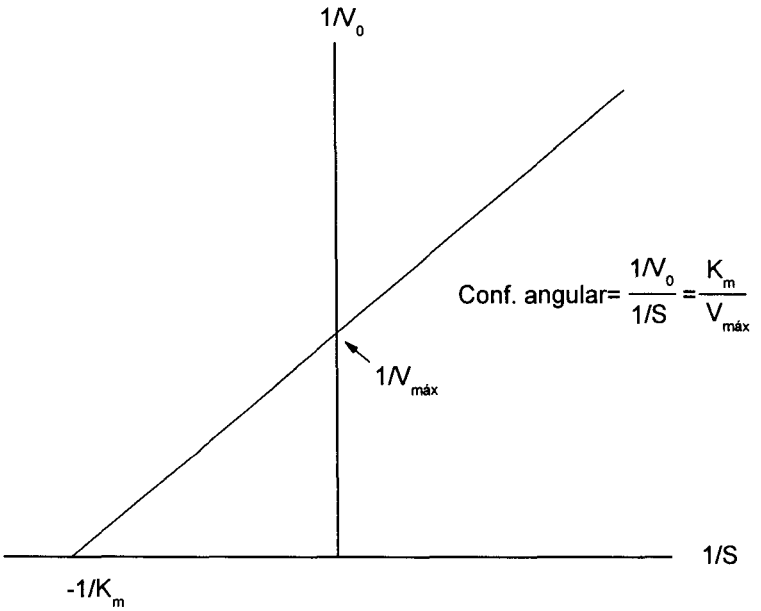

Figura 7. Gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk.

2.2.4 Glutaraldeído

O glutaraldeído (GA) (Figura 8) é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos com grupos amina e com menor intensidade com o grupo tiol. Inicialmente, ele foi muito utilizado como fixador em histoquímica e na microscopia eletrônica, depois, como reagente bifuncional no estudo estrutural de proteínas simples e macromoléculas agregantes [40]. O GA normalmente age como um agente formador de ligações cruzadas ("*crosslinking*") pela interação entre os grupos aldeídos do GA e os grupos amina livres dos compostos [40].

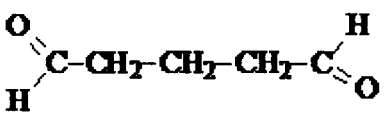

Figura 8. Molécula de glutaraldeído (GA).

A interação do GA com o grupo amina livre tem sido muito explorada em diversas circunstâncias, dentre elas se destaca a imobilização de enzimas. A efetividade da imobilização com GA depende diretamente das condições experimentais pela multiplicidade das estruturas químicas possíveis.

2.2.5 Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase

Como muitas enzimas não são encontradas puras, não é possível quantificá-las, assim, elas são expressas em termos de unidade de atividade (UA), definida arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,001 unidades da absorbância por minuto. Para o seu cálculo, geralmente é utilizada uma equação que relaciona a variação da absorbância (Δabs) com a variação do tempo (Δt) passo (b) e um determinado volume de amostra (v) [41]:

$$A = \frac{\Delta Abs \times 30 \times 1000}{\Delta t \times b \times v} \qquad (5)$$

Aqui determinamos a atividade enzimática da PFO em temperatura ambiente pela adição de 2,8 mL de solução de catecol (substrato) preparado em uma solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}em pH de 6,5 e 0,2 mL do extrato bruto de abacate (PFO). A variação da banda de absorção de 402 nm, típico de estruturas quinona foi acompanhada com o tempo durante 30 segundos em um intervalo de 5 segundos, em um espectrofotômetro UV-VIS Hitachi, modelo U-2001.

2.2.6 Imobilização da polifenol oxidase

Uma das razões para a expansão da tecnologia da imobilização de enzimas está ligada ao material de suporte, que pode agir sobre a estabilidade e o efeito da enzima imobilizada.

Muitas vezes as enzimas em soluções aquosas perdem muito rapidamente as suas atividades catalíticas e não podem ser recuperadas de tais soluções e nem ter as suas atividades regeneradas. Estas dificuldades podem ser diminuídas pelo desenvolvimento das técnicas de imobilização de enzimas.

A enzima livre pode ser imobilizada ou insolubilizada junto a uma matriz inerte de tal forma a conservar as suas propriedades catalíticas por um tempo mais longo do que na forma livre, podendo ser utilizada continuamente em um maior número de análises. A imobilização de enzimas é considerada um procedimento para aumentar a estabilidade, implicando em um decréscimo na constante de velocidade de inativação ou aumento no tempo de inativação sob condições de desnaturação[42]. Dentre os métodos de imobilização mais empregados na construção de biossensores destacam-se: adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada e microencapsulação [43]. Aqui, utilizamos o método de imobilização química com gluteraldeído, GA (por ligação covalente cruzada).

O método de ligação covalente cruzada emprega o uso de reagentes bifuncionais na imobilização do material biológico. Ele se baseia na formação de estruturas com massa molecular elevada em decorrência da formação de ligação covalente cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas de suporte inerte com reagentes bifuncionais. Alguns destes reagentes incluem: glutaraldeído (GA) (pentanodiol), ácido bisdiazobenzidina 2-2'-dissulfonico,4-4'-difluor, etc. Neste caso, o GA tem sido o mais usado pela sua baixa toxicidade e menor custo quando comparado aos demais. Além disto, as ligações entre a enzima e o GA são irreversíveis, conferindo uma boa estabilidade frente às variações de pH, força iônica, solvente e temperatura [44].

...VIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

2.2.7 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma das técnicas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas em eletrodos, fornecendo informações tanto quantitativas como qualitativas sobre os sistemas redox [45]. Ela se baseia na aplicação de um potencial elétrico variável com o tempo ao eletrodo de trabalho a partir de um valor inicial (E_i). Este potencial cresce linearmente como ilustra a Figura 9 até atingir um valor máximo, chamado potencial de inversão (E_{inv}) e, em seguida, decresce até alcançar um valor final (E_{fn}).

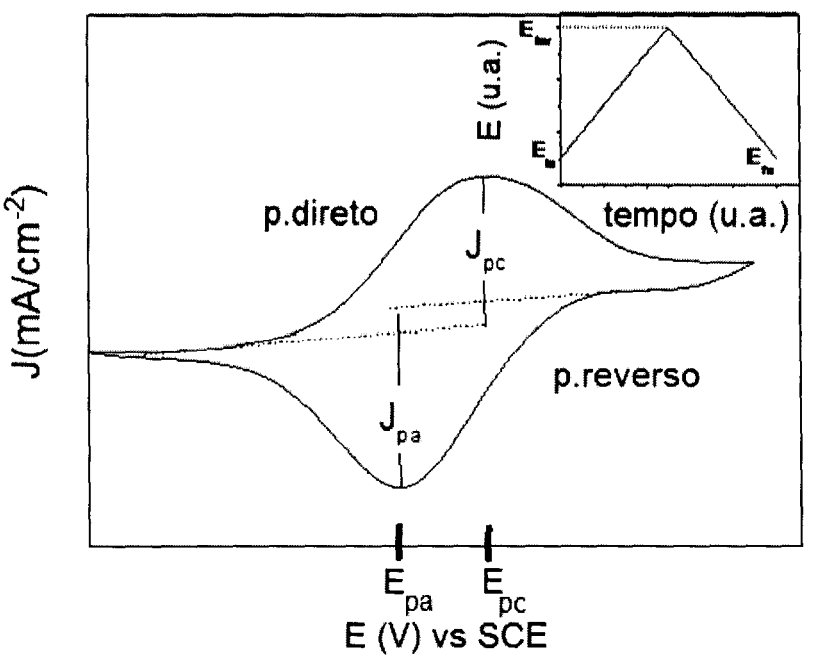

Figura 9. Voltamograma cíclico mostrado a curva de resposta corrente–voltagem sendo J_{pa} e J_{pc} as densidades de corrente de pico anódica e catódica, respectivamente. No detalhe, a forma do potencial elétrico aplicado é mostrando com o potencial inicial (E_{in}), o potencial de inversão (E_{inv}) e o potencial final (E_{fn}).

Este ciclo pode ser repetido n vezes e a dependência da densidade de corrente elétrica no eletrodo de trabalho, $J(A/cm^{-2})$, em função do potencial elétrico aplicado denomina-se voltamograma cíclico [45]. Para o potencial crescente ou direto, obtém-se a curva superior, para o potencial decrescente ou reverso, a curva inferior do voltamograma.

Uma curva típica da densidade de corrente J(A/cm^{-2}), ou voltamograma, é ilustrado na Figura 9, que mostra os picos de densidade de corrente catódica, J_{pc} e anódica, J_{pa}.

Aqui as medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato-galvanostato EG&PAR 283 acoplado a um microcomputador com uma placa de aquisição GPIB (*National Instruments Corporation*) e um programa de aquisição de dados M270.

2.2.8 Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma das técnicas eletroquímicas tradicionais e consiste no registro da corrente i gerada (pela oxidação ou redução de espécies) devido a um potencial externo aplicado (E_0, de oxidação ou E_R, de redução) em função do tempo t. A carga Q envolvida no processo pode ser calculada através da área sob a curva. Conhecida a função $i = i(t)$, se obtém a área pela integral conforme a seguir:

$$Q = \int i(t)dt \qquad (6)$$

2.2.9 Microbalança de Cristal de Quartzo

Uma técnica analítica muito poderosa para a investigação dos processos redox em filmes poliméricos é a eletrogravimetria, quando se utiliza uma microbalança de cristal de quartzo (MCQ). A MCQ compreende basicamente um disco de cristal de quartzo piezoelétrico de corte AT a 5 MHz, cujo o valor de C é de 56,6 Hz μg^{-1} cm^{-2} parcialmente recoberto em ambas as faces com um filme metálico fino. As faces deste cristal são conectadas a um circuito elétrico, onde se aplica um sinal de corrente alternada e que gera um campo elétrico causando a vibração do cristal em uma determinada freqüência de ressonância, F [46]. Quando uma das faces do cristal é colocada em contato com uma solução eletrolítica, ela passa a ter a função de eletrodo de trabalho, como em uma cela eletroquímica convencional.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

A MQC permite com que seja possível investigar pequenas variações de massa que ocorrem no eletrodo de trabalho durante processos eletroquímicos de redução e oxidação (*in situ*). No caso dos polímeros condutores, podem ser estudados os fenômenos de transporte de íons tanto durante a sua síntese eletroquímica quanto o processo de dopagem/desdopagem do filme já depositado sobre o cristal. Esta associação da MCQ com Eletroquímica é geralmente denomimada MCQE (microbalança de cristal de quartzo eletroquímica).

Como as medidas obtidas pela MCQE se referem às variações de freqüência e não de massa, utiliza-se a equação de Sauerbrey [47] para se obter uma relação massa/freqüência:

$$\Delta F = \frac{-2\Delta m F^2}{A(\mu\rho)^{1/2}} \qquad (7)$$

onde ΔF é a variação da freqüência de ressonância, F, a freqüência de ressonância fundamental do cristal, Δm, a variação de massa na superfície do eletrodo, μ, o módulo de cisalhamento do cristal, ρ, a densidade do cristal e A, a área geométrica do eletrodo.

A MCQ foi muito utilizada para se medir variações de massa no ar ou sob vácuo e a sua utilização em líquidos é mais recente. Os experimentos com a MCQE permitem se obter simultaneamente parâmetros eletroquímicos, tais como corrente, potencial, cargas e variações da freqüência de ressonância do cristal, que podem ser associadas diretamente às mudanças em massa no cristal.

CAPÍTULO 3

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes à preparação e caracterização dos filmes de polipirrol (PPI) e da imobilização da enzima, polifenol oxidase (PFO), na matriz polimérica para aplicação em biossensores. Mostraremos como algumas variáveis, tais como temperatura, pH e potencial, influenciam no comportamento eletroquímico dos filmes poliméricos. Ressaltaremos o comportamento dos biossensores quando em presença de alguns compostos fenólicos e as suas respectivas curvas analíticas.

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1 Otimização de parâmetros para o biossensor

Quando um biossensor com uma enzima imobilizada é construído, busca-se manter a atividade enzimática. No processo de imobilização de enzimas, este fator é de grande importância, pois durante a imobilização das enzimas, podem acontecer mudanças no comportamento cinético.

Alguns fatores físicos e químicos podem afetar diretamente uma reação enzimática. Como as enzimas possuem estruturas espaciais bem definidas, as variações de pH ou de temperatura do meio podem alterar os sítios ativos enzimáticos, fazendo com que a enzima perca a sua atividade catalítica (desnaturação)[22,48]. Assim, é necessário otimizar as condições operacionais do biossensor enzimático, ou seja, estabelecer os parâmetros necessários para que ele responda com eficiência com o uso de técnicas usuais de caracterização.

3.1.1.1 Efeito do pH

A densidade de corrente anódica máxima J (μ A cm^{-2}) foi medida no valor de potencial operacional de 50 mv durante medidas voltamétricas em função do pH para valores no intervalo de 4,5 a 8,5 (Figura 10). A escolha desta faixa de operação foi feita após se considerar que muitas enzimas, devido a problemas relacionados com a desnaturação, atuam em ambientes restritos de pH e temperatura[48]. No caso da polifenol oxidase, o pH adequado deve ficar entre 5 e 8[48, 49].

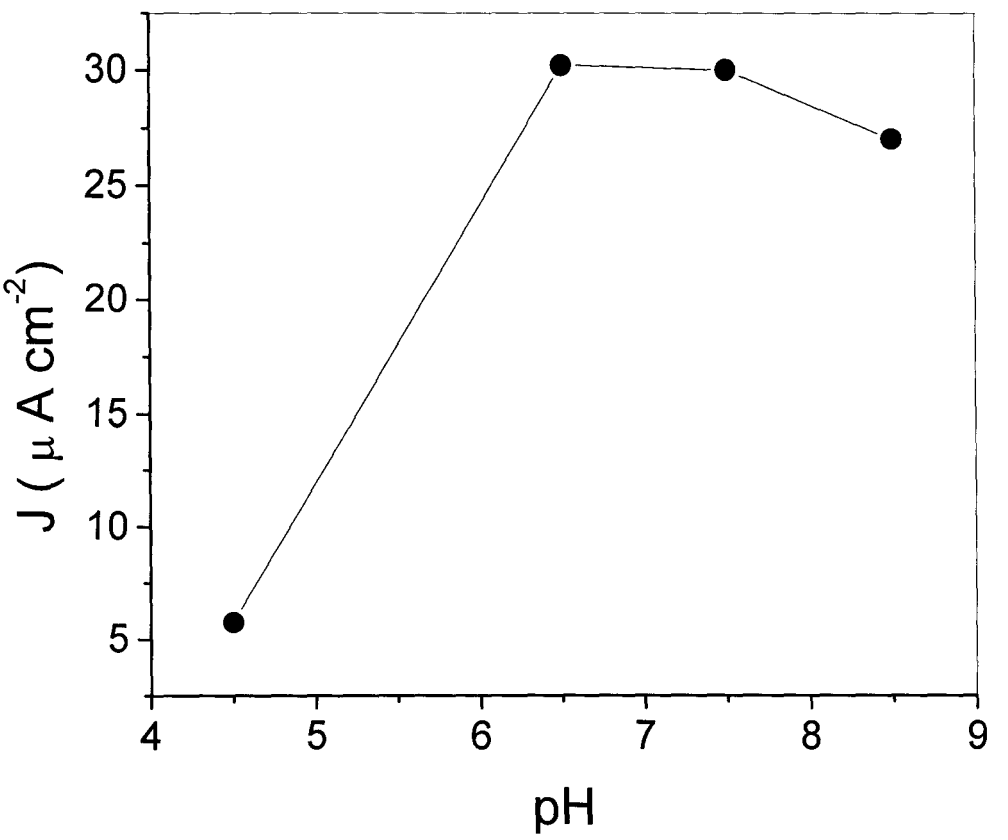

Figura 10. Estudo do efeito do pH de 4,5 a 8,0 para filmes sintetizados em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$, 0,02 mol L^{-1} de glutaraldeído (25%), 600μ mol L^{-1} de catecol, v= 50 mV s^{-1}.

Inicialmente, observa-se que, para um pH de 4,5 o biossensor apresenta uma resposta amperométrica relativamente baixa quando é alterado para 6,5, a resposta do biossensor aumenta cerca de seis vezes. Para valores de pH acima de 7,5, há uma tendência à diminuição da resposta, provavelmente pela desnaturação da enzima, com a alteração das suas estruturas

terciárias e quaternárias. Portanto, as melhores respostas foram obtidas para valores de pH entre 6,5 e 7,5, já que a densidade de corrente, neste intervalo de pHs, não variou muito. A partir destes resultados, optamos por trabalhar com uma solução com pH 6,5, quando parece não haver alteração da atividade enzimática e não estar no limiar do decréscimo da resposta amperométrica do biossensor, garantindo assim uma faixa de trabalho de maior segurança em relação ao pH. Este resultado está em concordância com a literatura[50] até mesmo para diferentes sistemas quando as condições experimentais do ambiente de trabalho são investigadas para diferentes pH da solução tampão.

3.1.1.2 Efeito da temperatura

A Figura 11 mostra a dependência da densidade de corrente anódica J ($\mu A\ cm^{-2}$) máxima com a temperatura medida no valor do potencial de 50 mV durante as medidas voltamétricas. Os Maiores valores de corrente são os observados para temperaturas entre 25 e 30 °C, indicando um ponto de máxima resposta em torno de 27 °C, que seria a temperatura mais adequada de atividade máxima da enzima. Para valores superiores e inferiores a 27 °C, a resposta do biossensor decai, provavelmente pela desnaturação da enzima.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

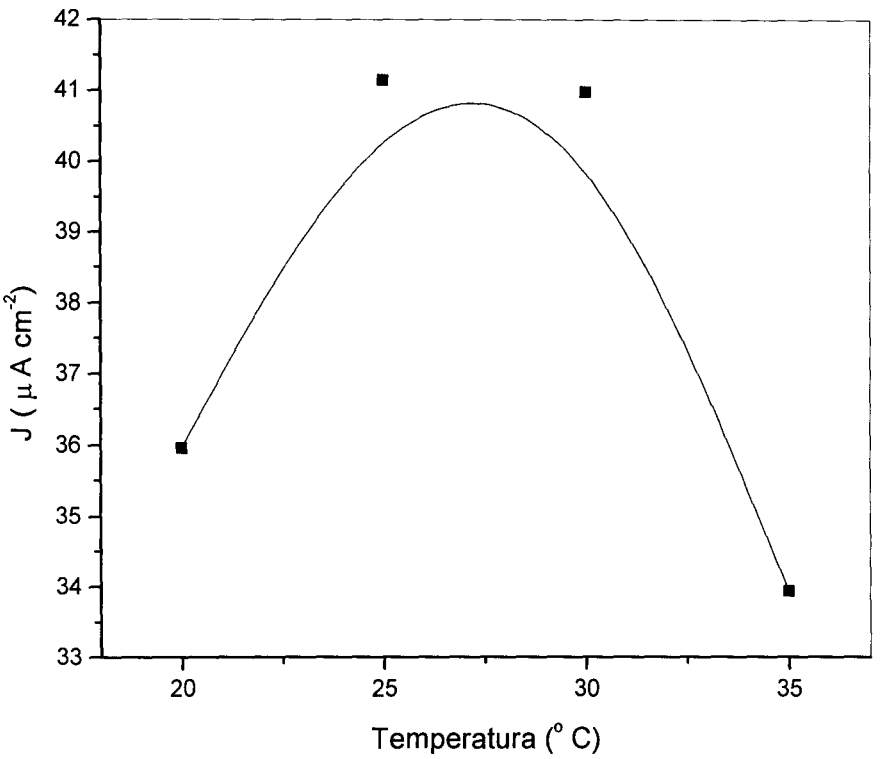

Figura 11. Influência da temperatura na resposta do biossensor. Condições: tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}) em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,02 mol L^{-1} de glutaraldeído (25%), v=50 mV s^{-1}.

3.1.1.3 Efeito da variação da concentração da polifenol oxidase (PFO)

A variação da densidade de corrente anódica máxima com a concentração de PFO, comumente chamada de curva de sensibilidade, é mostrada na Figura 12, sendo obtida para biossensores construídos a partir de diferentes concentrações da enzima na forma de extrato bruto (15-40 U mL^{-1}). Observa-se que houve um aumento da resposta de corrente com o aumento da concentração de enzima e uma saturação para concentrações acima de 35 U mL^{-1}. Assim, optou-se pelo uso de uma concentração de 33 U mL^{-1} para a construção dos biossensores PPI/PFO.

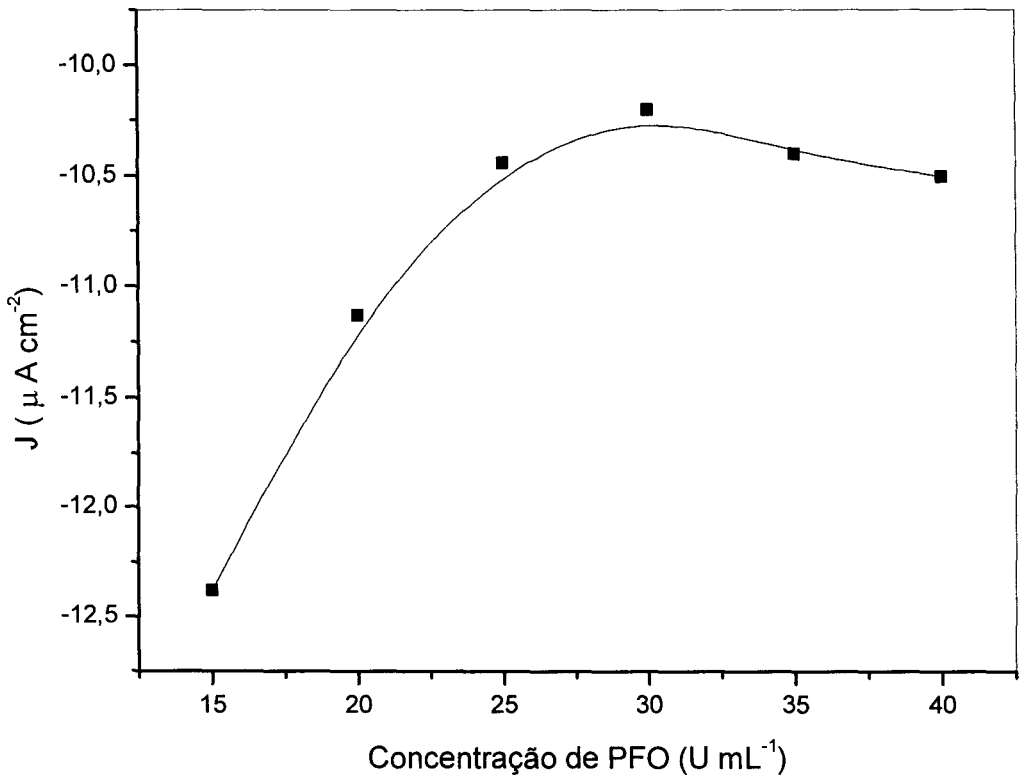

Figura 12.Efeito da quantidade de enzima (PFO) na resposta do biossensor em solução tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}) em solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol.

A Figura 13 mostra o espectro de absorbância na região do UV-VIS para uma solução de catecol como substrato e PFO. Neste espectro, observa-se uma banda de absorção mais intensa com valor máximo em 402 nm e que é típica de estruturas do tipo quinonas. A PFO em solução catalisa a oxidação do catecol em quinonas, produzindo uma solução amarelada. Nos vegetais e frutas (como o abacate, aqui usado na forma de extrato bruto), a presença da PFO é que a responsável pela coloração escura característica.

Uma das formas mais usuais de se acompanhar a cinética enzimática é pelo monitoramento da variação da absorbância em função do tempo, como mostra a Figura 14. A partir deste gráfico, é possível calcular a razão da diminuição de absorbância por minuto (velocidade da reação enzimática), aplicar o modelo de Michaelis-Menten (K_m) e determinar os parâmetros cinéticos. O parâmetro K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato (no

nosso caso, catecol), quanto menor o seu valor, maior a afinidade, o que reflete na sensibilidade.

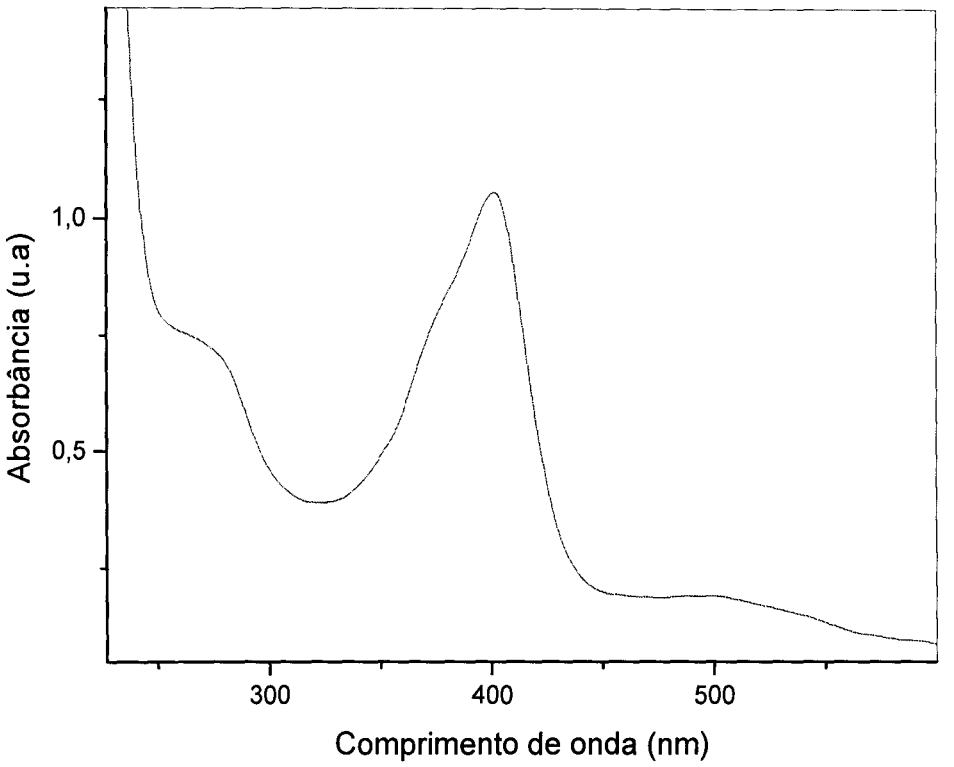

Figura 13. Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,1 mol L^{-1}) em tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}).

O método Lineweaver-Burk foi utilizado para encontrar os valores dos parâmetros cinéticos da PFO como enzima livre usando o catecol como substrato. Foram encontrados os valores de K_m= 3,8 mmol L^{-1} e $V_{máx}$= 0,91 μmol/min^{-1} para enzima livre. Portanto, o valor de K_m é semelhante ao encontrado na literatura[51] em relação à imobilização da tirosinase em sistemas de matriz de copolímeros PPI/PDMS (polidimetilsiloxano), K_m = 4 mmol L^{-1} e V_{max}=11,2 μmol/ min^{-1}. Para a enzima livre, os valores encontrados na literatura são 5,16, 4,0, e 0,14 mmol L^{-1} [52, 53].

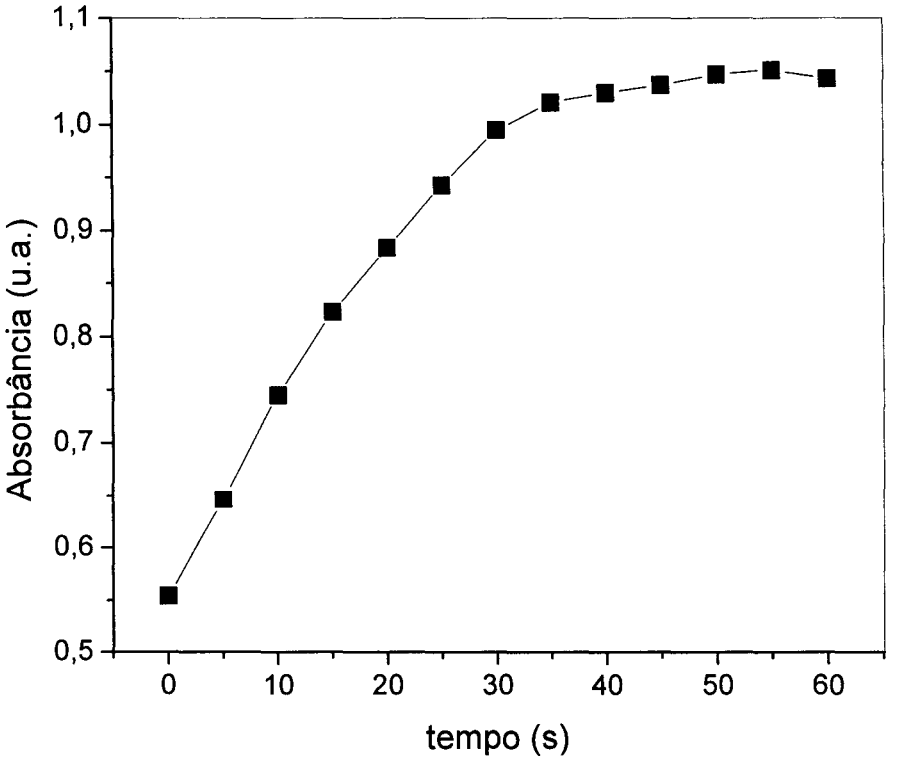

Figura 14. Máximo da absorbância a um comprimento de onda fixo (λ = 402nm) em função do tempo para uma solução contendo 0,2 mL de extrato bruto (PFO) e 0,1 mol L^{-1} de catecol.

3.1.1.4 Efeito do potencial operacional aplicado na resposta do biossensor

O potencial operacional também tem uma influência significativa na resposta do biossensor, pois ele pode contribuir para um aumento da sua sensibilidade e seletividade do biossensor [54]. A variação da densidade de corrente com o potencial operacional foi verificada para se encontrar uma condição ótima na determinação do catecol, sendo obtida em uma faixa de potencial diferentes de -400 a 400 mV para uma solução contendo 600 μmol L^{-1} de catecol em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5).

A Figura 15 mostra a influência do potencial operacional sobre a resposta do biossensor PPI/PFO-GA, onde se nota um valor máximo da densidade de corrente no potencial em torno de 50 mV para, em seguida, haver uma diminuição na resposta. Assim,

este valor de potencial foi o escolhido em estudos subseqüentes para alcançar uma maior sensibilidade do biossensor e minimizar possíveis interferências na sua caracterização. Este valor está de acordo ao encontrado na literatura[55]. Neste trabalho o autor usa um alcance de potencial de -250 a 300 mV para um sistema de p- tolueno sulfonato-PPI/PFO e obtiveram um potencial operacional também de 50 mV.

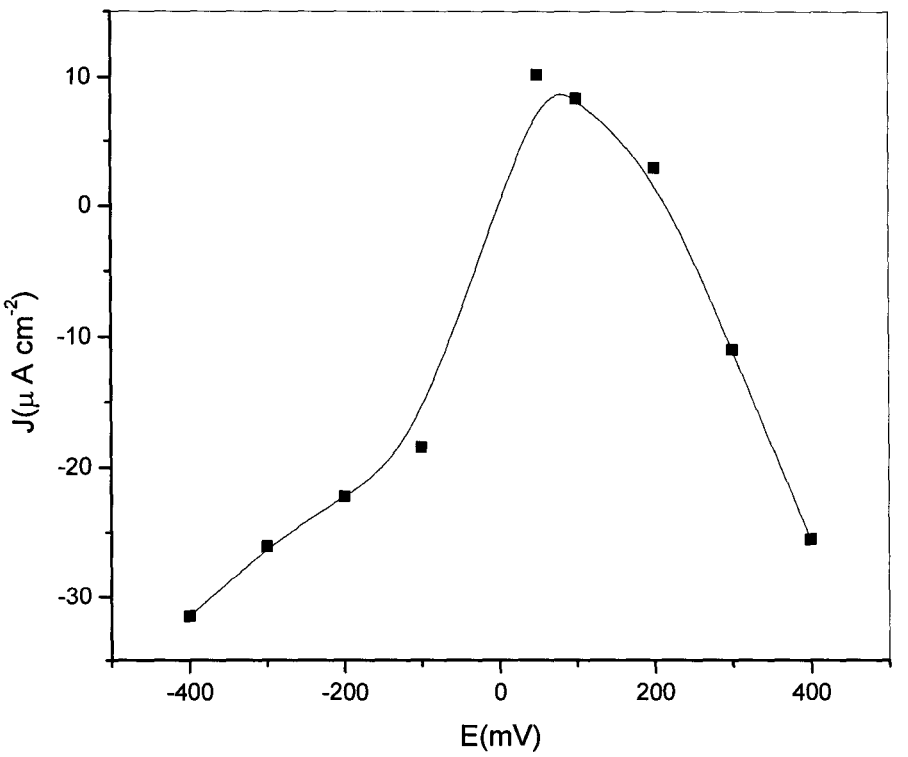

Figura 15. Efeito do potencial operacional sobre a resposta do biossensor na determinação do catecol em uma solução contendo 600 μmol L^{-1} de catecol e 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5).

3.1.1.5 Estabilidade de estocagem

O estudo sobre a estabilidade dos biossensores é de grande importância, a sendo necessário verificar como eles atuam após a estocagem. A estabilidade de estocagem do biossensor é reconhecida como um parâmetro diretamente relacionado à manutenção da atividade enzimática sob condições especifica.

Nas condições otimizadas, o biossensor PPI/PFO-GA foi monitorado durante 40 dias. A resposta do filme é mostrada na Figura 16. Observa-se que o biossensor perdeu em torno de 34% de sua atividade até o 8° dia. Desde então, não se observou perda de atividade dentro dos 35 dias seguintes, mantendo-se praticamente estável com pequenas flutuações durante os vinte e sete dias restantes, o que lhe confere boa estabilidade neste período comparável aos resultados encontrado na literatura que houve perda de 45% de atividade nos primeiros 5 dias para o sistema PPI/PFO[52].

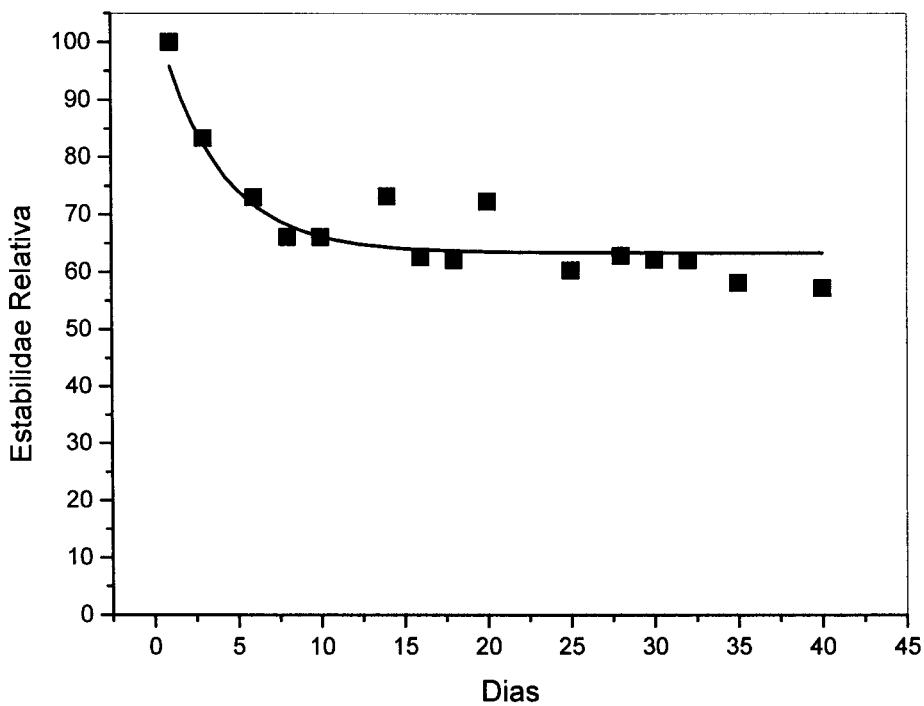

Figura 16. Estabilidade do biossensor PPI/PFO-GA obtida em 600 μmol L^{-1} de catecol e 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5).

3.1.2 Eletrossíntese do polipirrol

Otimizados os parâmetros de resposta, a etapa seguinte foi a caracterização eletroquímica dos biossensores obtidos a partir do uso da polifenol oxidase (PFO), como extrato bruto de abacate, imobilizada na matriz de filmes dos filmes de PPI. Foram

investigadas a eletroatividade dos filmes de PPI e a reversibilidade eletroquímica dos seus processos redox. A Figura 17 mostra os voltamogramas cíclicos de um eletrodo de Au durante o processo de formação de um filme de PPI.

Durante a polimerização do pirrol, houve um aumento da densidade de corrente com os sucessivos ciclos pelo espessamento do filme de PPI. Além disto, nota-se no voltamograma uma resposta de corrente na região de +200 mV e +400 mV *vs* ECS, que aumenta de intensidade com as varreduras sucessivas, caracterizando a resposta de um filme eletroativo depositado na superfície do eletrodo. Durante a eletropolimerização do pirrol em solução aquosa, os contra-ânions do eletrólito suporte são incorporados ao filme; assim, as cadeias do PPI, carregadas positivamente, são neutralizadas pelos ânions dopantes[56].

A espessura dos filmes de PPI pode ser estimada pelos valores de carga elétrica total obtida durante a polimerização eletroquímica do pirrol[57]. A carga total depositada sobre a superfície do Au foi de 24,14 mC cm^{-2} após 10 ciclos, o que corresponde uma espessura para o filme de PPI de 0,04 μm, conforme calculado em equação proposta na literatura[58].

A partir da Figura 17 determinamos a dependência da corrente catódica máxima no potencial de 400 mV com o número de ciclos como mostra na Figura 18. Deste resultado, pode-se inferir que nesta faixa de trabalho houve um crescimento linear do filme.

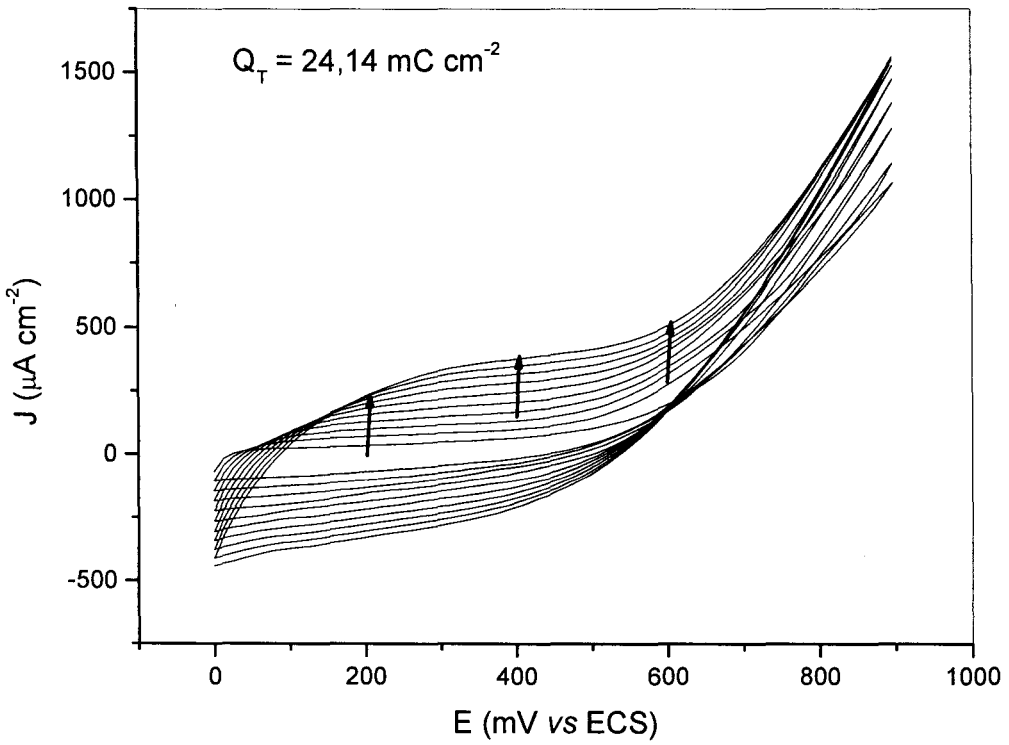

Figura 17. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ a v = 50 mV s^{-1}.

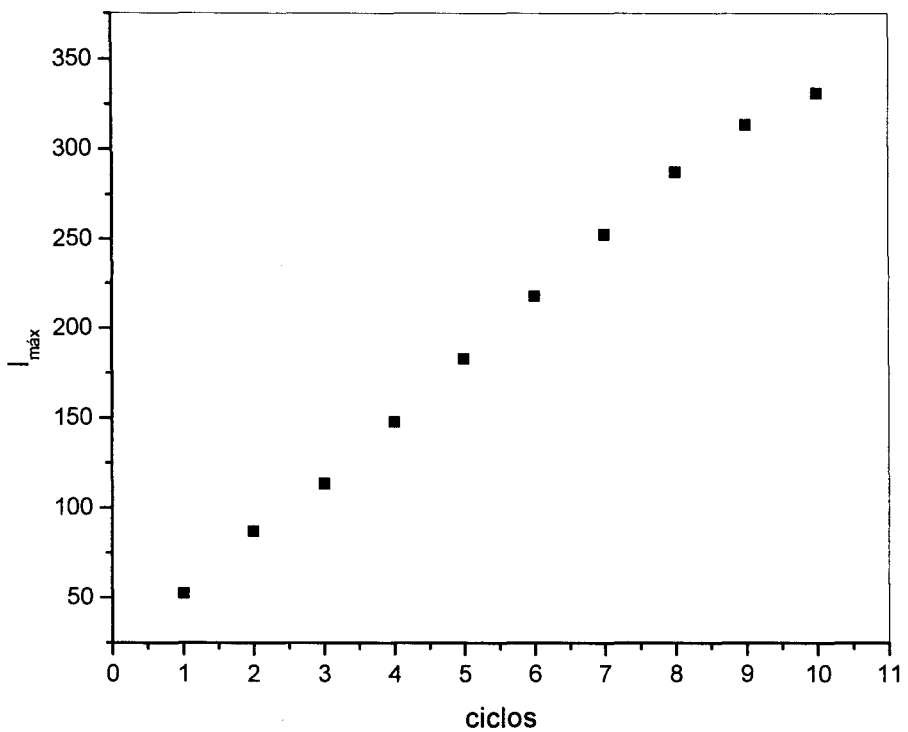

Figura 18. Curva de corrente máxima em função do número de ciclos obtidos pelo voltamograma cíclico da Figura 17.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

3.1.3. Imobilização enzimática

Após a eletropolimerização do pirrol sobre o eletrodo de Au, procedeu-se com a imobilização da PFO sobre a matriz de PPI. O GA foi utilizado em uma única etapa para a incorporação da enzima (imobilização química).

3.1.4 Concentração de glutaraldeído

A Figura 19 mostra a variação da densidade de corrente em função da concentração de GA usado durante a eletrossíntese dos filmes de PPI/PFO-GA.

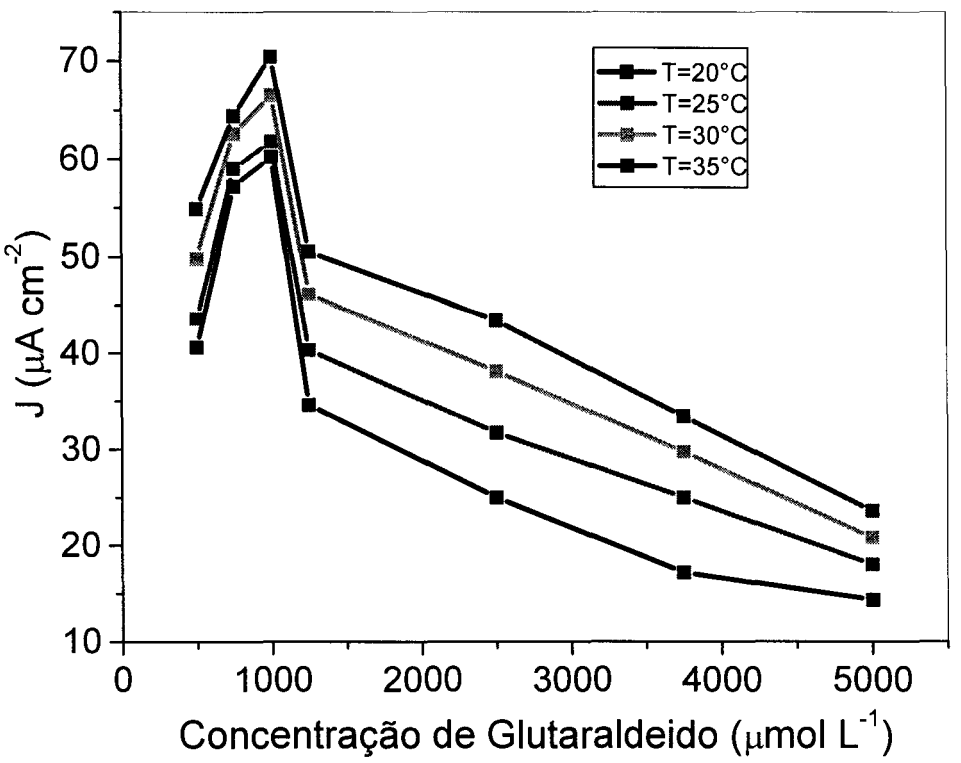

Figura 19. Dependência da densidade de corrente a uma concentração de glutaraldeído (20 a 200 μmol L^{-1}) usado durante a síntese dos filmes de PPI.

Observa-se, nesta Figura, um aumento linear da densidade de corrente em todas as faixas de temperatura a uma concentração fixa de GA. No entanto, um pico de corrente é observado para a concentração de GA em torno de 1000 μmol L^{-1}, mostrando que o uso de

quantidades superiores de GA no preparo dos biossensores PPI/PFO-GA não melhora as suas respostas (ou seja, os seus valores de densidade de corrente). Pelo contrário, causaram um decréscimo monotônico da densidade de corrente anódica máxima, provavelmente pelo aumento na espessura dos filmes de PPI sintetizados a altas concentrações de GA e pela maior dificuldade de difusão das espécies eletroativas através de filmes mais espessos.

3.1.5 Imobilização da enzima na matriz polimérica

A PFO foi imobilizada no filmes de PPI conforme apresentado na parte experimental. Aqui serão apresentados os voltamogramas cíclicos dos filmes de PPI sem e com a enzima imobilizada e sem e com o GA.

Na Figura 20a nota-se uma diferença nos valores de densidade de corrente para os filmes de PPI e PPI/PFO em potenciais fixos de 400 mV e 200 mV *vs* ECS. Essa diferença para esses potenciais não foram tão visível com a adição de GA (Figura 20b) o que possivelmente confirma uma maior estabilidade do filme com GA.

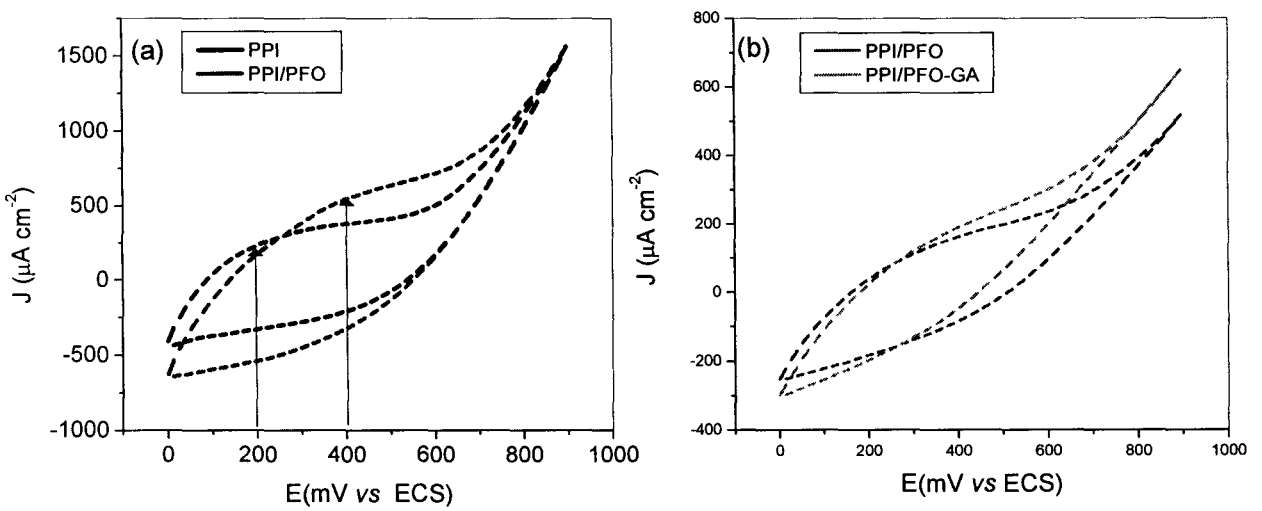

Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos filmes: a) PPI e PPI/PFO, b) PPI/PFO-GA. Os filmes foram preparados em 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,02 mol L^{-1} de GA (25%) para os filmes com GA.

3.1.6.Desempenho do biossensor

A Figura 21 mostra a dependência da densidade de corrente com o número de determinações para os filmes de PPI/PFO e PPI/PFO-GA a um potencial fixo de 50 mV. Observa-se uma diminuição mais acentuada da densidade de corrente com o número de determinações para o filme PPI/PPO. Para o filme PPI/PFO-GA, observa-se inicialmente uma acentuada diminuição da densidade de corrente mais acentuada e, em seguida, uma tendência à estabilização da resposta para número de determinação acima de 12. Este resultado observado é claramente observado no detalhe da Figura 21, onde ambas as respostas foram normalizadas. Este resultado mostra claramente que o filme PPI/PFO-GA confere uma maior estabilidade ao biossensor conforme observado na literatura com os filmes de PPI com outra enzima imobilizada (salicilato hidroxilase)[59]. Portanto, a imobilização em filmes de PPI por ligação covalente com o uso do GA proporciona uma maior estabilidade ao biossensor, particularmente para um número de determinações acima de 12.

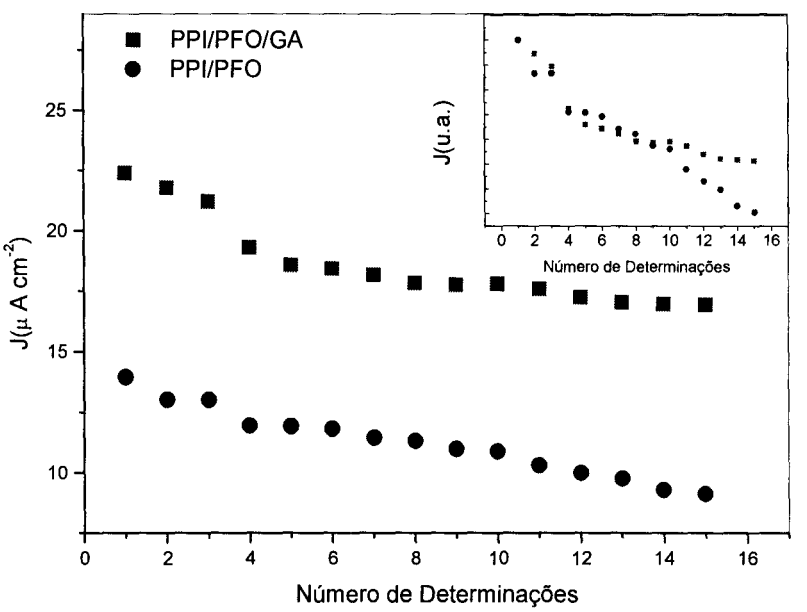

Figura 21. Perfil da estabilidade do biossensor PPI/PFO/GA comparado com o biossensor PPI/PFO em função do numero de determinações. Resposta amperométrica foi obtida em solução de tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L^{-1}), v = 50 mV s-1.

3.1.7 Resposta do biossensor PPI/PFO-GA em presença de diferentes compostos fenólicos.

O comportamento eletroquímico dos filmes PPI/PFO e PPI/PFO-GA em meio a diferentes compostos fenólicos foi avaliado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5) a um potencial de 50 mV (Figura 22). A resposta amperométrica destes filmes, após se adicionar alíquotas sucessivas de catecol, atrazina, hidroquinona e pirogalol em tampão fosfato de pH 6,5, também pode ser vista na Figura 22.

Na Figura 22 observa-se uma clara diminuição da corrente com o aumento da concentração dos compostos fenólicos, então atribuída à redução enzimática, juntamente com a produção de quinona na interface eletrodo/solução. O eletrodo enzimático respondeu rapidamente aos compostos fenólicos e uma linha de corrente de base foi alcançada em 5 segundos para atrazina, catecol e hidroquinona.

A reprodutibilidade das medidas foi verificada utilizando-se uma concentração de 400 μmol L^{-1} de catecol, sendo repetida 10 vezes para cada composto fenólico com o mesmo filme, como pode ser visto na Tabela 1. Pelos resultados obtidos, verificou-se a reprodutibilidade das medidas, principalmente para o catecol e pirogalol, possivelmente pela maior afinidade da PFO por estes substratos.

Tabela 1. Reprodutibilidade de medidas obtidas com o filme PPI/PFO/GA em compostos fenólicos.

Composto fenólico	Média	Reprodutibilidade (n)	Desvio padrão %
catecol	24,56	10	5,76
atrazina	5,14	10	0,96
pirogalol	19,58	10	3,41
hidroquinona	26,82	10	2,13

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

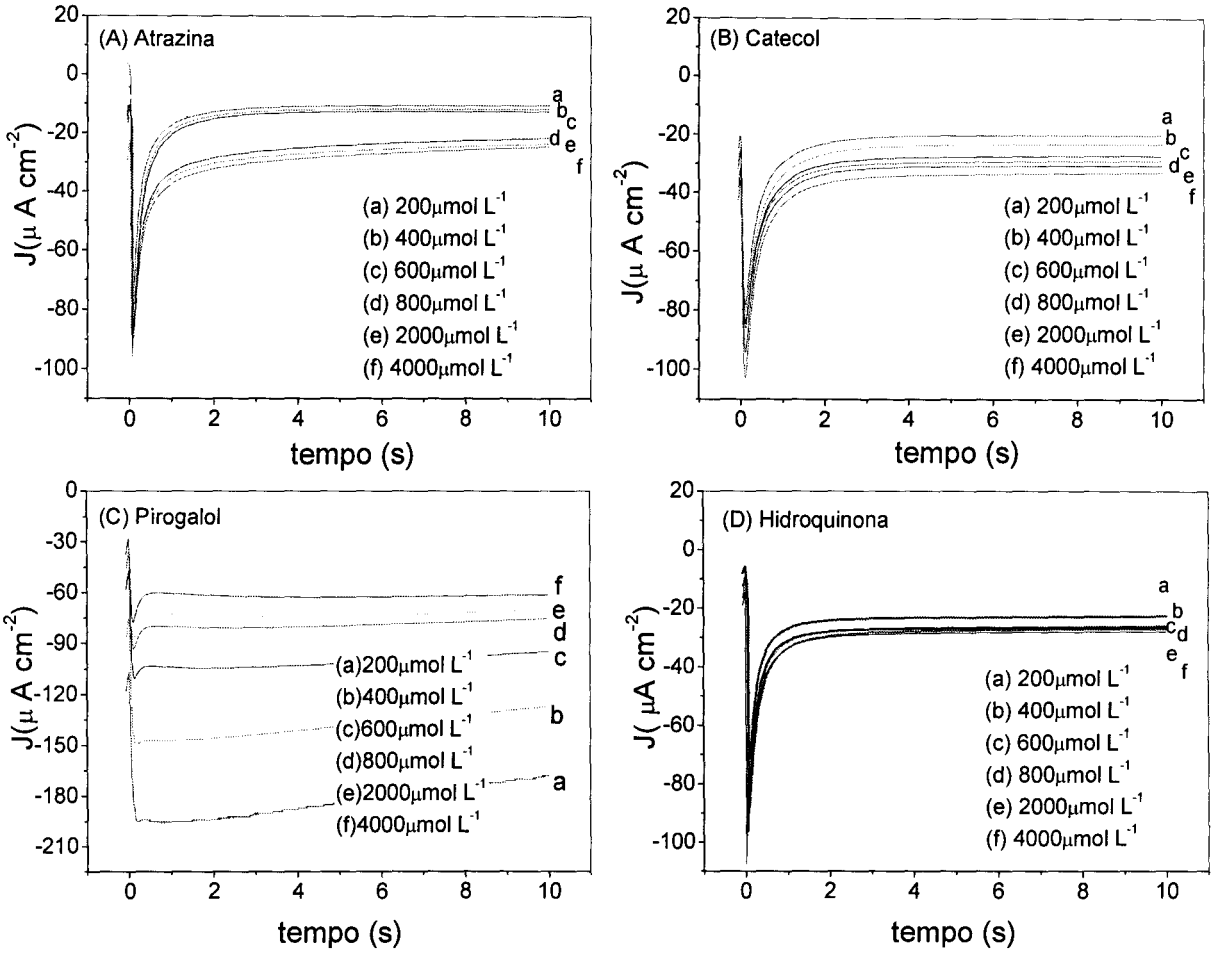

Figura 22. Cronoamperogramas dos filmes PPI/PFO-GA em meios de diferentes concentrações de (A) atrazina, (B) catecol, (C) pirogalol e (D) hidroquinona após variar a concentração de 200-4000 μmol L^{-1} em tampão fosfato com pH 6,5.

3.1.8 Curvas de calibração para diferentes compostos fenólicos

As curvas de calibração foram obtidas pela adição de diferentes concentrações dos quatros compostos fenólicos, Figura 23. As principais características dos filmes PPI/PFO-GA, incluindo sensibilidade, alcance linear e constante aparente de Michaelis-Menten, estão listadas na Tabela 2.

A sensibilidade dos filmes em meio aos diferentes compostos fenólicos foi calculada no alcance linear seguindo esta ordem: pirogalol > hidroquinona > catecol > atrazina (Tabela 2). As diferentes sensibilidades observadas pelos compostos fenólicos podem ser atribuídas à formação de *o*-quinonas durante a reação enzimática. O catecol, hidroquinona e a pirogalol

são substratos que apresentam uma alta afinidade pela PFO se comparados a outros fenóis, o que justifica uma sensibilidade mais acentuada para estes compostos [60].

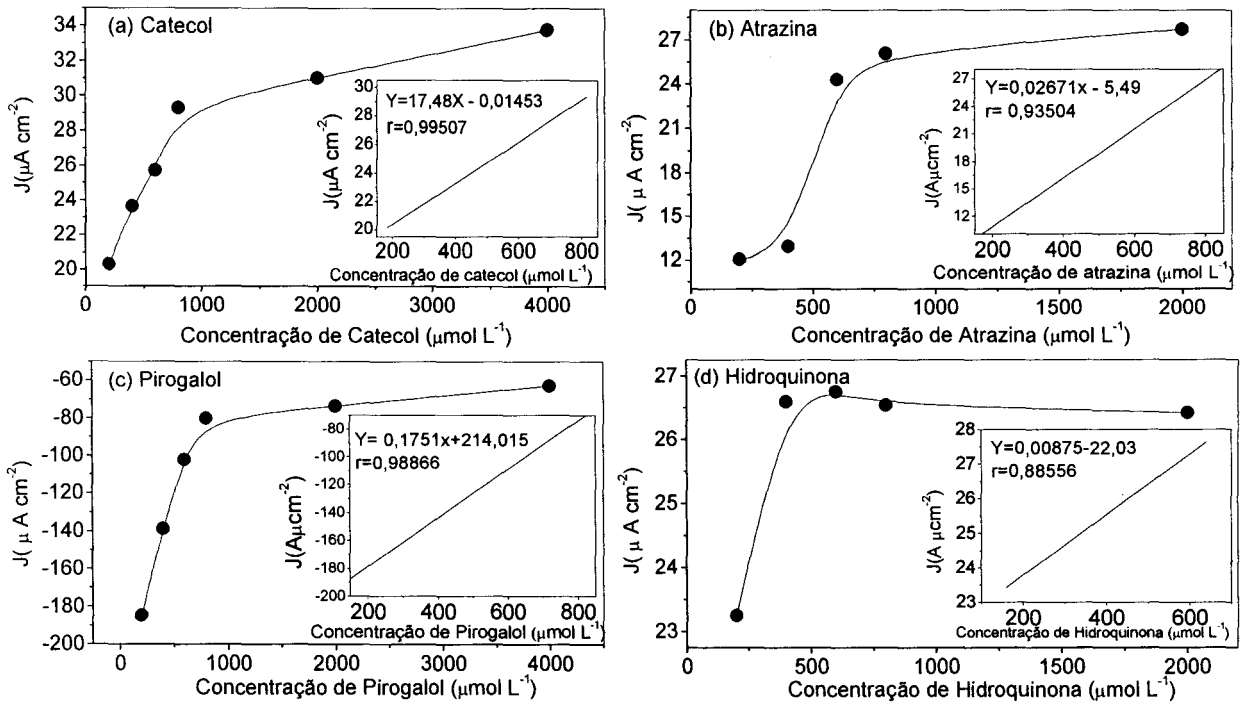

Figura 23. Curva de calibração para os compostos fenólicos (a) catecol, (b) atrazina, (c) pirogalol e (d) hidroquinona em tampão fosfato pH 6,5.

Tabela 2. Principais características analíticas do filme PPI/PFO-GA.

Composto fenólico	Limite de Detecção (μmol L^{-1})	Sensibilidade (nA/μM)	Coef. de correlação r	Alcance Linear (10^{-4}) mol L^{-1}	K_m^{ap} μM	$V_{máx}$ μA
Catecol	6,35 x 10^{-4}	0,0428	0,99507	2,0 - 8,0	135	0,03015
Atrazina	2,02 x 10^{-3}	0,0356	0,93504	2,0 - 8,0	393	0,02966
Pirogalol	5,19 x 10^{-5}	0,1827	0,9886	2,0 - 8,0	144	0,01465
Hidroquinona	5,04 x 10^{-4}	0,0446	0,88556	2,0 - 7,0	34,4	0,036

Os resultados apresentam uma seqüência de linearidade (catecol, atrazina, pirogalol e hidroquinona) com o alcance linear no intervalo de concentrações de 2,0 x10^{-4} a 8,0 x10^{-4} mol L^{-1}. Este resultado está em concordância ao observado na literatura, um intervalo linear para catecol, pirogalol, hidroquinona, fenol e *p*-cresol entre 4,0 x 10^{-5} a 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} [60].

O limite de detecção (LD) foi calculado segundo a IUPAC, que define LD como a menor quantidade mensurável com razoável certeza para um dado procedimento analítico [61]. Os procedimentos estatísticos, para uma dada curva analítica, fornecem uma expressão para o cálculo do LD em função da concentração do analito:

$$LD = \frac{KS_b}{m} \qquad (8)$$

onde m é o coeficiente angular da reta obtida de uma curva analítica, S_b, a estimativa do desvio-padrão da solução do branco e K, uma constante estatística. O uso de K= 3, sugerido pela IUPAC, permite um nível de confiança de 99,8% para uma medida baseada no erro relativo do sinal "do branco", assumindo uma distribuição normal. Considerando os valores obtidos experimentalmente e que foram representados graficamente na Figura 23, foi possível calcular o LD para cada composto fenólico. A estimativa do desvio-padrão calculada para o sinal amperométrico do "branco" (n=10) forneceu um valor de 0,16942 A cm^{-2}.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) que representa a afinidade da enzima pelo substrato foi calculada pelo método gráfico de Lineweaver-Burk. Para o filme PPI/PFO-GA, os valores da K_m aparente foram calculados como 135, 393, 144, 34,4 μM para os compostos catecol, atrazina, pirogalol e hidroquinona, respectivamente. Para o catecol como substrato, o valor da K_m foi maior do que os encontrados na literatura com outros tipos de matrizes para a PFO [62,63], o que indica uma alta afinidade da enzima quando imobilizada no filme de PPI com o substrato (catecol) e, conseqüentemente, uma alta sensibilidade do filme.

A reprodutibilidade das medidas com os filmes PPI/PFO-GA foi determinada usando uma solução contendo 600 μmol L^{-1} de catecol para quatro diferentes biossensores, o que produziu um desvio padrão de 8,3%. Esta reprodutibilidade das medidas provavelmente se deve à alta sensibilidade e eficiência da imobilização da PFO na forma de extrato bruto sobre a matriz de PPI.

3.1.9 Monitoramento do processo de formação e de resposta dos filmes de PPI por medidas eletrogravimétricas

Nesta seção, serão descritos os resultados obtidos a partir do uso da técnica de eletrogravimetria. Na Figura 24, são apresentadas as curvas eletrogravimétricas obtidas durante a síntese dos filmes de PPI, onde se observa um aumento na variação de massa para potenciais maiores do que 400 mV. A massa continua aumentar até a varredura inversa na região de potencias entre 100 e 400 mV.

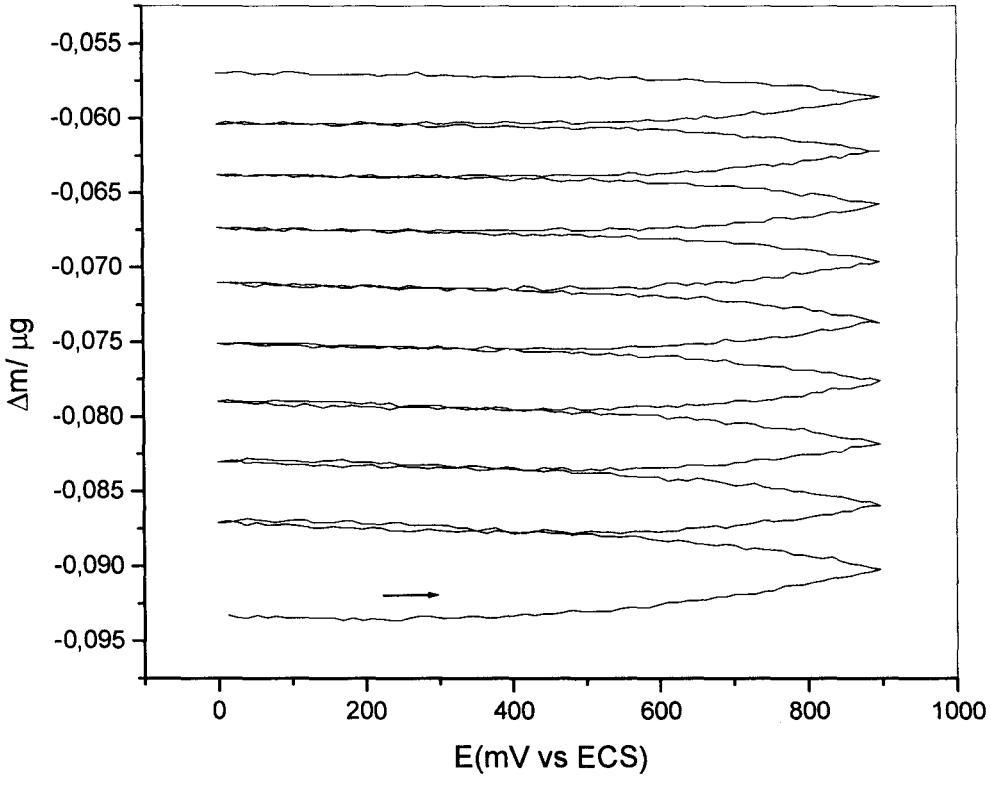

Figura 24. Curvas eletrogravimétricas durante o processo de formação do filme de PPI sobre o eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$,de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, v = 50 mV s^{-1} .

As pequenas variações de massa observadas possivelmente se referem à entrada e saída de eletrólito de suporte no filme, devido ao potencial aplicado, não estando, portanto, relacionadas ao processo de crescimento do filme. O ganho de massa do eletrodo com os ciclos sucessivos tende a diminuir com o aumento da espessura do filme, como pode ser visto

para potenciais na região de 900 mV. Este é um comportamento esperado para o processo de formação de filmes de PPI e analisado por medidas de MCQE[64].

A Figura 25 apresenta a variação da massa em função do tempo durante o processo de formação do filme de PPI que é linear, indicando a obtenção de um filme homogêneo e rígido.

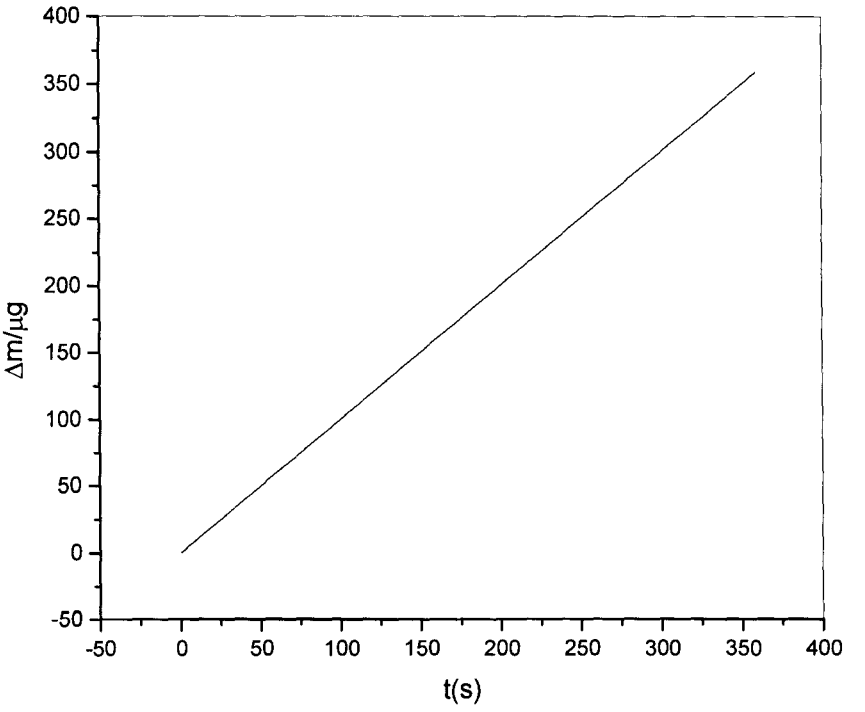

Figura 25. Variação de massa em função do tempo para o crescimento do filme de PPI em solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,1 mol L^{-1} de PPI, v = 50 mV s^{-1}.

Na Figura 26, é apresentada a variação de freqüência com o potencial aplicado, onde se observa que o filme de PPI começa a se formar sobre o eletrodo de Au quando o potencial excede o valor de 800mV.

A variação de freqüência observada na Figura 26 está relacionada à variação de massa depositada sobre o eletrodo para cada ciclo. A freqüência média que aumentou durante cada ciclo de deposição foi de 0,5 Hz, que é equivalente a um ganho de massa de 0,43 μg, um valor menor comparado ao da literatura em que na deposição eletroquímica do PPI/heparina freqüência média foi de 2 kHz o equivalente a 1,73μg[65].

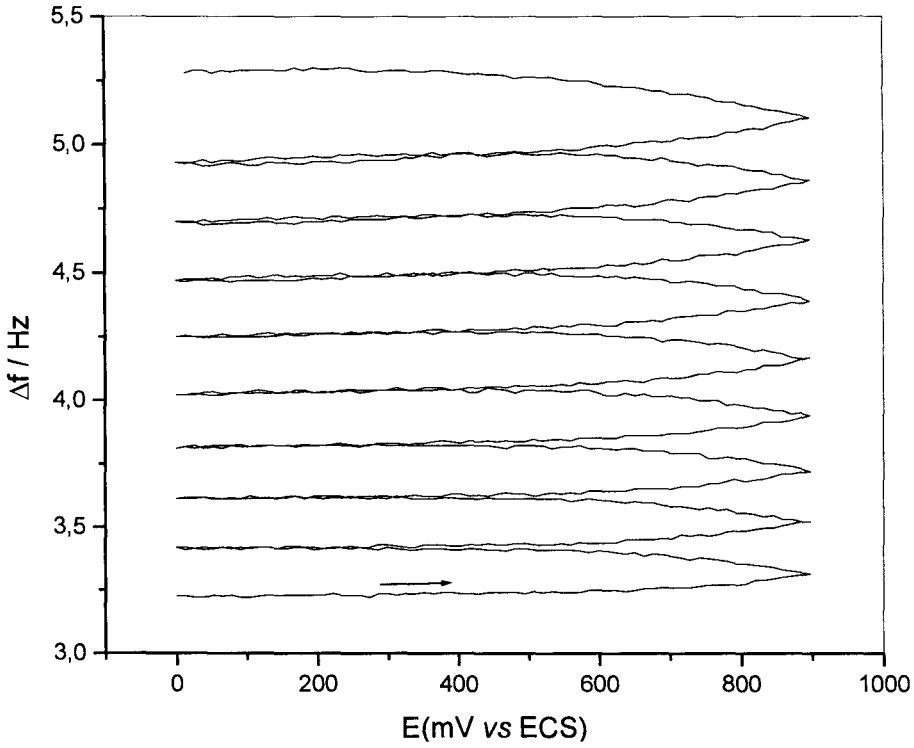

Figura 26. Variação da freqüência em função do potencial para o filme de PPI em solução aquosa de 0,02 mol L^{-1} de $LiClO_4$ e 0,1 mol L^{-1} de pirrol, v = 50 mV s^{-1}.

CAPÍTULO 4

4.1 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de biossensores amperométricos de filmes de polipirrol (PPI) como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase (PFO) e a aplicação destes biossensores na análise de compostos fenólicos foram demonstradas com sucesso neste trabalho. A otimização do processo de imobilização da enzima na matriz de PPI foi alcançada variando-se a concentração de enzima, temperatura, pH e potencial. O processo de imobilização da enzima utilizando glutaraldeído (GA) para a formação de ligação covalente cruzada foi avaliado por medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e cronoamperometria). Uma forte evidência da incorporação da enzima no filme foi constatada pela detecção de compostos fenólicos. Os biossensores detectaram satisfatoriamente os compostos fenólicos estudados (catecol, hidroquinona, pirogalol e atrazina), sendo assim, os resultados apresentados contribuíram para o desenvolvimento de biossensores eficientes e com baixo custo a partir do uso de extrato bruto de abacate (*Persea americana*) com bons resultados de sensibilidade, reprodutibilidade das medidas e estabilidade por mais de quatro semanas, tendo um decréscimo do sinal em torno de 34% até o 8° dia. Os resultados obtidos nos permitem prever outras possibilidades de trabalhos futuros devido à variedade de sistemas biocatalíticos encontrados em outros tecidos vegetais e a construção de novos biossensores, não só com a enzima estudada, mas também com outros sistemas enzimáticos.

CAPÍTULO 5

5.1 REFERÊNCIAS

1. MANAHAN, S. E. *Enviromental chemistry*. 5.ed. Chelsea, USA:Lewis Publishers, Inc., 1991.

2. YAO, T., KOTEGAWA, K. A Flow injection biosensor system for highly sensitive detection of 2,4,6-trichlorophenol based on preoxidation by ceric sulfate. *Analytical Sciences*.,v.19, p.829-833, 2003.

3. JANATA, J.et al. Chemical sensors. *Analytical Chemistry*. v. 70, p. 179-208, 1998.

4. COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 14, p. 443-456, 1999.

5. MATSUKURA, R. et al. Determination of glucose in instant coffee with an enzyme electrode. *Analytica Chimica. Acta*. v. 280, p. 49-52, 1993.

6. FONONG.T. Amperometric determination of sulfite with sulfite oxidase immobilized at a platinum electrode surface. *Analytica Chimica Acta*. v.184, p. 287-290, 1986.

7. BEUTLER, H. O., A new enzimatic method for determination of sulphite in food. *Food Chemistry,* v.15, p.157-164, 1984.

8. THÉVENOT, D. R. et al. Eletrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied. Chemistry*. v.17, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

9. DESHPANDE, M. V., AMALNERKAR, D. P. Biosensor prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. *Progress in Polymer Science*. v.18, p. 623-649, 1993.

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

11. UPDIKE, S. J., HICKS, G. P., The enzyme electrode. *Nature*. v. 214, p. 986, 1967.

12. GORTON, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues and cells. *Electroanalysis*. v.7, n. 1, p. 23-45, 1995.

13. GUILBAULT, G. G. *Analytical uses of immobilized enzymes*. New York: Ed. Marcel Dekker, Inc., 1984.

14. MELLO, L. D., KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drinks industries. *Food Chemistry*. v.77, n. 2, p. 237-256, 2002.

15. WHITAKER, J. R., *Principles of enzymalogy for Food Sciences*. New York: Marcel Dekker, 1972.

16. LUPETTI, K. O., RAMOS, L. A., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistemas de análise por injeção de fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). *Química Nova*. v. 26, p. 197, 2003.

17. FENOLL, L.G. et al. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinone. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1548, p.1-22, 2001.

18. DECKER, H., TUCZEK, F. Tyrosinase/ catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 25, p. 392-397, 2000.

19. YORUK, R., MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase; A review. *Journal of Food Biochemistry*. v. 27, n.5, p. 361- 422, 2003.

20. MACHOLAN, L. SCHANEL, L., Enzyme electrode with immobilized polyphenol oxidase for determination of phenolic substrate. *Collection Czechoslovak Chemical Communication* v. 42, n.12, p. 3667-3675, 1977.

21. FATIBELLO-FILHO, O., CRUZ, V. I., Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fontes enzimáticas. *Química Nova*. v. 25, p. 455-464, 2002.

22. FATIBELLO-FILHO, O., CAPELATO, M. D. Biossensores. *Química Nova*. v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

23. VIEIRA, I. C., FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) as enzymatic source. *Analytica Chimica Acta*. v. 366, p. 111 - 118, 1998.

24. Castilho, T. J., Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores.2003.114p. Tese (Doutorado)- Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.

25. ROSATTO, S.S. et. al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n.1, p.77-86, 2001.

26. SCOUTEN, W. H., LUONG, J. H. T., BROWN, S. Enzyme or protein immobilization techiniques for application in biosensor design. *Trends in Biotechnology*. v. 13, n.5, p. 178-185, 1995.

27. GERARD, M., CHAUBEY, A., MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 17, p. 345-359, 2002.

28. LIAN CEN, K, G., NEOH., KANG, E. T. Surface functionalization of polypyrrole film with glucose oxidase and viologen. *Bioelectronics*. v. 18, p. 363-374, 2003.

29.BARTLETT, P. N., COOPER, J. M. A review of the immobilization of enzymes in electroplymerized films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.362, p. 1-12, 1993.

30.TOSHIMA. N., HARA, S. Direct synthesis of conducting polymers from simple monomers. *Progress Polymer Science*. v. 20, p. 155-183, 1995.

31. A. DALL'OLIO. et al. Electronic paramagnetic resonance and conductivity of a black electrolytic oxypyrrole. *Comptes rendus hebbomdaires des seances de L academie dês science :serie C,*. v. 267, n.6, p. 433, 1968.

32. DIAZ, A. F., K. K.: KANAZAWA., G. P. GARDINI., Electrochemical polymerization of pyrrole. *Journal Chemical Societ: Chemical Communication*. v. 635, 1979.

33.DIAZ, A. F., J. J. CASTILLO., A polymer electrode with variable conductivity: polypyrrole. *Journal Chemical Society:.Chemical Communication*. v.397, 1980.

34. VIEIRA, I. C., FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxidase using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. *Analyst*, v.123, p.1809-1812, 1998.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

35. VIEIRA, I. C., FATIBELLO-FILHO, O. Spectrophotometric determination of methyldopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L) Lam) as enzymatic source. *Talanta*, v. 46, p.559-564, 1998.

36. FATIBELLO-FILHO, O. VIEIRA, I. C. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor base don carbon paste modified with crude extract of Zucchini (*cucurbita pepo*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v.11, n. 4, p. 412-418, 2000.

37. FATIBELLO-FILHO, O. VIEIRA, I. C. *L*- Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. *Analytica Chimica Acta*. v. 399, p. 287-293, 1999.

38. MICHAELIS, L., MENTEN, M. L. Kinetics of Invertase Action. *Biochemische Zeitschrift*. v.49, p. 333-369, 1913.

39. BRIGGS, G. E., HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. *Journal Biochemistry,* v.19, p.338-339, 1923.

40. HAJDU, J. FRIEDRICH, P. Reaction of glutaraldehyde with NH_2 compounds : A spectrophotometric method for the determination of glutaraldehyde concentration. *Analytical Biochemistry*, v. 65, p. 273-280, 1975.

41. SUMMER, J. B.; MYRBÃCK, K. *The Enzymes-chemistry and mechanism action*. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1951.v. III, cap. 57.

42. KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization, *Analytica Biochemistry*. v. 93, p. 1-25, 1979.

43. DE LA GUARDIA, M. Biochemical sensors. *Microchimica Acta*. v.120, p.243-255,1995.

44. MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. v. 37, p.790-802, 2004.

45. TICIANELLI, E. A., GONZALEZ, E. R. *Eletroquímica: princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP,1998.p. 121.

46. O' SULLIVAN, C. K., GUILBAULT, G. G. Commercial quartz crystal microbalance – theory and applications. *Biosensors & Bioelectronics*. v.44, p. 663-670, 1999.

47. BUTTRY, D. A. *In Electroanalytical Chemistry. A series of advances* New York: Marcel Dekker, 1990.p. 23.

48. LI, J., CHIA, L. S., GOH, N. K., TAN, S. N. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytyca Chimica Acta.*, v.362, n.2 p. 203-211, 1998.

49. COSNIER S., INNOCENT, C. *A* new strategy for the construction of a tyrosinase-based amperometric phenol and o-diphenol sensor. *Bioelectrochemistry bioenergetics.* v. 31, p. 147, 1993.

50. SERRA, B. et al. Composite electrochemical biosensores: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors. *Biosensors & Bioelectronic.* v. 17, p. 217-226, 2002.

51. ARSLAN, A. et al. Immmobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrice. *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 35, p.163-167, 2005.

52. ÇIL, A., et al. Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix. *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 41, p. 49-55, 2007.

53. GIRELLI, A. M., MATTEI, E., MESSINA, A. Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application development and characterization. *Sensors and Actuators B* v. 121, p.515-521, 2007.

54. SANTOS, A. S. et al. Determination of phenolic compounds based on co-immobilization of methylene blue and HRP on multi-wall carbon nanotubes. *Eletroanalysis.* v. 19, 5, p. 549-554, 2007.

55. RAJESH., TAKASHIMA, W., KANETO, K. Amperometric tyrosinase based biosensor using na electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *Reactive & Functional Polymers.* v. 59, p.163-169, 2004.

56. LIAN, G., DONG, S. Eletrochemical behaviour of $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redox ions in a polypyrrole film. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* v. 260, n. 1, p. 127-136, 1989.

57. YON HIN, B. F. Y., LOWE, C. R. Amperometric response of polypyrrole entrapped bienzyme films. *Sensors and Actuators B.* v.7, p. 339-342, 1992.

58. PEERCE, P. J., BARD, A. J., Polymer films on electrodes. Part. II. Film structure and mechanism of electron transfer with electrodeposited poly(vinylferrocene). *Journal Electroanalytica Chemistry.* v. 112, p. 97-115, 1980.

59. JUNIOR, L. R. et al. Determination of salicylate in blood serum using na amperometric biosensor base on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix. *Talanta.* v. 51, p. 547-557, 2000.

60. VIEIRA, I. C. et al. Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante. *Eclética Química.* v. 29, n. 2, p. 7-14, 2004.

61. CARRALERO, V. et al. Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor base don a composite graphite-teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 22, p. 730-736, 2006.

62. KIM, MIN AH., LEE, WON-YONG. Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/nafion composite film. *Analytica Chimica Acta*. v. 479, p.143-150, 2003.

63. CHIA, J. LI. L.S., GOH, N. K., TAN, S. N., Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*. v. 362, p. 203-211, 1998.

64. LIM, J. Y., PAIK, WOON-KIE., YEO, IN-HYEONG. A study on ion transports and growth of conducting polypyrrole with electrochemical quartz crystal microbalance. *Synthetic Metals*. v.69, p. 451-454, 1995.

65. ZHOU, D., TOO, C. O., WALLACE, G.G. Synthesis and characterization of polypyrrole/heparin composites. *Reactive & Functional Polymers*. v. 39, p.19-26, 1999.

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.*NBR 6023*:informação e documentação: referências:elaboração. Rio de Janeiro,2002.