INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

RODRIGO LINS PAGLIAI

**Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto
enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol**

São Carlos

2009

RODRIGO LINS PAGLIAI

Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol

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

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais

Orientador: Prof^a. Dr^a. Débora Gonçalves

São Carlos

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Pagliari, Rodrigo Lins

Comparação do uso da tirosinae purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol/ Rodrigo Lins Pagliari; orientador Debora Gonçalves.--São Carlos, 2009.

59 p.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Lins Pagliai

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: 16/02/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Debora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Marcia Nitschke

Instituição: IQSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

Instituição: UFSCar

Assinatura

Dedico esse trabalho aos meus pais, *ANTONIO* e *THEREZA*, pelo amor, carinho e apoio durante todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

- ✓ À Prof^a. Dra. Débora Gonçalves, pela confiança e dedicação, que com amizade e profissionalismo me ensinou a enfrentar os desafios surgidos no decorrer desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.
- ✓ À Dra. Débora Balogh que teve papel importante no desenvolvimento das etapas desse trabalho.
- ✓ Ao Profs. Iouri Poussep e Roberto Onmori pelo importante auxílio no desenvolvimento dos moldes.
- ✓ Aos amigos do Grupo de Polímeros, entre outros: André, Andrey, Dilleys, Drica, Edvaldo, Heurison, Juliana, Manoel, Manso, Marcela, Marcelo, Mike, Rafael, Vana, Wagner e Washington. Àqueles que contribuíram de inúmeras maneiras para esse trabalho: Alexandre, Elaine, Guidoval e Maurício.
- ✓ Aos amigos não acadêmicos, que sempre auxiliaram de todas as outras maneiras possíveis: Alessandro, André, Boca, Dani, João, Leo, Renê, Ronald e Simone.
- ✓ Aos funcionários do grupo: Ademir, Bertho, Níbio e Rosângela pelo apoio técnico.
- ✓ Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

*“Equipped with his five senses, man explores the
universe around him and calls the adventure
Science.”*

— EDWIN POWELL HUBBLE (1889 – 1953)

Resumo

Este trabalho tem como principal objetivo comparar as respostas de biossensores amperométricos preparados a partir do uso de uma enzima, a tirosinase (polifenoloxidase, PFO), quando nas formas purificada e adquirida comercialmente e de extrato bruto enzimático do fruto do abacate (*Persea Americana*). As soluções de PFO apresentaram valores de atividades enzimáticas de 479 unidades de enzimas ativas por mililitro (UA mL⁻¹) (purificada) e 259 UA mL⁻¹ (extrato bruto). A enzima nas duas formas (pura e como extrato bruto) foi imobilizada quimicamente em substratos de Au modificados com monocamadas automontadas (*self-assembly monolayers*, SAMs) de ácido mercaptopropiônico (MPA) pela técnica de impressão por microcontato (μCP). Os biossensores foram preparados sobre substratos de Au modificados por μCP com um molde elastomérico de polidimetilsiloxano (PDMS), cujas trilhas paralelas de 100 μm foram produzidas pela cura polimérica sobre um molde mestre de GaAs. A réplica de PDMS se mostrou fiel em relação ao molde mestre nos picos e vales, mas apresentou defeitos na borda dos moldes. Com o objetivo de otimizar o funcionamento dos biossensores, eles foram caracterizados pelas técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria com um sistema de análise de injeção em fluxo (FIA) em meio de catecol a diferentes concentrações. Os potenciais de oxidação do catecol nos eletrodos de Au modificados foram observados em 418 e 365 mV, em pHs ótimos de funcionamento de 7,0 e 7,2, e com limites de detecção de 6,65 nmol L⁻¹ e 4,65 nmol L⁻¹ para os biossensores com a enzima purificada e com o extrato bruto, respectivamente. A saturação dos sensores teve início a uma concentração de catecol de 0,02 mol L⁻¹. Com estes resultados, mostramos que é possível o preparo de biossensores com um baixo custo, eficientes e miniaturizadas a partir do uso da PFO na forma extrato bruto do fruto do abacate para a detecção de compostos fenólicos, tal como catecol, abrindo assim a possibi-

lidade de uso destes biossensores na análise e no monitoramento de pesticidas presentes no solo e na água.

Palavras-chave: biossensores, eletroquímica, monocamadas automontadas, litografia.

Abstract

The main objective of this master thesis is to compare the performance of amperometric biosensors prepared using the purified tyrosinase (PPO) enzyme, (commercially acquired) and the PPO present in the enzymatic crude extract from the avocado fruit (*Persea Americana*). The PPO solutions had 479 units of active enzyme per milliliter (UA mL⁻¹) (purified) and 259 UA mL⁻¹ (crude extract). Both forms of the enzyme (purified and crude extract) were chemically immobilized on gold substrates patterned with 3-mercaptopropionic acid (MPA) self assembled monolayers (SAMs), using the microcontact printing (μCP) technique. The biosensors were prepared on gold substrates patterned using μCP with a polydimethylsiloxane (PDMS) elastomeric mold, that was shaped in the form as tracks using a gallium arsenate master mold. The PDMS mold was quite similar to the master mold in its peaks and valleys, but defects were found on the edges. In order to optimize the parameters of the biosensors, they were characterized using cyclic voltammetry and chronoamperometry techniques in a FIA system by catechol injections at different concentrations. The oxidation potentials for the catechol analysis using the patterned biosensors were observed at 418 and 365 mV, the optimum pH were 7,0 and 7,0, with detection limits of 6,65 nmol L⁻¹ and 4,65 nmol L⁻¹ for the purified enzyme and crude extract biosensors, respectively. The biosensors saturation point started at 0,02 mol L⁻¹ of catechol concentration. With this results, we demonstrate that it is possible to use miniaturized, efficient, low cost biosensors based on tyrosine from the avocado's fruit crude extract to detect phenolic compounds, as the catechol. This expands the possibility of using this biosensors in the analysis and monitoring pesticides in water and soil.

Keywords: biosensors, electrochemistry, self-assembly monolayers, lithography.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Esquema ilustrando uma SAM típica.....	19
Figura 2 – Detalhes das etapas da técnica de impressão por microcontato desde a produção do molde elastomérico até a modificação do substrato.	22
Figura 3 – Figura esquemática de tipos de biossensores e seus mecanismos de reconhecimento molecular e os detectores mais amplamente utilizados (adaptada de NAKAMURA & KARUBE, 2003).	24
Figura 4 – Esquema da imobilização química por ativação do grupo carboxílico terminal do 3-ácido mercaptopropiônico (MPA).	27
Figura 5 – Mecanismo de catalisação enzimática do fenol para o-quinona pela PFO na presença de H ₂ O	29
Figura 6 – Molde mestre de GaAs com trilhas paralelas de 100 µm.....	35
Figura 7 – Esquema básico do sistema de FIA utilizado nos experimentos.	38
Figura 8 – Estudo da cinética química das soluções de PFO a) purificada e b) como extrato bruto com as respectivas equações das regiões lineares e os coeficientes de determinação.	41
Figura 9 – Comparação entre os perfis do molde mestre de GaAs e do molde elastomérico de PDMS e o desvio relativo entre eles.	42
Figura 10 – Voltametrias cíclicas dos eletrodos de Au modificados com MPA e a enzima imobilizada quando na forma purificada e de extrato bruto em presença de catecol 10 ⁻² mol L ⁻¹ a pH 7,0.....	44
Figura 11 – Respostas típicas de cronoamperometria para um sistema de FIA para ambos os biossensores com injeções de catecol a 10 ⁻³ mol L ⁻¹ nos respectivos pHs ótimos de funcionamento.	46
Figura 12 – Gráficos da otimização de pH dos biossensores fabricados a partir das enzimas purificadas e na forma de extrato bruto de abacate..	47
Figura 13 – Curva de calibração analítica dos biossensores para concentrações de 2,5x10 ⁻³ a 0,1 mol L ⁻¹ , coeficientes de determinação e fórmulas relativas às regressões lineares, em escalas lineares.....	50

Figura 14 – Curva de calibração analítica dos biossensores para concentrações de $2,5 \times 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e coeficientes de determinação das regressões lineares, em escalas logarítmicas 51

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Variações de densidade de corrente das injeções de catecol, para os diferentes pHs, valores médios e desvios padrões obtidos pelas análises de cronoamperometria dos biossensores de extrato bruto em $\mu\text{A cm}^{-2}$ 46
- Tabela 2** – Variações de densidade de corrente das injeções de catecol, para os diferentes pHs, valores médios e desvios padrões obtidos das análises de cronoamperometria dos biossensores de enzima purificada em $\mu\text{A cm}^{-2}$ 46
- Tabela 3** – Variação de densidade de corrente (ΔJ , $\mu\text{A/cm}^2$) das injeções de catecol a concentrações e pH 6,8 durante as cronoamperometrias para o biossensor produzido com enzima purificada e as respectivas médias e desvios padrão. 49
- Tabela 4** – Variação de densidade de corrente (ΔJ , $\mu\text{A/cm}^2$), das injeções de catecol a concentrações à diferentes concentrações e pH 7,0, durante as cronoamperometrias de caracterização do biossensor produzido com extrato bruto, e as respectivas médias e desvios padrão..... 49
- Tabela 5** – Valores de J_B , S_B , J_L , m e C_L para os biossensores de enzima purificada e extrato bruto. 53

Lista de Siglas

<i>Ag</i>	<i>Prata</i>
<i>Au</i>	<i>Ouro</i>
<i>EDC</i>	<i>Hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida</i>
<i>FIA</i>	<i>Análise por injeção em fluxo</i>
<i>GaAs</i>	<i>Arseneto de gálio</i>
<i>HSM</i>	<i>Hexametil siloxano</i>
<i>LD</i>	<i>Limite de detecção</i>
<i>MPA</i>	<i>Ácido 3-mercaptopropiônico</i>
<i>PDMS</i>	<i>Poli(dimetilsiloxano)</i>
<i>PFP</i>	<i>Pentafluorfenol</i>
<i>PFO</i>	<i>Polifenoloxidase</i>
<i>PPO</i>	<i>Polyphenoloxidase</i>
<i>PT</i>	<i>Platina</i>
<i>SAM</i>	<i>Monocamada automontada, do inglês self assembly monolayers</i>
<i>Si</i>	<i>Silício</i>

Lista de Símbolos

λ	<i>comprimento de onda</i>
C	<i>concentração</i>
C_B	<i>concentração do branco</i>
C_L	<i>concentração limite</i>
J	<i>densidade de corrente</i>
$\bar{J}_B$	<i>densidade de corrente média do branco analítico</i>
J_L	<i>densidade de corrente limite</i>
k	<i>fator do nível de confiança</i>
m	<i>sensibilidade analítica</i>
R^2	<i>coeficiente de determinação</i>
S_B	<i>desvio padrão do branco analítico</i>
t	<i>tempo</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Apresentação	17
1.2	Objetivos	18
1.3	Monocamadas automontadas	18
1.4	Impressão por microcontato	20
1.5	Biossensores	23
1.5.1	Biossensores eletroquímicos	24
1.5.2	Biossensores enzimáticos	25
1.5.3	Métodos de imobilização enzimática	26
1.6	Polifenoloxidase (tirosinase)	27
1.7	Análise de injeção por fluxo	29
1.8	Perfilometria	31
2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
2.1	Materiais	32
2.2	Métodos	33
2.2.1	Preparação dos substratos de Au	33
2.2.2	Preparação das soluções enzimáticas	33

2.2.3	Caracterização das soluções enzimáticas	34
2.2.4	Preparação do Molde Polimérico	35
2.2.5	Análise da confiabilidade estrutural do molde de PDMS	36
2.2.6	Modificação da superfície do substrato de ouro	36
2.2.7	Imobilização enzimática	37
2.2.8	Caracterização eletroquímica dos biossensores	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1	Determinação da atividade enzimática das soluções de PFO	40
3.2	Confiabilidade estrutural do molde elastomérico em relação ao molde mestre	42
3.3	Caracterização eletroquímica dos biossensores	44
3.3.1	Determinação dos potenciais de oxidação dos biossensores	44
3.3.2	Determinação do pH ótimo de funcionamento dos biossensores	45
3.3.3	Determinação dos parâmetros de validação dos biossensores	48
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	54
	REFERÊNCIAS	56

1 Introdução

1.1 Apresentação

Os assuntos abordados nessa dissertação estão dispostos na sequência a seguir. No capítulo 1 (Introdução), são apresentados os objetivos do presente trabalho e um panorama atual sobre as técnicas e experimentos utilizados no desenvolvimento do trabalho, depois discutimos como ocorre a modificação do substrato de ouro (Au) com o uso de monocamadas automontadas (SAMs, do inglês *self assembled monolayers*), o uso da técnica de impressão por microcontato (μ CP, do inglês *microcontact printing*) para a deposição de SAMs no molde padrão desejado sobre um substrato, a utilização de biossensores na detecção de analitos específicos, os aspectos gerais sobre a enzima estudada, a tirosinase, e a técnica de perfilometria, que foi utilizada para caracterizar os moldes.

No capítulo 2 (Procedimento experimental) serão descritos todos os materiais e técnicas utilizadas neste trabalho, como foi realizada a determinação da atividade enzimática, obtida a reprodutibilidade do molde elastomérico e a caracterização eletroquímica dos biossensores.

No capítulo 3 (Resultados e discussão), serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. No capítulo 4 (Conclusões e perspectivas futuras) mostramos o que conseguimos atingir no presente trabalho e as perspectivas de continuação do trabalho.

1.2 Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo comparar o uso da enzima tirosinase, polifenoloxidase, PFO, presente no extrato bruto do fruto do abacate (*Persea Americana*), com a enzima purificada, adquirida comercialmente, na fabricação de biossensores amperométricos para a detecção de catecol. O intuito de tal comparação é para diminuir os custos e o tempo de produção de biossensores para a detecção de compostos fenólicos e, assim, possibilitar a substituição de métodos analíticos tradicionais, que são dispendiosos em tempo e custo, demandam analistas qualificados e não podem ser utilizados para monitoramento contínuo ou em campo. O trabalho tem ainda como objetivo estudar a preparação de biossensores enzimáticos em substratos de Au modificados com monocamadas automontadas, SAMs, de 3-ácido mercaptopropiônico, MPA, pela técnica de impressão por microcontato e a otimização e caracterização destes biossensores.

1.3 Monocamadas automontadas

As monocamadas automontadas se caracterizam por serem ordenamentos formados após a adsorção de moléculas orgânicas surfactantes, inicialmente em fase dispersa, em solução líquida ou em fase gasosa, sobre substratos sólidos.

Estudos da cinética de adsorção química de SAMs em fase gasosa apresentam menor complexidade em comparação ao processo de formação das monocamadas em soluções líquidas. No primeiro caso (fase gasosa), observa-se a quebra da ligação S-H, seguida da ligação do tiolato ao substrato metálico e a liberação do átomo de hidrogênio, provavelmente

na forma de H_2 (1). Numa segunda etapa, ocorre o aumento da organização e o empacotamento das cadeias carbônicas (2). No segundo caso (fase líquida), as moléculas se organizam espontaneamente sobre a superfície sólida, de acordo com o arranjo cristalino do substrato. O grau de organização da monocamada depende da interação química do substrato e da monocamada e da natureza da interação intermolecular das cadeias carbônicas (3).

Do ponto de vista energético, a molécula orgânica surfactante pode ser dividida em três partes, a primeira consiste no primeiro grupo terminal da molécula (normalmente tiolatos em substratos metálicos e silanos em substratos de Si), que promove o processo de adsorção química na superfície do substrato; a segunda, como uma cadeia carbônica, que principalmente devido às interações de van der Waals, regula o empacotamento da monocamada; e a terceira, como o segundo grupo terminal, que determina as propriedades da superfície da monocamada, tais como caráter hidrofóbico, ou hidrofílico, reatividade química e capacidade de participar de reações químicas no grupo terminal exposto (4).

Na Figura 1 estão apresentadas as partes de uma monocamada adsorvida sobre uma superfície sólida.

Figura 1. Esquema ilustrando uma SAM típica.

São as diferentes propriedades dos grupos terminais expostos que possibilitam a imobilização da molécula orgânica na forma de monocamada sobre a superfície. Para

moléculas com grupos terminais mais sensíveis às mudanças de pH, tais como $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$, é possível se ter um controle sobre a densidade de carga na monocamada e, assim, promover a deposição eletrostática de material. É possível também aproveitar a reatividade química do grupo terminal da monocamada para promover a imobilização química de material; tais metodologias podem ser utilizadas para a imobilização de material biológico durante a produção de biossensores em substratos modificados com monocamadas automontadas (SAMs) (1).

A modificação química de superfícies com monocamadas automontadas não é uma metodologia nova, mas, nas últimas décadas, substratos modificados com SAMs têm encontrado aplicação na área de microeletrônica, em sensores químicos e biológicos, para a proteção de superfícies contra ataques corrosivos, etc. Porém, em se tratando de biossensores preparados por imobilização sobre essas superfícies modificadas, pouco ainda foi feito no que se refere às suas aplicações, principalmente se foram utilizadas técnicas de fabricação em nanoescala, tal como por impressão por microcontato. O uso de substratos metálicos quimicamente modificados com SAMs de compostos orgânicos do tipo alcanotiolatos (R-SH , RSSR' , RSR') passou a ser bastante difundido, em particular em estudos de adesão, molhabilidade e adsorção (5).

1.4 Impressão por microcontato

O grupo de Whitesides quem primeiramente detalhou na literatura o preparo de SAMs por novas técnicas de litografia, que foram denominadas *soft lithography*. As novas técnicas de microfabricação abriram o campo de aplicação de diferentes materiais em biossensores, diodos emissores de luz (LEDs) e transistores de efeito de campo (FETs); dentre essas técni-

cas, podemos destacar a litografia óptica (fotolitografia), impressão por jato de tinta e impressão por microcontato (μ CP) (3) (6) (7).

O uso de técnicas de impressão é de grande interesse, já que elas demandam um menor número de etapas a um menor custo, além de serem ambientalmente amigáveis. A técnica de μ CP é versátil, simples, de baixo custo e adaptável para superfícies com grandes áreas e superfícies flexíveis. A sua principal característica é a alta definição obtida, da ordem de micrômetros, ou até mesmo, nanômetros, justificando em parte o seu uso em microeletrônica molecular (3).

A técnica de μ CP consiste na deposição de uma monocamada em um substrato por contato físico de um molde elastomérico (comumente um polímero flexível tal como polidimetilsiloxano, PDMS) previamente exposto à molécula que formará a SAM (6) (8).

A fabricação de biossensores em substratos preparados pela técnica de μ CP ainda foi pouco estudada e é esperado que tais biossensores apresentem características de interesse pela escala utilizada na modificação dos substratos, nanométricas. A

Figura 2 mostra as etapas para a produção de um substrato modificado por μ CP já conforme utilizados aqui nesta dissertação.

Figura 2. Detalhes das etapas da técnica de impressão por microcontato desde a produção do molde elastomérico até a modificação do substrato.

Conforme se observa na Figura 2, em uma primeira etapa é depositado um fotoresiste sobre o substrato a ser utilizado como molde mestre. O fotoresiste passa então por um processo de fotodegradação, quando se cria um padrão (molde mestre) sobre o substrato inicial, e é feita a cura polimérica do elastômero com base no molde mestre. Em uma etapa seguinte, depois que o molde elastomérico é colocado na solução com o composto que formará a monocamada, ele é colocado em contato físico com o substrato, quando ocorre a deposição da monocamada no substrato.

O molde elastomérico pode ter dimensões de 5 nm a 500 mm, podendo ser utilizado para promover inúmeras modificações de superfícies. O PDMS é flexível e permite a modificação de superfícies não planares e com grandes superfícies. Devido a sua baixa energia livre de interface ($21,6 \times 10^{-3} \text{ J cm}^{-2}$), ele se solta facilmente de superfícies frágeis e por ser homogêneo e transparente a comprimentos de onda abaixo de 300 nm, ele possibilita a ocorrência de ligações cruzadas de pré-polímeros que estão sendo moldados pelo uso de luz ultravioleta (6) (8).

1.5 Biossensores

Nos últimos anos, o uso de biossensores tem aumentado continuamente em diversas áreas, tais como no monitoramento e controle ambiental, análises químicas em indústrias farmacêuticas, alimentícias, na agricultura. Os biossensores permitem o monitoramento em tempo real, que podem substituir análises químicas intermitentes em indústrias e laboratórios de análises clínicas (9).

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para monitoramento ambiental tem estimulado estudos com o preparo e a caracterização de biossensores que possam ser utilizados em campo, ou ainda, em monitoramento de efluentes em tempo real (10).

O uso do termo biossensor iniciou-se no fim da década de 70, apesar dos biossensores terem sido utilizados antes dessa data (11). O primeiro biossensor, conhecido como eletrodo de enzima, demonstrado em 1962 por Clark e Lyons (12), foi produzido pela imobilização da glicose oxidase em um eletrodo amperométrico concentração de O_2 . Em 1977, Rechnitz *et al.* (13) imobilizaram organismos vivos na superfície de um sensor gasoso de amônia e o chamaram de sensor bio-seletivo (“*bio-selective sensor*”). Após certo tempo, o nome sensor bio-seletivo foi abreviado para biossensor (*biosensor*), que segundo a definição da IUPAC (14), é um aparato que utiliza reações mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos, normalmente por meio de sinais elétrico, térmicos ou ópticos. O processo de reconhecimento do composto químico pode ocorrer por meio de ligação química (por afinidade química, quando o elemento é, por exemplo, um anticorpo, um pedaço de DNA ou um segmento de célula), ou por biocatálise (biossensor enzimático) (11). Na Figura 3 pode ser visto um esquema de biossensor e as suas partes constituintes.

Figura 3. Figura esquemática de tipos de biossensores e seus mecanismos de reconhecimento molecular e os detectores mais amplamente utilizados (adaptada de NAKAMURA & KARUBE, 2003).

Um biossensor compreende um elemento de reconhecimento molecular conectado ou integrado a um transdutor, um amplificador de sinais e um equipamento de medidas (3). Normalmente, os biossensores são classificados de acordo tipo de transdutor utilizado, sendo os mais utilizados em biossensores os eletroquímicos, ópticos, opto-eletrônicos, térmicos e piezelétricos (15).

1.5.1 Biossensores eletroquímicos

Quando comparamos com os biossensores ópticos e de massa, os biossensores eletroquímicos são mais atrativos por uma alta capacidade de detecção e uso de experimentos simples e de baixo custo (16). Existem três tipos básicos de biossensores eletroquímicos: potenciométricos, amperométricos e condutométricos. Nos biossensores potenciométricos são

utilizadas as variações de potencial elétrico em relação à concentração de um analito; nos amperométricos são medidas as variações da corrente elétrica em relação à concentração do analito; nos condutométricos são medidas as variações das condutividades elétricas produzidas por reações de oxidação e redução sobre a superfície do transdutor. Dentre estes, os biossensores amperométricos e potenciométricos se destacam pela ampla margem de detecção dos analitos, simplicidade, baixo custo e rápido tempo de resposta, porém, eles podem apresentar como limitação o bloqueio gradual da superfície dos substratos durante a realização das análises (17).

1.5.2 Biossensores enzimáticos

Os elementos de reconhecimento molecular em biossensores são divididos em dois tipos, os catalíticos e os de afinidade química. O primeiro tipo inclui enzimas, organelas, células animais e vegetais. O segundo tipo inclui anticorpos, receptores e ácidos nucleicos. Dentre os biossensores catalíticos, destacam-se os biossensores enzimáticos pela alta estabilidade, longo tempo de vida e a termoestabilidade (18).

Enzimas são proteínas que manipulam outras moléculas (substratos enzimáticos) catalisam reações químicas em sistemas vivos. Os substratos enzimáticos se ligam ao sítio ativo da enzima e são transformados em produtos, através de um ciclo de reações conhecido como mecanismo enzimático, no final do qual a enzima é recuperada. A catálise enzimática é extremamente eficiente e seletiva, tais propriedades permitem que métodos analíticos baseados em detectores enzimáticos, como biossensores, tenham alta seletividade e sinal de resposta intenso do analito.

A eficiência dos biossensores enzimáticos depende, em parte, do modo de imobilização enzimática. O método de imobilização deve permitir o contato íntimo entre o analito e a enzima, além de manter (ou melhorar) a estabilidade enzimática (19)

1.5.3 Métodos de imobilização enzimática

Há diversas maneiras de imobilizar as enzimas em substratos para a fabricação de biossensores. O método escolhido de imobilização depende primeiramente da natureza do substrato no qual a enzima será imobilizada. Uma maneira simples de imobilização enzimática é por encapsulamento da solução enzimática em um determinado material auto-suportado, como um filme polimérico depositado sobre um eletrodo ou um eletrodo de pasta de carbono. A enzima pode ser encapsulada durante a eletrossíntese de um polímero condutor, ficando adsorvida fisicamente ou imobilizada quimicamente ou imobilizada com um agente que promova ligações cruzadas, tal como o glutaraldeído (19).

O processo de imobilização da enzima em determinado eletrodo pode alterar o seu comportamento apresentado em solução homogênea. Parâmetros tais como pH e temperatura ótima de funcionamento, cinética química, dentre outros, podem sofrer variações quando a enzima é imobilizada. As modificações na superfície do substrato no qual a enzima é imobilizada são utilizadas para melhorar o desempenho dos biossensores (3), tal como o uso de SAMs compostas por dois ou mais tipos de compostos químicos usadas para modificar as superfícies.

Em nosso trabalho, a imobilização enzimática foi feita quimicamente conforme apresentada na Figura 3.

Figura 3. Esquema da imobilização química por ativação do grupo carboxílico terminal do 3-ácido mercaptopropiônico (MPA).

O processo de imobilização da polifenoloxidase (PFO) (tirosinase) nos substratos de Au modificados com 3-ácido mercaptopropiônico (MPA) consistiu na ativação do grupo carboxílico terminal do MPA na presença de hidróclorato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e pentafluorfenol (PFP). Após a ativação química do MPA, a terminação carboxílica se ligou a grupos amina presente na PFO (20).

A escolha deste modelo de imobilização foi feita tendo como base o fato de o extrato bruto enzimático conter outras substâncias em sua constituição e que poderiam modificar o comportamento da PFO em relação ao biossensores produzido com a enzima purificada. Como após a ativação do grupo carboxílico só ocorre a imobilização de substâncias que apresentam grupos amina, utilizamos este tipo de imobilização para evitar que outros compostos que não apresentam grupos amina fossem imobilizados juntamente com a PFO.

1.6 Polifenoloxidase (tirosinase)

A polifenoloxidase (PFO), ou tirosinase, foi assim denominada porque a tirosina foi o seu primeiro substrato. A PFO foi descoberta em 1895, quando Bourquelot e Bertrand

observaram o aparecimento de uma coloração escura no cogumelo após ter sido colocado em presença de tirosina (21) (22).

A PFO, também conhecida como catecoloxidase, catecolase e cresolase, é uma metaloenzima cúprica monoxigenase binuclear, que é encontrada na natureza ao longo da escala filogenética, de bactérias aos mamíferos, fazendo parte de grande número de reações biológicas. A PFO pode ser encontrada em vegetais, frutas e cogumelos, e é a enzima chave para o escurecimento das frutas amassadas, cortadas, trituradas, ou armazenadas por longo período de tempo (23). É conhecido que a PFO pode ser obtida na forma de extrato bruto de frutas e vegetais que apresentam a enzima (24), como uma opção à dificuldade de se obter a PFO na sua forma purificada, por seu alto custo e tempo de espera, já que no nosso país os materiais importados chegam a demorar meses para chegarem ao destino.

No Brasil, o grupo do Prof. Orlando Fatibello Filho do DQ/UFSCar tem se destacado por seus trabalhos com enzimas extraídas de produtos vegetais, que são usualmente imobilizadas em eletrodos de pasta de carbono. A extração enzimática da PFO normalmente é feita pela homogeneização do tecido vegetal que contém a enzima e separação da fase líquida é feita após a filtração e centrifugação do homogenato (24).

A PFO catalisa a *o*-hidroxilação de monofenóis para a forma de *o*-difenois (atividade cresolatase) e a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas (atividade catecolase), ou ambas se houver presença de O₂ que é utilizado como aceptor de elétrons (25), como pode ser visto na

Figura 4.

O uso da PFO em biossensores amperométricos baseia-se na detecção amperométrica redutiva das espécies quinonas liberadas (10). Como um dos herbicidas mais utilizados no mundo é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cujo principal produto de sua degradação é o 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), e que pode ser detectado em amostras de solo, água, alimentos, etc., por técnicas analíticas usuais [ref. Química nova], é de interesse o uso de biossensores à

base da PFO. Pesticidas deste tipo podem ser detectados pela inibição da resposta da PFO, que provoca variações nos sinais amperométricos do eletrodo enzimático.

Figura 4. Mecanismo de catalisação enzimática do fenol para o-quinona pela PFO na presença de H_2O

1.7 Análise de injeção por fluxo

Todas as análises em um laboratório químico envolvendo materiais líquidos demandam as operações de preparo de solução, detecção de analitos, coleta e processamento dos dados. Em se tratando de preparo de soluções, torna-se obrigatório o uso de mão de obra especializada, pois o preparo de solução não é uma tarefa que pode ser facilmente automatizada. Com base nestas informações, é lógica a tentativa de diminuir o volume de soluções utilizados em análises e assim facilitar o emprego de técnicas analíticas em locais onde não há a disponibilidade de pessoal qualificado, ou ainda, substituir o emprego de pessoas em tarefas de risco. A diminuição do material utilizado em análises tem um papel implica em diminuir o custo operacional de um laboratório, redução do consumo de material

necessário para a análise e do volume de resíduos de despejo do laboratório (26) (27) (28). Atualmente, a diminuição do consumo de material e da produção de resíduo químico é de grande importância pela própria escassez e alto custo de algumas matérias primas, pelas legislações exigentes com a qualidade de água despejada em efluentes e pelo custo do tratamento de água para seguir tais padrões (29).

Um sistema de injeção em fluxo (FIA) consiste em um processo no qual a detecção do analito ocorre de maneira ininterrupta em um fluxo constante de um líquido ou gás. As amostras a serem analisadas são injetadas diretamente no mesmo percurso do fluxo do líquido de maneira serial. A solução de analito é arrastada até o detector pelo fluxo contínuo de líquido (27). A aparelhagem de um sistema FIA é feita de maneira a minimizar a quantidade de material necessário para a análise pelo uso de tubos de espessuras pequenas, volume pequeno na câmara de detecção e pela necessidade de apenas pequenas alíquotas a detecção (normalmente menores que 500 μL). O sistema FIA pode ser automatizado para se fazer as injeções automaticamente e, em alguns casos, permitindo a análise de alíquotas muito pequenas, as quais não poderiam ser analisadas com as técnicas analíticas convencionais.

Com o uso de sistemas FIA diminuimos o consumo de materiais químicos, vidrarias, tempo de preparo de grandes quantidades de solução e a limpeza das vidrarias utilizadas, de transferência de soluções entre frasco (principal causa de contaminação durante análises), tempo de espera de reação e a estabilização do detector. Após a otimização do detector, da geometria do sistema e das condições hidrodinâmicas de um sistema de FIA, as únicas operações a serem feitas são garantir as injeções de analito no fluxo, leitura e interpretação dos dados obtidos (26).

O uso de sistemas de FIA em conjunto com biossensores facilita a detecção de certos analitos, como casos onde era necessária a separação das substâncias interferentes ao analito

através do uso de colunas cromatográficas, pois a alta seletividade do biossensor dispensa a separação de elementos que interferiam anteriormente, o uso de biossensores com a (30).

1.8 Perfilometria

Uma das técnicas mais simples que pode ser utilizada no estudo de superfícies é a perfilometria, esta técnica é muito utilizada na caracterização de deposição de filmes finos. Existem dois tipos de perfilometria, sem contato físico (perfilometria ótica) e com contato físico com a superfície do material analisado (31).

O princípio da perfilometria de contato é uma ponta móvel sobre um eixo de detecção que realiza movimentos verticais detectados pelo aparelho, quando há contato físico da ponta de análise com o material. Os dados de distancia verticais e horizontais são convertidos em dados numéricos, que contem a descrição em duas dimensões da superfície analisada (perfil). A perfilometria de contato se destaca por ser uma técnica de baixo custo, direta e reprodutível, que pode ser utilizadas em diversos tipos de materiais. Suas desvantagens estão no fato da técnica ser limitada pelo tamanho da ponta utilizada na detecção e pelo fato de que o contato físico poder provocar distorção no material durante a análise (32).

2 *Procedimento Experimental*

2.1 Materiais

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato 283 da EG&G Instruments e o software utilizado para o controle das medidas foi o TSR GSS 2.15. Foi utilizada uma célula eletroquímica de análise por injeção em fluxo de teflon produzida nos nossos laboratórios. O fluxo foi controlado pela diferença da força gravitacional entre o ponto de entrada da solução de arraste e o ponto de saída do descarte. Os eletrodos de trabalho foram lâminas de vidro metalizadas com Au e com uma camada de adesão de Cr em uma evaporadora Auto 306 da Edwards, o eletrodo de quase-referência foi um fio de Ag e o contra eletrodo, uma lâmina de Pt.

Durante a extração enzimática foi utilizada uma centrífuga Sorvall RC6 da DuPont e um liquidificador L.S. de 300 W da Arno. A análise perfilométrica dos molders de GaAs e PDMS foi feita utilizando perfilometro Dektak 150 da Veeco. As medidas de atividade enzimática foram feitas utilizando um espectrofotômetro U-2900 da Hitachi. Os reagentes utilizados nos experimentos foram: ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA) ($\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, Aldrich), polifenoloxidase (PFO), BioChemika, catecol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{-1,2-(OH)}_2$, iMallinckordt), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCL}$, Fluka), pentafluorfenol (PFP) ($\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, Aldrich), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMS) ($((\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3$, Aldrich), Polyclar 10 (ISP), base elastomérica de silicone 184 (poli(dimetilsiloxano), PDMS) e um agente de cura elastomérica 184, Sylgard. Os demais reagentes apresentavam grau analítico e foram utilizados conforme recebidos. A água

ultrapura foi obtida através do sistema Mili-Q de purificação de água da marca Milipore Inc., e possuía resistividade maior que $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos substratos de Au

Os substratos de Au foram preparados por evaporação em lâminas de vidro de 1,5 cm x 3,0 cm. Para garantir uma melhor adesão do Au, as lâminas de vidro foram lavadas com detergente e água a 80 °C por 1 h, enxaguadas em água destilada, submergidas em solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 1:1) durante 30 min, enxaguadas com água ultrapura em abundância e secas com jatos de nitrogênio comprimidos. A metalização das lâminas de vidro foi feita em uma evaporadora Edwards Auto 306 a uma pressão de 10^{-6} Torr.

2.2.2 Preparação das soluções enzimáticas

A solução de tirosinase purificada foi preparada em uma solução tampão fosfato (0,05 mol L^{-1} / pH 7,0) com uma concentração de enzimas de aproximadamente 1 mg mL^{-1} , a solução foi homogeneizada em banho de ultrassom por 15 min e armazenada a 4 °C para posterior uso. A solução do extrato bruto de abacate *Persea Americana* foi preparada pela

homogeneização de 25,0 g da polpa do abacate, 2,5 g de agente protetor Polyclar 10 (ISP), 100 mL de solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ / pH 7,0) a 4°C em um liquidificador por 3 min na potência máxima. A suspensão resultante foi filtrada em 3 camadas de gaze hospitalar e centrifugada a 15000 rpm a 4°C em uma centrífuga por 30 min. Após a centrifugação, a solução sobrenadante (extrato bruto) foi retirada e armazenada a 4°C para posterior uso (33).

2.2.3 Caracterização das soluções enzimáticas

As soluções enzimáticas foram analisadas em um espectrofotômetro U-2900 (Hitachi) visando determinar o comprimento de onda ideal para o estudo cinético e se obter a atividade enzimática das soluções de PFO purificada e na forma de extrato bruto de abacate. Durante a varredura de comprimento de onda, foram adicionados 2,8 mL de solução de catecol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / pH 7,0) e 0,2 mL da solução enzimática. Após o término da reação (aproximadamente 15 min) as medidas foram feitas. Para se obter a atividade enzimática, foi utilizada uma solução contendo 2,8 mL de catecol (0,1 M) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / pH 7,0) e 0,2 mL de solução enzimática (33) A análise foi feita no comprimento de onda de máxima absorção, obtida na análise anterior. Os volumes das soluções foram misturados e rapidamente adicionados ao espectrofotômetro para a medida da variação de absorção de luz em relação ao tempo.

2.2.4 Preparação do Molde Polimérico

O molde polimérico utilizado na técnica de impressão por microcontato (μ CP) foi produzido utilizando um molde de arseneto de gálio (GaAs) contendo trilhas paralelas de 10 μ m (molde mestre) (Figura 5).

Figura 5. Molde mestre de GaAs com trilhas paralelas de 100 μ m.

Para remover as substâncias orgânicas aderidas à superfície, o molde de GaAs foi limpo em um banho de acetona a quente, seguido de um banho de álcool isopropílico a quente e seco em jato de nitrogênio. Para que não ocorresse a adesão do molde de PDMS ao molde de GaAs após a cura polimérica, foi feita a silanização da superfície do molde de GaAs, que foi estocado em um frasco selado hermeticamente na presença de hexametilsiloxano (HMS) durante 12 h. (6) A fabricação do molde de PDMS foi feita com uma mistura 19:1 (m/m) de base elastomérica de silicone 184 e agente de cura elastomérica 184, respectivamente, ambos da Sylgard. A mistura foi colocada sobre a superfície do molde mestre silanizado recobrimdo-o; após esta etapa, o substrato foi colocado em uma estufa a 60 °C por 3 h para que houvesse a cura polimérica. Após a cura do polímero, o molde de PDMS foi retirado do molde mestre, recortado de maneira apropriada para o uso com a técnica de μ CP e armazenado para posterior uso. O molde de PDMS foi deixado em álcool isopropílico por 30 min e seco em nitrogênio para a retirada de impurezas da superfície antes de ser utilizado na técnica de μ CP.

2.2.5 Análise da confiabilidade estrutural do molde de PDMS

Com o objetivo de observar o grau de fidelidade da réplica de PDMS obtida pelo uso do molde de GaAs, foram realizadas medidas de perfilometria em ambas peças, percorrendo o comprimento de varredura de cerca de 600 μm , quando se mediu a altura h do perfil em função da distância l na direção do padrão oscilatório.

2.2.6 Modificação da superfície do substrato de ouro

Os substratos de Au foram limpos em uma solução piranha diluída ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ 3:2:5 v/v) por 1 min, enxaguados em água ultrapura e colocados em álcool etílico para a remoção de óxidos superficiais. (1) A modificação da superfície foi feita transferindo o ácido mercaptopropiônico (MPA) para o molde de PDMS com uma haste plástica com ponta de algodão umedecida em solução etanólica de MPA (3 mM). O molde PDMS/MPA foi colocado em contato físico com o substrato de Au por cerca de 10 s. Os substratos Au/MPA foram enxaguados em álcool etílico e água ultrapura em abundância para a remoção do excesso de MPA e depois, secos com jatos de nitrogênio.

2.2.7 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática foi feita nos substratos modificados de Au/MPA utilizando pentafluorfenol (PFP) e carbodiimida (EDC). Os substratos foram submergidos em solução etanólica de EDC e PFP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente) durante 15 min, enxaguados em etanol e água ultrapura em abundância, secos em jatos de nitrogênio e colocados nas soluções enzimáticas preparadas anteriormente por 10 min. Para a remoção do excesso de PFO, os substratos modificados foram limpos em banho ultra-sônico de água ultrapura por 5 min, enxaguados e secos com jatos de nitrogênio (20). Após a imobilização, os substratos foram armazenados em uma solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /pH 7,0) a 4°C .

2.2.8 Caracterização eletroquímica dos biossensores

A caracterização eletroquímica dos biossensores foi feita pelo uso de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e uma cela eletroquímica própria para o FIA, ambos produzidos em nosso grupo de pesquisa (Figura 6).

Figura 6. Esquema básico do sistema de FIA utilizado nos experimentos.

O sistema de fluxo foi lavado em um banho de permanganato de potássio por 12 h, seguido por um banho de peróxido de hidrogênio estabilizado com H_2SO_4 e por enxágue com água ultrapura. O contra eletrodo e o eletrodo de referência foram polidos para retirar as impurezas superficiais e diminuir a área superficial. A primeira etapa das análises eletroquímicas consistiu na obtenção do potencial de oxidação máximo do catecol na presença da PFO. Tal experimento foi realizado pela técnica de voltametria cíclica entre -0,2 mV e 0,3 mV, com velocidade $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$ vs Ag sob uma injeção de 400 μL de catecol ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em uma solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ /pH 7,0) com o fluxo do sistema interrompido. Tendo o valor do potencial máximo de oxidação do catecol, passamos para as medidas de cronoamperometria. As análises cronoamperométricas foram feitas a partir do potencial obtido nas voltametrias cíclicas, sendo o fluxo do sistema ativado com uma solução de arraste tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) no mesmo pH das soluções injetadas. Com esses parâmetros, fizemos cronoamperometrias seguidas com soluções de catecol ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em uma solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com uma variação de pH partindo de 5,8 até 7,2 com acréscimo de 0,2 entre as análises. Todas as injeções com volume de 400 μL foram feitas em triplicata.

Após as análises dos resultados, obtivemos o pH ótimo de funcionamento dos biossensores com a enzima purificada e na forma de extrato bruto de abacate. Com o resultado do pH ótimo de funcionamento dos biossensores, fizemos novas cronoamperometrias, variando a concentração de catecol para obter os limites de detecção máximo e mínimo de concentração para ambos os biossensores.

3 *Resultados e discussão*

3.1 **Determinação da atividade enzimática das soluções de PFO**

A determinação do comprimento de onda ideal para o estudo cinético da enzima (PFO) revelou que a quinona, formada durante a reação de catálise enzimática do catecol, apresenta uma maior absorção de luz no comprimento de onda (λ) de 410 nm.

A comparação das atividades enzimáticas para as duas soluções enzimáticas (enzima pura e na forma de extrato bruto) foi feita calculando as unidades de enzima ativa (UA) por mililitro de solução. Uma UA é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas na seção 2.2.3 (33)[1].

$$A = \frac{\Delta ABS \cdot 1000 \cdot 60}{\Delta t \text{ (s)}} \quad [1]$$

Para a obtenção da atividade enzimática, utilizou-se a equação de seção reta nos gráficos Abs vs tempo (Figura 7), que nos permitiu obter os valores de 479 e 259 UA mL⁻¹ para a solução de enzima purificada e de extrato bruto, respectivamente.

Figura 7. Estudo da cinética química das soluções de PFO **a)** purificada e **b)** como extrato bruto com as respectivas equações das regiões lineares e os coeficientes de determinação.

Na Figura 7 observa-se que a enzima na forma de extrato bruto tem uma resposta cinética similar à obtida para a enzima purificada. Assim, pode-se dizer que a reação enzimática ocorre apenas com substratos específicos e que a presença de possíveis impurezas no extrato bruto não interfere significativamente na reação enzimática. A diferença nos coeficientes angulares para as Figuras 8a e 8b se justifica pelo fato de a solução de enzima purificada apresentar uma maior concentração de enzimas ativas em comparação à solução de extrato bruto.

3.2 Confiabilidade estrutural do molde elastomérico em relação ao molde mestre

As medidas de perfilometria foram realizadas com o objetivo de comparar os perfis do GaAs e do PDMS e verificar a confiabilidade da réplica. Na Figura 8 temos o perfil do molde de GaAs e o perfil da réplica de PDMS. Os resultados mostram que a réplica reproduz muito bem o molde, tanto em amplitude da oscilação quanto na frequência.

Figura 8. Comparação entre os perfis do molde mestre de GaAs e do molde elastomérico de PDMS e o desvio relativo entre eles.

Utilizando estes resultados, calculamos o desvio relativo entre molde e réplica. Este cálculo foi feito somando os dois perfis e nivelando a medida pelo valor médio do desvio. Em

um caso ideal, teríamos um resultado nulo em todo o comprimento de varredura, mas no nosso caso, embora o desvio chegue a valores próximos a 40% na amplitude do perfil (picos no gráfico vermelho da Figura 8) nas regiões onde há muita variação de altura, observamos que o mesmo é pequeno nas regiões dos vales do molde. Assim, podemos considerar que o processo de réplica é mais eficiente nos picos do que nas bordas do molde.

O desvio observado na Figura 8 pode ser atribuído ao fato de o molde de GaAs ter sido preparado por ataque químico. Além disto, a perfilometria do molde de GaAs foi feita após inúmeras réplicas de PDMS terem sido feitas e, ainda, ao fato das regiões analisadas durante a perfilometria terem sido diferentes.

Durante a preparação do molde de GaAs, as bordas do molde são afetadas de maneira diferente em relação às superfícies polidas, pois o ataque químico provoca degradação do material a taxas distintas nos diferentes planos cristalográficos. Como resultado, o molde apresenta pequenos defeitos pontuais nas bordas e vales. Na Figura 8 nota-se que nas regiões do molde de GaAs que sofreram pouco ataque químico (picos), a rugosidade é menor. A perfilometria foi feita após o molde de GaAs (molde mestre) ter sido utilizados diversas vezes e isto pode ter provocado um acúmulo de impurezas, que foram notadas durante a análise de perfilometria. Tais impurezas causaram pequenas diferenças no molde mestre a cada réplica. Como as regiões analisadas durante a perfilometria do GaAs não foram as regiões espelhadas correspondentes no molde de PDMS, isto fez com que os defeitos pontuais em ambos os moldes causassem um erro ainda maior na comparação dos respectivos perfis.

3.3 Caracterização eletroquímica dos biossensores

3.3.1 Determinação dos potenciais de oxidação dos biossensores

A técnica de voltametria cíclica pode ser utilizada para se comprovar a imobilização química da enzima no substrato modificado e verificar se a enzima mantém a sua atividade enzimática após a imobilização. A resposta voltamétrica de ambos os biossensores na presença de catecol é apresentada na Figura 9.

Figura 9. Voltametrias cíclicas dos eletrodos de Au modificados com MPA e a enzima imobilizada quando na forma purificada e de extrato bruto em presença de catecol $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0.

Os pontos máximos e mínimos de densidade de corrente (J) observados em ambos os voltamogramas correspondem aos picos de oxidação e redução do catecol, respectivamente, e que ocorrem em valores relativamente próximos, 365 e 418 mV vs QRE-Ag para os biossensores com extrato bruto e enzima purificada, respectivamente. A diferença entre tais potenciais pode ser explicada por uma possível presença de impurezas imobilizadas juntamente com a PFO para o extrato bruto. A imobilização química das enzimas nos eletrodos de Au foi feita utilizando soluções de EDC e PFP (seção 2.2.7) que promovem a

ativação do grupamento carboxílico do MPA e a posterior ligação a um grupo amina (20). Como na solução de extrato bruto é esperada a presença de impurezas com grupos amina, estas devem ter sido imobilizadas no eletrodo junto com a PFO, podendo assim interferir nas respostas dos biossensores em relação ao eletrodo com a enzima purificada, que não apresenta impurezas.

A variação da densidade de corrente para os processos de oxidação e redução entre os biossensores, e notada na Figura 9, justifica-se, portanto, pela diferença entre a quantidade de enzimas ativas presentes nos biossensores. Além disto, os dois tipos de biossensores possuem diferentes valores de pH ótimos de funcionamento; o valor de pH 7,0 é o mais favorável para o funcionamento do biossensor produzido com a enzima na forma de extrato bruto, como será visto adiante Figura 11.

3.3.2 Determinação do pH ótimo de funcionamento dos biossensores

A determinação do pH ótimo de funcionamento dos biossensores foi possível por meio de injeções de catecol a diferentes pH em triplicata à célula eletroquímica durante experimentos de cronoamperometria com um sistema de FIA. As respostas eletroquímicas obtidas podem ser vistas na Figura 10.

Figura 10. Respostas típicas de cronoamperometria para um sistema de FIA para ambos os biossensores com injeções de catecol a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nos respectivos pHs ótimos de funcionamento.

Para a análise dos resultados, os valores de densidades de corrente foram convertidos em uma tabela de dados (Tabela 1 e Tabela 2) e um gráfico de variação de pH em relação à variação da densidade de corrente (Figura 11).

Tabela 1. Variações de densidade de corrente das injeções de catecol, para os diferentes pHs, valores médios e desvios padrões obtidos pelas análises de cronoamperometria dos biossensores de extrato bruto em $\mu\text{A cm}^{-2}$.

pH	5,60	5,80	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40
Injeção 1	2,91	3,72	4,76	6,74	7,20	7,46	8,36	9,52	9,91	9,54
Injeção 2	2,84	3,58	4,76	6,57	7,30	7,19	8,38	9,25	10,06	8,83
Injeção 3	2,99	3,51	4,74	6,48	7,14	7,90	8,49	9,12	9,60	8,81
Média	2,92	3,60	4,75	6,60	7,21	7,52	8,41	9,29	9,86	9,06
Desvio Padrão	0,08	0,10	0,01	0,13	0,08	0,36	0,07	0,20	0,24	0,41

Tabela 2. Variações de densidade de corrente das injeções de catecol, para os diferentes pHs, valores médios e desvios padrões obtidos das análises de cronoamperometria dos biossensores de enzima purificada em $\mu\text{A cm}^{-2}$.

pH	5,60	5,80	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40
Injeção 1	8,75	10,22	9,62	16,69	16,78	19,01	19,85	19,24	18,12	15,81
Injeção 2	8,05	9,62	9,79	16,80	16,01	17,58	20,11	17,35	18,68	16,09
Injeção 3	8,81	9,59	9,33	14,88	18,69	17,15	18,79	18,32	18,12	16,53
Média	8,54	9,81	9,58	16,12	17,16	17,91	19,58	18,30	18,31	16,14
Desvio Padrão	0,42	0,36	0,23	1,07	1,38	0,97	0,70	0,94	0,32	0,36

Figura 11. Gráficos da otimização de pH dos biossensores fabricados a partir das enzimas purificadas e na forma de extrato bruto de abacate..

Comparando-se os dados das Tabelas 1 e 2 com a Figura 11, nota-se que as densidades de corrente média obtidas para o biossensor de enzima purificada, em pH 6,0, têm um diferente comportamento se comparadas com o restante das medidas. Como o desvio padrão relativo a esse ponto médio é pequeno, a divergência deste ponto em relação à curva final de pH foi considerado como um erro relacionado à preparação da solução. Este erro foi corrigido durante a análise de otimização de pH do extrato bruto. A divergência deste ponto em relação à curva final promoveu uma distorção muito grande no gráfico de pH ótimo de funcionamento de extrato bruto; por essa razão, este ponto não foi considerado durante a produção da curva do pH ótimo de funcionamento do biossensor de enzima purificada, apesar de estar representado na Figura 11.

Durante os experimentos de cronoamperometrias, para alguns valores de pHs (6,2, 6,4, e 7), notou-se que a variação da densidade de corrente era maior do que em outros pHs. Assim, foram feitas novas injeções (além das três previstas) para se determinar se a causa de tal variação era inerente às próprias características do biossensor ou era devido a algum erro

analítico (como uma variação no volume de solução injetado). Como a variação nas respostas de densidade de corrente continuou com o mesmo padrão notado durante a triplicata, ela foi considerada como inerente ao biossensor, assim, as injeções sobressalentes não foram consideradas durante os cálculos da curva final de pH para se manter o mesmo método de análise utilizado para os outros pHs. Como resultado final, obtivemos os valores de pHs ótimos de funcionamento como pH 7,0 e 7,2 para os biossensores produzidos com enzima purificada e extrato bruto, respectivamente.

3.3.3 Determinação dos parâmetros de validação dos biossensores

A determinação dos parâmetros de validação dos biossensores é de suma importância para se verificar se os biossensores em estudo podem ser utilizados como uma ferramenta analítica confiável para a determinação de analitos, no nosso caso, catecol em meio aquoso. Esta resposta se baseia em algumas normas NBR 17025 (34), tais como de determinação da faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite quantificação, sensibilidade, precisão, repetitividade e reprodutibilidade.

Assim como feito na determinação do pH ótimo de funcionamento dos biossensores, os dados obtidos através das cronoamperometrias sucessivas foram transformados em tabelas (Tabela 3 e Tabela 4) e gráficos (Figura 12 e Figura 13).

Tabela 3. Variação de densidade de corrente (ΔJ , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) das injeções de catecol a concentrações e pH 6,8 durante as cronoamperometrias para o biossensor produzido com enzima purificada e as respectivas médias e desvios padrão.

Concentração (mol L ⁻¹)	2,5x10 ⁻⁶	5,0x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁶	1,0x10 ⁻⁵	2,5x10 ⁻⁵	5,0x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻³	0,01	0,1
Injeção 1	0,019	0,039	0,042	0,049	0,22	0,32	0,33	0,56	1,34	2,40	5,44	49,84	162,26
Injeção 2	0,015	0,032	0,041	0,050	0,20	0,32	0,34	0,44	1,31	2,85	7,10	46,89	150,00
Injeção 3	0,014	0,035	0,046	0,048	0,20	0,28	0,36	0,43	1,33	2,42	6,18	48,20	158,00
Média	0,016	0,035	0,043	0,049	0,20	0,31	0,34	0,48	1,33	2,56	6,24	48,31	156,75
Desvio Padrão	0,003	0,004	0,003	0,001	0,01	0,02	0,02	0,07	0,02	0,25	0,83	1,48	6,22
Desvio Padrão Relativo	15,89%	9,94%	6,15%	1,34%	5,18%	6,66%	4,83%	14,34%	1,15%	9,94%	13,29%	3,06%	3,97%

Tabela 4. Variação de densidade de corrente (ΔJ , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$), das injeções de catecol a concentrações à diferentes concentrações e pH 7,0, durante as cronoamperometrias de caracterização do biossensor produzido com extrato bruto, e as respectivas médias e desvios padrão.

Concentração (mol L ⁻¹)	2,5x10 ⁻⁶	5,0x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁶	1,0x10 ⁻⁵	2,5x10 ⁻⁵	5,0x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻³	2,5x10 ⁻³	5,0x10 ⁻³	7,5x10 ⁻³	0,01	0,1	1
Injeção 1	0,0099	0,0203	0,044	0,058	0,117	0,217	0,312	0,506	1,57	3,00	4,01	5,44	13,3	20,5	27,4	37,1	54,8	75,0
Injeção 2	0,0096	0,0206	0,049	0,050	0,121	0,229	0,318	0,515	1,64	2,95	4,07	5,40	12,8	22,5	26,4	36,5	57,0	
Injeção 3	0,0100	0,0207	0,041	0,052	0,120	0,227	0,338	0,516	1,79	3,00	4,13	5,57	12,9	22,3	27,8	38,7	54,1	
Média	0,0098	0,0205	0,045	0,053	0,119	0,224	0,323	0,512	1,67	2,98	4,07	5,47	13,0	21,7	27,2	37,4	55,3	75,0
Desvio Padrão	0,0002	0,0002	0,004	0,004	0,002	0,007	0,014	0,006	0,11	0,03	0,06	0,09	0,2	1,1	0,7	1,1	1,5	
Desvio Padrão Relativo	2,12%	1,01%	9,19%	7,11%	1,77%	2,90%	4,22%	1,07%	6,78%	0,95%	1,43%	1,68%	1,87%	5,01%	2,54%	3,03%	2,74%	

Os valores de desvio padrão relativo e de desvio padrão relativo médio (a precisão) para os biossensores não mudaram de maneira significativa, como pode ser observado na Tabela 3 e na Tabela 4. Os valores de desvio padrão relativo médio para os biossensores de enzima purificada e de extrato bruto foram 7,37% e 3,26%, respectivamente. Assim, estas diferenças sutis podem ser associadas a pequenos erros analíticos, tais como no preparo de soluções, devido ao pequeno volume de soluções, e pela própria aparelhagem do sistema FIA.

As curvas de calibração dos biossensores apresentaram o comportamento usual de curvas de calibração analíticas C (concentração) vs. sinal (35), com uma faixa de trabalho linear seguida de um ponto de saturação do detector, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12. Curva de calibração analítica dos biossensores para concentrações de $2,5 \times 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, coeficientes de determinação e fórmulas relativas às regressões lineares, em escalas lineares.

O comportamento dos dois tipos de biossensores com o aumento da concentração de catecol se mostrou similar, com uma única divergência na região de saturação. O biossensor com extrato bruto enzimático iniciou a saturação em concentrações ligeiramente mais baixas e este comportamento pode estar associado a um menor número de enzimas ativas imobilizadas para este tipo de biossensor (sessões 3.1 e 3.3.1).

Visando melhorar a análise dos resultados, modificamos as escalas x e y dos gráficos de linear para logarítmica, desta maneira, os pontos dos gráficos que tinham sido feitos por meio de incrementos logarítmicos de concentração, puderam ser analisados mais facilmente, como pode ser notado comparando-se a Figura 12 e a Figura 13.

Figura 13. Curva de calibração analítica dos biossensores para concentrações de $2,5 \times 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e coeficientes de determinação das regressões lineares, em escalas logarítmicas.

A faixa linear de trabalho foi obtida por meio de regressão linear dos gráficos de C vs J quando foram obtidos os coeficientes de determinação (R^2) de 0,9863 e 0,9945 para os biossensores de extrato bruto e de enzima purificada, respectivamente, no gráfico na escala linear e 0,9980 e 0,9990 no gráfico na escala logarítmica (Figura 12 e Figura 13).

A sensibilidade dos biossensores (m) determinada pelo coeficiente angular das faixas lineares de trabalho (35), foi de 5211,55 e 4935,61 para os biossensores de enzima purificada e extrato bruto, respectivamente (Figura 12). Assim, um pequeno incremento na concentração resulta em uma grande variação na densidade de corrente.

O R^2 da regressão linear do gráfico na escala logarítmica foi maior do que o R^2 do gráfico da escala linear, com isto, a confiabilidade das medidas foi aumentada com o uso da

escala logarítmica para maiores concentrações de catecol, onde ocorre uma maior divergência entre a faixa linear de trabalho e os pontos das medidas experimentais. Porém, nota-se que se assumimos o uso da escala logarítmica, a sensibilidade dos biossensores diminui. Podemos, então, utilizar ambas as escalas durante a análise de detecção, adotando a escala linear para concentrações entre $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a escala logarítmica para concentrações entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

O limite de detecção (LD), expresso como C_L , corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada em termos de sinal limite (x_L , para o procedimento analítico descrito nesse trabalho, J_L) e que é estatisticamente diferente do branco analítico para um dado procedimento analítico (14). O valor de J_L e C_L são dados pelas equações 2 e 3, respectivamente.

$$J_L = \bar{J}_B + k S_B \quad [2]$$

$$C_L = \frac{(J_L - \bar{J}_B)}{m} \quad [3]$$

Onde J_L é a densidade de corrente limite, $\bar{J}_B$ é a densidade de corrente média do branco, S_B é o desvio padrão do branco, k é um fator que determina o nível de confiança desejado e m é sensibilidade analítica. Segundo as normas da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), o valor de k recomendado é três, que permite um nível de confiança de 99,86% (35) (14).

Durante a análise do branco analítico, não foi notada nenhuma variação na corrente relativa fora a leitura de fundo, assim, a média dos pontos de leitura de fundo do sistema FIA foi utilizada no cálculo da determinação da corrente relativa média e do desvio padrão do branco analíticos dos biossensores. Os valores de $\bar{J}_B$, S_B , J_L , m e C_L são mostrados na Tabela 5

Tabela 5. Valores de $\bar{J}_B$, S_B , J_L , m e C_L para os biossensores de enzima purificada e extrato bruto.

Tipo do Biossensor	$\bar{J}_B$ (nA cm ⁻²)	S_B (nA cm ⁻²)	J_L (nA cm ⁻²)	m	C_L (mol L ⁻¹)
Enzima Purificada	85,53	11,56	120,21	5211,55	6,65E-06
Extrato Bruto	143,58	8,15	168,03	4935,61	4,95E-06

Como pode ser visto na Tabela 5, os limites de detecção obtidos foram de 6,65 nmol L⁻¹ e 4,65 nmol L⁻¹ para os biossensores de enzima purificada e de extrato bruto, respectivamente. Com isto, determinamos que a faixa de trabalho para os biossensores produzidos com a enzima purificada é de 6,65 nmol L⁻¹ a 0,01 mol L⁻¹ e de 4,65 nmol L⁻¹ a 0,01 mol L⁻¹ para o biossensor de extrato bruto.

Os biossensores produzidos no presente estudo demonstraram ser reprodutíveis. No total foram produzidos três lotes de seis biossensores de cada tipo, o primeiro lote foi utilizado em testes básicos que visavam averiguar apenas a imobilização e o funcionamento de todas as técnicas que seriam utilizadas; o segundo e o terceiro lotes foram utilizados para a determinação do potencial de oxidação, do pH ótimo e para a produção da curva de calibração dos biossensores. Apesar da calibração dos biossensores ter sido produzida apenas com o uso de um lote de biossensores, todos os procedimentos se mostraram altamente reprodutíveis, pois a cada etapa de trabalho, conseguimos reproduzir os resultados obtidos anteriormente.

4 *Conclusões e Perspectivas Futuras*

O estudo de comparação entre os biossensores produzidos com o uso do extrato bruto enzimático e com a enzima purificada mostrou que apesar de ambos não terem os mesmos pontos ótimos de funcionamento (pontos de oxidação e pHs), as curvas de calibração e os limites de detecção não apresentaram diferenças significativas nas análises com o catecol.

Dos resultados analíticos comparados entre ambos biossensores, os mais importantes, para averiguar quais as diferenças que a enzima na forma de extrato bruto e na forma purificada teria no desempenho do biossensor são os parâmetro de validação, pois são esses parâmetros que determinam a faixa de trabalho e resposta eletroquímica relativa à concentração do analito.

Durante a otimização dos biossensores, percebeu-se que os pontos de oxidação do catecol durante as voltametrias cíclicas ocorreram em potenciais distintos, e que os pHs de funcionamento ótimos também foram diferentes. Esses resultados mostram que a tirosinase na forma de extrato bruto e na forma purificada, quando utilizadas como fonte enzimática para a produção de biossensores apresentam pontos ótimos de funcionamento diferentes.

A caracterização das curvas de calibração dos parâmetros de validação foi feita utilizando os respectivos pontos de oxidação e pHs ótimos de cada biossensor. Comparando os resultados, observamos que as curvas são muito similares, ambas apresentam as faixas lineares de trabalho, limites de detecção, sensibilidades e precisão muito próximos. A maior diferença que ocorreu nas medidas de caracterização dos biossensores foi na concentração de saturação, mas uma vez que a quantidade de enzimas ativas presentes no extrato bruto era menor do que na solução de enzima purificada, era esperado que a saturação do biossensor de extrato bruto ocorresse a uma concentração menor, pois a saturação do biossensor está ligada diretamente com a quantidade de enzimas ativas presentes no sistema.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho concluímos que é possível substituir a enzima em sua forma purificada pela enzima presente no extrato bruto enzimático, produzindo biossensores a um baixo custo e possibilitando sua miniaturização com o uso da técnica de impressão por microcontato.

Utilizando o presente trabalho como base, podemos iniciar pesquisas de comparação da tirosinase na forma de extrato bruto enzimático e em sua forma purificada para a detecção de outros compostos fenólicos; obtenção de mais parâmetros de funcionamento ótimo desses biossensores, como a temperatura e o tempo de vida; utilizar como analito amostras de água coletadas durante monitoramento limnológico ou monitoramento de estações de tratamento de água/resíduos/esgoto (utilização de amostras reais); comparar uso do biossensor às técnicas analíticas comumente utilizadas na detecção de compostos fenólicos; criar biossensores miniaturizados utilizando a técnica de impressão por microcontato; e com as melhorias no biossensor aqui apresentado, possibilitar a detecção de agrotóxicos em campo e em tempo real, para análises de solo ou água, como uma nova ferramenta no monitoramento ambiental.

Referências

1. CARVALHAL, R. F. *Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro*. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campinas, Campinas. 2005.
2. KARPOVICH, D. S.; BLANCHARD, G. J. Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface. *Langmuir*, v. 10, p. 3315-3322, 1994.
3. WILBUR, J. L.; WHITESIDES, G. M. *Self-assembly and self-assembled monolayers in micro and nanofabrication*. s.l. : G. Timp, 1999. p. 331.
4. XAVIER, M. G. *Polimerização da anilina e 3-metiltiofeno sobre eletrodos de ouro modificados com monocamadas automontadas de dodecanotiol*. 64 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
5. ULMAN, A. *Introduction to ultrathin organic films*. New York: Academic Press, 1991.
6. XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft Lithography. *Angewandte Chemie International*, v. 37, p. 550–575, 1998.
7. SIRRIHGHAUS, H. et. al. High-resolution inkjet printing of all-polymer transistor circuits. *Science*, v. 290, 5499, p. 5499-2123, 2000.
8. OZIN, A .G.; ARSENAULT, A. C. *Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*. s.l. : Royal Society of Chemistry, 2005. ISBN 085404664X.
9. ZHANG, S.; WRIGHT, Y.; YANG, Y. Materials and techniques for eletrochemical biosensor design and contruction. *Biosensores & Bioeletronics*, v. 15, p. 273, 2000.
10. ROSSATO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, 1, p. 77-86, 2001.

11. D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 334, p. 41-69, 2003.
12. R., CLARK J.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 334, p. 29-45, 1962.
13. RECHNITZ, G. A. et al. A bioselective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Analytical Chimica Acta*, v. 94, 121, p. 31, 1977.
14. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Compendium of chemical terminology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. ISBN 0-96758550-9-8.
15. SHARMA, A.; ROGERS, K. R. Biosensors. *Measurement Science Technology*, v. 5, p. 461, 1994.
16. STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 159, 2003.
17. FREIRE, R. S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Quimica Nova*, v. 26, p. 381, 2003.
18. NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. Special Issue Paper.
19. WANG, Joseph. *Analytical electrochemistry*. s.l. : Wiley-VCH, p. 171-203. 2000. ISBN 0-471-28272-3.
20. YANG, Z.; CHILKOTI, A. Microstamping of a biological ligand onto an activated polymer surface. *Advanced Material*, v. 12, n. 6, 413-417, 2000.
21. DEKKER, M. *Sciences, principles of enzymology for food*. New York : Marcel Dekker, 1972. ISBN: 0824791487.
22. ANFINSEN, C. B.; ANSON, M. L.; HILL, W. *Advances in protein chemistry*. Los Angeles : Academic Press, 1965. ISBN 0120342022.

23. MATOBA, Y. et al. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *The Journal of biological Chemistry*, v. 281, n.13 p. 8981, 2006.
24. FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I .C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 455, 2002.
25. MAZZEI, F.; BOTRÈ, F.; BOTRÈ, C. Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. *Analytica Chimica Acta*, v. 336, p. 67, 1996.
26. TROJANOWICZ, M. *Flow injection analysis*, s.l. : World Scientific, 2000. ISBN 9810227108.
27. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. *Flow injection analysis*, s.l. : Wiley-IEEE, p. 2-30, 1988. ISBN 0471813559.
28. CALATAYUD, J. M. *Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laborator*,. s.l. : Informa Health Care, 1996. ISBN 0748404457.
29. BRAGA, B. et al. *Introdução à engenharia ambiental*. 2ª Ed. São Paulo: Prentice Hall, 2002. ISBN: 85-87918-05-2.
30. TRAN, M. C.; JACKSON, S .A. *Biosensors*. s.l. : Springer, 1993. ISBN 0412481901.
31. MAY, G. S.; SPANOS, C. J. *Fundamentals of semiconductor manufacturing and process control*. s.l. : Wiley-Interscience, p. 93-95, 2006. ISBN 0471790273.
32. RATNER, B. et al. *Biomaterials science*. s.l. : Academic Press, p. 220-221, 2004. ISBN 0125824637.
33. LUPETTI, K.O.; RAMOS, L.A.; FATIBELLO FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise de injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (Persea americana). *Química Nova*, v. 26, 2, p. 197-201, 2006.
34. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 17025*. Rio de Janeiro: 2001.

- 35.** LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, v. 55, n. 7, 1983.