

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA DO
MEIO AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO
POLIFENOLOXIDASES DE SEMENTES DE JATOBÁ PARA
ANÁLISE AMBIENTAL**

Goiânia/GO
- Setembro 2011 –

Patrícia Santiago

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO
POLIFENOLOXIDASES DE SEMENTES DE JATOBÁ PARA
ANÁLISE AMBIENTAL**

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia do Meio Ambiente
da Universidade Federal de Goiás, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Engenharia do Meio Ambiente

Área de concentração do programa: Recursos
Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Dr. Eric de Souza Gil

Co-orientador: Dra. Kátia Flávia Fernandes

Goiânia/GO

- Setembro 2011 –

PATRICIA SANTIAGO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO
POLIFENOLOXIDASES DE SEMENTES DE JATOBÁ PARA
ANÁLISE AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, aprovada em oito de setembro de 2011 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eric de Souza Gil – UFG

Presidente da banca

Prof.(a). Dra. Mariângela Fontes Santiago - UFG

Examinadora

Prof.(a). Dra. Samantha Salomão Caramori – UEG

Examinadora

Agradecimentos

No início do trabalho referiu-se que este seria um projeto de desafios. E é com muita felicidade e sentimento de dever cumprido que alcanço ao final desta etapa e verifico que alguns dos desafios foram concretizados com sucesso. Contudo, fica ainda por realizar uma pesquisa mais aprofundada que dá a possibilidade de continuar a desenvolver o trabalho. Muito se aprendeu com a realização deste trabalho, quer no nível de competências técnicas na área de bioquímica e eletroquímica, quer no âmbito da ciência Química Ambiental. No campo experimental, salienta-se a evolução pessoal enquanto investigador, estando atualmente mais atenta e preparada para os desafios futuros da profissão.

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e estarem orgulhosos no cumprimento de mais esta fase nos meus estudos. Aos meus irmãos e queridos sobrinhos, que me apoiam em todas as etapas da minha vida e por me ajudarem sempre, eu agradeço e amo muito todos vocês.

Em especial agradeço meu marido que aguentou comigo todas as alegrias e tristezas, todos os dias difíceis, o mau humor e superando tudo, estamos juntos nesta conquista que é chegar ao final. A ele eu agradeço não só pelo companheirismo como também pelo lindo presente que fizemos que, é a nossa princesinha que logo chegará.

Agradeço ao Prof. Eric e ao PPGEMA, por terem me aceito para orientação. Assim como também aos meus queridos amigos do mestrado e padrinhos de casamento, Abner, Cinthia e Francismeire.

Agora de joelhos, agradeço muito aos meus queridos amigos do LQP. Não só amigos são irmãos que trago comigo deste a graduação. Agradeço demais a minha querida orientadora de sempre a Prof.(a). Kátia Flávia, pois, eu sei que sem ela, este meu projeto não teria sido concluído. As minhas queridas Maria Carolina, linda química do meu coração, e a Karlinha que é farmacêutica e São Paulina, mas é gente boa demais. As três, de corpo moreno sarado e gostoso, eu agradeço. E a todos os outros meninos do LQP, Samantha, Flavio, Aline, Luiza, Marcos, Wendel, Rômulo, Carol e Daniela, obrigada por todos os bate papos, todos os lanches, cafés e idas a pamonharia.

Agradeço a Amanda, que me ajudou tão sollicitamente nas eletroforeses.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Goiás que nos proporciona apoio técnico e financeiro e a todos os servidores da UFG que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho, meus agradecimentos.

*“Às vezes, parecia que de tanto acreditar
em tudo o que achávamos tão certo
teríamos o mundo inteiro e até um pouco mais,
fariamos floresta do deserto
e diamantes de pedaços de vidro...
...Às vezes, parecia que era só improvisar
e o mundo então seria um livro aberto.
Até chegar o dia em que tentamos ter demais,
vendendo fácil o que não tinha preço”.*

Renato Russo

(1960-1996)

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR CONTENDO POLIFENOLOXIDASES DE SEMENTES DE JATOBÁ PARA ANÁLISE AMBIENTAL

A polifenoloxidase (PPO) é responsável por catalisar a conversão de compostos fenólicos para quinonas na presença de oxigênio. Esta enzima é amplamente utilizada na produção de biossensores e avaliação seletiva de fenóis em efluentes industriais. Neste trabalho um biossensor modificado com extrato contendo enzima polifenoloxidase de sementes de *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá) foi desenvolvido para detectar compostos fenólicos.

A extração PPO foi realizada utilizando Minimização do Risco Estrutural (SRM) com desenho fatorial 22 mais ponto central. As condições de extração foram otimizadas em 1,0 % (m/v) de polivinilpirrolidona (PVP) em 50 mmolL⁻¹ de tampão fosfato pH 7,5, no tempo de 40 min. A atividade obtida foi 0,97± 0,03 UEmg⁻¹ de proteínas. O extrato bruto foi parcialmente purificado utilizando precipitação com sulfato de amônio 60% (m / v) e fracionado em tampão fosfato pH 7,0 em 1,0% Triton TX-100.

A atividade da PPO resultante na fração precipitada foi de 2,7 vezes maior do que no extrato bruto. No gel de SDS 10% foram encontradas 6 bandas, das quais 3 possuem pesos moleculares característicos de PPO.

O biossensor foi construído com uma mistura de 60 mg de pó de grafite, 30 µL de óleo mineral e 10 mg do extrato enzimático parcialmente purificado. A resposta amperométrica foi medida em função da concentração de fenol, a uma faixa de voltagem de +0,13- +0,38 V vs SCE, em tampão fosfato pH 7,0, na velocidade de varredura em 100mVs⁻¹.

O eletrodo apresentou uma faixa de resposta linear de 0,5-3,0 molL⁻¹ (r = 0,9981), utilizando catecol como substrato. Esse biossensor foi usado para a detecção de diferentes tipos de compostos fenólicos e quando submetido a uma amostra de efluente de industria farmacêutica. Não obteve-se leitura.

Palavras Chaves: Polifenoloxidases, Biossensor e Análise Ambiental.

Abstract

DEVELOPMENTO OF BIOSENSOR CONTAINING POLYPHENOLOXIDASE JATOBÁ SEED FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS

The polyphenoloxidase (PPO) is responsible for catalyzing the conversion of phenolic compounds to quinones in the presence of oxygen. This enzyme is widely used in biosensor production and selective evaluation of phenol content in industrial effluents. In this work a biosensor modified with enzyme extract containing polyphenoloxidase from *Hymenaea stigonocarpa* (jatoba) seed was developed to detect phenolic compounds.

The extraction was performed using Structural Risk Minimization (SRM) factorial design with 22 more central point. The extraction conditions were optimized in 1.0% (w / v) polyvinylpyrrolidone (PVP) in 50 mmol l⁻¹ phosphate buffer pH 7.5, time 40 min. The activity obtained was $0,97 \pm 0,03$ UEmg⁻¹ proteins. The crude extract was partially purified using precipitation with ammonium sulfate 60% (w / v) and fractionated in phosphate buffer pH 7.0 in 1.0% Triton TX-100. The PPO activity resulting precipitated fraction was 2.7 times higher than in the crude extract. In 10% SDS gel were found six bands, three of which have molecular weights characteristic of PPO.

The biosensor was constructed with a mixture of 60 mg of graphite powder, 30 mL of mineral oil and 10 mg of the enzymatic extract. The amperometric response was measured as the concentration of phenol, a voltage range of +0.13 - +0.38 V vs. SCE in phosphate buffer pH 7.0, the sweep speed in 100mVs⁻¹.

The electrode has a linear response range from 0.5 to 3.0 mol L⁻¹ ($r = 0.9981$) using catechol as substrate. This biosensor was used to detect different types of phenolic compounds and when subjected to a sample of effluent from the pharmaceutical industry, no reading was obtained.

Keywords: Polyphenoloxidase, Biosensors and Environmental Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Frutos e sementes de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	20
Figura 2 Arranjo estrutural dos aminoácidos do sítio ativo da Polifenoloxidase.....	22
Figura 3 Esquematização da atividade de cresolase (A) e catecolase (B) da enzima polifenoloxidase.	23
Figura 4 Ciclo catalítico para a oxidação de substrato do tipo monofenol e difenol para o-quinonas por tirosina na presença de oxigênio	24
Figura 5 (a) Sinal de excitação da voltametria cíclica. (b) Voltamograma cíclico típico para processo redox reversível	30
Figura 6 Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial.	31
Figura 7 Esquema de tipos de biossensores e seus mecanismos de reconhecimento molecular e os detectores mais utilizados.	34
Figura 8 Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos	36
Figura 9 Sistema utilizado para as medidas eletroquímicas	45
Figura 10 Superfície de resposta da relação entre pH e tempo de extração da PPO em sementes de jatobá	47
Figura 11 Atividade da PPO no EPJ em UE. mg^{-1} de proteína em diferentes concentrações de sulfato de amônio	49
Figura 12 Estudo da atividade no período de armazenamento.....	51
Figura 13 Estrutura molecular dos compostos utilizados como substratos para PPO. (a) fenol; (b) catecol; (c) pirogalol; (d) guaiacol; (e) TMB; (f) hidroquinona.	53

Figura 14 Eletroforese (SDS-PAGE) do extrato bruto de jatobá (EBJ) e fração protéica precipitada (EPJ) de farinha de fruto de jatobá e marcador (RE).....	54
Figura 15 Voltamograma cíclico feito em KCl 0,01M, pH 7,0 contendo 1,25 mol.L ⁻¹ de catecol. Faixa de potencial de - 0,2 a 1,2 V, 100 mVs ⁻¹	55
Figura 16 Voltamogramas obtidos para biossensores obtidos com diferentes proporções de extrato enzimático. KCl 0,01M, pH 7,0, -0,2 e + 1,2 V, 100 mV.s ⁻¹	58
Figura 17 Voltamograma Cíclicos obtidos com PCMJ e PC. KCl 0,01 M, pH 7,0; - 0,2 a 1,2 V, 100 mV.s ⁻¹	59
Figura 18 Estudo do pH sobre resposta do biossensor em célula eletroquímica contendo tampão fosfato/acetato 0.1 molL ⁻¹ e catecol 0.5 mmolL ⁻¹	60
Figura 19 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para PC e PCMJ1 em solução contendo de 1,25 x 10 ⁻³ a 3,57x10 ⁻³ mol.L ⁻¹ de catecol e PCMJ em tampão Fosfato 0,01 mol.L ⁻¹ , pH 7,0 sem catecol; 0,13 a 0,38 V, 100 mV.s ⁻¹	61
Figura 20 Curva de calibração e voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes concentrações de catecol em solução tampão fosfato 0.1 molL ⁻¹ pH 7.0.....	62
Figura 21 DPV – Atividades relativas (I _{pc}) apresentadas com a utilização do biossensor PCMJ para diferentes compostos fenólicos. Velocidade de varredura: 100 mVs ⁻¹ . Potencial de varredura: 0,38 a - 0,13 V. Tampão fosfato 0,1 molL ⁻¹ , pH 7,0.	63
Figura 22 DPV obtidos para Tampão fosfato 0,01 molL ⁻¹ , pH 7,0 (----); efluente com PC (----) e PCMJ (----) e solução contendo catecol 3,0 mol.L ⁻¹ com PCMJ (-----). Amplitude de pulso 50 mV, faixa 0,4 a 0,1 V, 20 mV.s ⁻¹	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das enzimas.....	21
Tabela 2 Planejamento fatorial 2 2 com ponto central	40
Tabela 3 Atividade enzimática da PPO frente ao catecol determinada no EBJ e EPJ.	48
Tabela 4 Atividade da fração precipitada frente a diferentes substratos.	53

LISTA DE ABREVIATURA

EBJ	Extrato bruto da semente de jatobá
EPJ	Extrato precipitado da semente de jatobá
DPV	Voltametria de pulso diferencial
KDa	KiloDalton
I_{pc}	Corrente pico catódico
VC	Voltametria cíclica
UE	Unidade de enzima
PPO	Polifenoloxidasas
SDS	Dodecilsulfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
PVP	Polivinil polirridona
TMB	Tetrametilbenzidina
PCMJ	Pasta de carbono modificada com EPJ
SCE	Eletrodo saturado de calomelano
SRM	Structural Risk Minimization

LISTA DE SIMBOLOS

E	Potencial
E_0	Potencial padrão
R	Constante dos gases
z	Número de elétrons
F	Constante de Faraday
a_i	Atividade iônica
T	Temperatura termodinâmica
C	Coulomb
J	Joule
K	Unidade de temperatura Kelvin
V	Volts
I	Corrente elétrica
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
A	Ampere
$UEmg^{-1}$	Unidade de enzima por miligrama de proteína

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS	16
1.1 Introdução	16
1.2 Justificativa	17
1.3 Objetivos	17
1.3.1 Objetivo Geral	17
1.3.2 Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 JATOBÁ (<i>Hymenaea Stigonocarpa</i>)	19
2.2 Enzimas	21
2.2.1 Polifeloxidases	22
2.3 Fenóis	26
2.4 Sensores Químicos	28
2.4.1 voltametria	28
2.4.2 Eletrodo De Pasta De Carbono	32
2.5 Biossensores	32
2.5.1 Biossensores baseados em enzimas obtidas de fontes vegetais	36
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Equipamentos	38
3.2 Reagentes	38
3.3 Material Vegetal	38
3.3.1 Produção Da Farinha	38
3.3.2 Produção De Extratos	39

3.3.3 Análise da Atividade Enzimática dos Extratos	39
3.3.4 Purificação Parcial da Enzima	40
3.3.4.1 Precipitação	40
3.3.4.2 Atividade da Fração Precipitada Frente a Diferentes Substratos	40
3.3.5 Dosagem do Teor Protéico	41
3.3.6 Perfil Protéico	42
3.4 Construção de Eletrodo	42
3.4.1 Preparação da Pasta	42
3.4.2 Medidas Eletroquímicas	43
3.4.3 Determinação de Fenóis Totais da Amostra Real	44
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 Atividade da PPO Nos Extratos Vegetais	46
4.2 Atividade da PPO Precipitada por Adição de Sulfato De Amônio no EBJ	48
4.3 Atividade da PPO do EPJ frente a outros substratos	50
4.4 Perfil Protéico	52
4.5 Medidas Eletroquímicas	53
4.5.1 Otimização da Quantidade de EPJ na Pasta de Carbono	56
4.5.2 Estudo do pH de análise	58
4.5.3 Voltametria de Pulso Diferencial	59
4.6 Análise da amostra Real	62
4.6.1 DPV da Amostra Real	62
CAPITULO 5 - CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66

CAPÍTULO 1 – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O monitoramento ambiental é uma ferramenta de grande importância na prevenção e combate aos impactos ambientais. Com a crescente produção e utilização de produtos químicos ocorrida nas últimas décadas a sociedade contemporânea tem cobrado ações rápidas e eficientes no controle da contaminação dos cursos de águas naturais e solução para os inúmeros efluentes industriais descarregados nos diversos recursos hídricos (ROSATTO *et al.*, 2001).

Consideráveis quantidades de poluentes orgânicos distribuídos no meio ambiente se caracterizam estruturalmente como compostos fenólicos. Fenóis e derivados como clorofenóis, comuns em efluentes industriais, são provenientes da produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, refinaria de óleo e principalmente de papel e celulose. Assim como os clorofenóis e nitrofenóis, vários fenóis substituídos são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos e são reconhecidos como substâncias tóxicas e desreguladores endócrinos. Estes compostos químicos sejam de origem natural ou sintética, são capazes de interferir sobre o sistema endócrino agindo como moduladores ou mimetizador de hormônios naturais. Além disto, os compostos fenólicos podem afetar o sabor e o odor de águas potáveis e de peixes ainda que em pequenas concentrações ($< 1\text{ppm}$). (PORTACCIO *et al.*, 2006).

A Resolução CONAMA 357/2005 atribui condições e padrões para classificação das águas. Em relação às águas doces classe I, por exemplo, para fenóis totais, o valor máximo permitido é de $3\ \mu\text{g L}^{-1}$. No que diz respeito a compostos específicos, a Resolução estabelece limites ainda mais estreitos como, por exemplo, o 2-clorofenol cujo valor máximo permitido é de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, o monitoramento desses contaminantes no meio ambiente é muito importante e deve ser feito com precisão e rapidez para que se possam prevenir catástrofes ambientais (BRASIL, 2005).

Neste contexto um grande desenvolvimento foi observado, principalmente na última década, com relevância em pesquisas e aplicações analíticas de biossensores nos mais diversos setores. O maior avanço observado foi na sensibilidade destes dispositivos que possuem limites de detecção para baixas concentrações, na ordem de $10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$.

Os biossensores são definidos como qualquer dispositivo de detecção que incorpore um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos como enzimas, anticorpos, DNA, como um sensor que forneça a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica no ambiente.

A utilização de um biossensor é simples e se caracteriza pela utilização de reagentes em pequena quantidade, com isto reduzindo os custos, abreviando o tempo para análise e evitando a produção de resíduos poluentes. Simultaneamente a identificação analito de interesse dentre várias substâncias presentes na amostra se da forma muito seletiva.

1.2 JUSTIFICATIVA

Dentro deste contexto, a busca por novos biocomponentes e metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes ganham relevância, já que são estes os fatores que conferem rapidez, seletividade e sensibilidade aos biossensores que é o que os torna uma ferramenta promissora para suplementar ou substituir as técnicas existentes. Considerando a grande diversidade de processos geradores de compostos fenólicos com diferentes toxidades, percebe-se a grande importância do monitoramento ambiental. Vários métodos analíticos são utilizados para esta determinação, como espectrofotometria e cromatografia, porém são análises caras e geralmente inviáveis para detecção *in-situ*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver biossensor enzimático a partir de polifenoloxidasas extraídas de frutos de jatobá.

1.3.2 Objetivos Específicos

I - Estudar processos de extração e purificação de enzimas utilizando como fonte extrato vegetal.

II - Desenvolver biossensores enzimáticos, avaliando:

- atividade em relação a diferentes compostos fenólicos;
- concentração-limite de detecção de compostos fenólicos;

III – Otimizar os parâmetros de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), avaliando:

- faixa de pH de estudo
- potencial de pulso.

IV – Aplicar o biossensor em amostra de efluente de indústria farmacêutica (amostra real) para avaliar sua eficiência comparando o resultado com método de determinação clássico de fenóis.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 JATOBÁ (*Hymenaea stigonocarpa*)

Hymenaea stigonocarpa St. Hill, conhecida como jatobá-do-cerrado é uma leguminosa característica do cerrado brasileiro. Ocorre, naturalmente, em solos secos e em solos de fertilidade química baixa, mas sempre em terrenos bem drenados. Os nomes populares desta planta são diversos, dependendo da região: na Bahia, jatobá-capão e jatobá-da-casca-fina; no Ceará, jatobá e jatobá-da-casca-fina; em Mato Grosso, jatobá-açu; em Mato Grosso do Sul, jatobá e jatobeiro; em Minas Gerais, jatobá e jatobá-do-campo; no Piauí, jataí-de-piauí, jatobá-de-casca-fina, jatobá-de-vaqueiro e jatobai e no Estado de São Paulo, jatobá-do-cerrado (CARVALHO, 2007).

Sua forma biológica é uma árvore decídua que atinge dimensões de 4 a 6 m de altura e 50 cm de diâmetro na idade adulta. (MATUDA e NETO, 2005). O tronco é tortuoso com fuste curto e as ramificações dicotômicas, com copa baixa. As folhas são alternas, compostas, bifolioladas, pecioladas, com estípulas caducas (CARVALHO, 2007).

O fruto é um legume seco, indeiscente, monospermico ou polispermico, alongado, ápice arredondado ou levemente retuso, base arredondada e margem inteira ou levemente ondulada, medindo 8,7 cm a 20 cm de comprimento, 2,1 cm a 6,5 cm de largura e 2,0 cm a 4,3 cm de espessura; a textura é rugosa devido à presença de pontuações, pequenas, salientes e arredondadas; apresenta a linha de sutura proeminente circundando todo o fruto; a cor varia do marrom-claro ao marrom-escuro (quase negro). Em cada fruto, ocorrem de uma a seis sementes (figura 1) (CARVALHO, 2007).

As sementes são globosas, obovadas, comprimidas, superfície irregular, com algumas depressões, medindo 17,8 mm a 28,4 mm de comprimento e 9,3 mm a 19,7 mm de espessura. Envolvendo as sementes, há o arilo, amarelo-esverdeado, macio, fibroso-farináceo, com cheiro característico e sabor doce, constituindo a polpa.



Figura 1 Frutos e sementes de *Hymenaea stigonocarpa*

O estudo de MATUDA e NETO (2005) demonstraram que a semente de jatobá é pobre em macronutrientes quando comparada a leguminosas utilizadas na alimentação, mas o alto teor de fibras, possivelmente constituídas de xiloglucanas e galactomananas, pode levar ao aproveitamento rentável destas sementes.

No estudo bioquímico da semente foram encontrados 48mgg^{-1} de farinha de fenóis (MATUDA e NETO, 2000) e para a variedade *Hymenaea courbaril*, Caramori, Lima e Fernandes (2003), fizeram o estudo bioquímico e encontraram os valores de Fenóis e Taninos de $7,016\text{ mg de tanino} \cdot \text{mg}^{-1}$ de fenol e atividade de peroxidase $137,5\text{ UE} \cdot \text{mg}^{-1}$ de farinha.

2.2 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (NELSON e COX, 2002)

As enzimas são catalisadores eficientes, sendo atualmente utilizadas em áreas como a biocatálise industrial, na síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e antibióticos, na tecnologia de alimentos, em aplicações em diagnósticos clínicos e na bioconversão (LUPETTI, RAMOS, e FATIBELLO-FILHO, 2003)

A Comissão de enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), organismo internacional que constitui uma secção da IUPAC, propõe que as enzimas

sejam classificadas segundo as reações que catalisam. A Tabela 1 apresenta as diferentes classificações.

Tabela 1 Classificação das enzimas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NELSON e COX, 2002)

NÚMERO	CLASSE	REAÇÃO CATALISADA
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos a duplas ligações ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerases	Isomerização do substrato
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C–C, C–S, C–O e C–N por meio de reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP

As metaloproteínas ou metaloenzimas possuem no seu sítio ativo íons metálicos, que participam do processo catalítico ligando-se ao substrato para orientá-lo apropriadamente para a reação. Estas enzimas intermedeiam reação redox por intermédio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico, estabilizando-o eletrostaticamente ou protegendo-o, através de neutralização de cargas negativas (NELSON e COX, 2002).

2.2.1 Polifenoloxidasas

A denominação “polifenoloxidase” tem sido usada desde cedo na literatura para denotar duas enzimas diferentes. Ambas eram registradas sob o número 1.14.18.1 com o nome sistemático “monofenol, di-hidroxifenilalanina: oxigênio redutase.. Em meados dos anos 80 a comissão de enzimas da “International Union of Biochemistry” (IUB) revisou a classificação colocando a PPO em duas categorias chaves: EC 1.14.18.1 monofenol mono-oxigenase, e EC

1.10.3.2 *o*-difenol: oxigênio oxidoreductase (MAYER, 1987). Além da denominação “lacase” alguns nomes triviais baseados em seus principais 23 substratos estão ainda em uso, tais como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Essas enzimas são conhecidas como proteínas de cobre tipo 3, com o sitio ativo diamagnético (figura 2) (KLABUNDE et. al,1998).

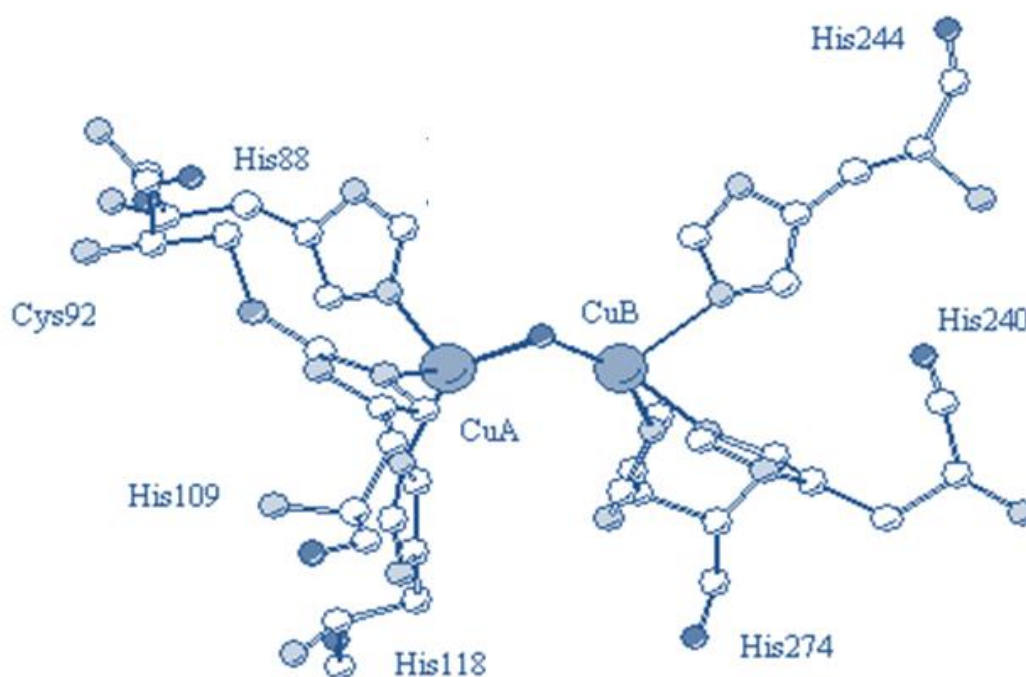


Figura 2 Arranjo estrutural dos aminoácidos do sítio ativo da Polifenoloxidase (KLABUNDE et. al.1998)

Estas metaloenzimas da classe das oxidoreductases são bifuncionais, pois catalisam duas reações distintas envolvendo compostos fenólicos e oxigênio molecular: a *o*-hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis mostrado na reação figura 3A, chamada de atividade cresolase (E.C. 1.14.18.1) e a posterior oxidação de *o*-difenóis para *o*-quinonas na reação (**figura 3B**) ou atividade catecolase (E.C. 1.10.3.1) (RAPEANU et al., 2006; ÖZEL et al, 2010).

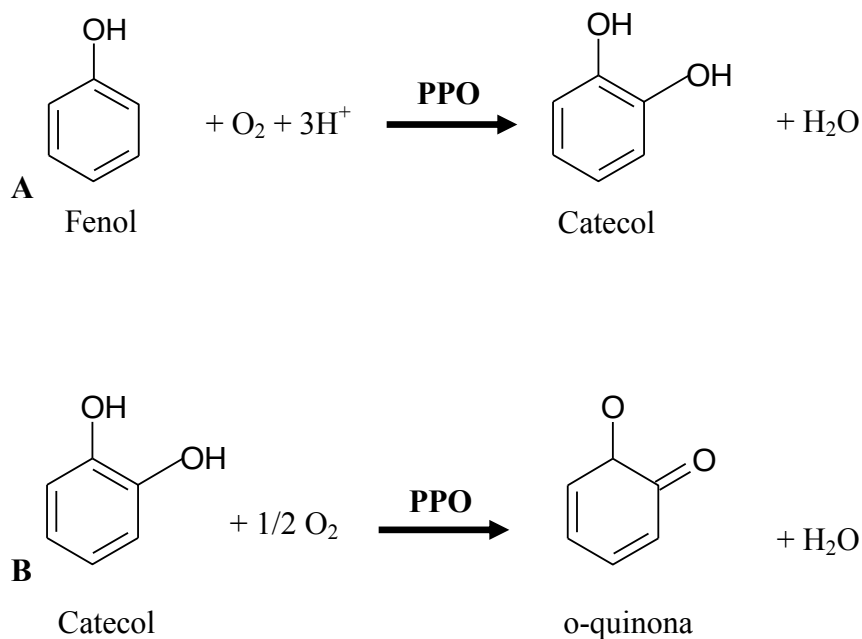


Figura 3 Esquemática da atividade de cresolase (A) e catecolase (B) da enzima polifenoloxidase.

A função biológica destas proteínas está relacionada à sua capacidade de ligação reversível de oxigênio molecular ao sítio ativo contendo um centro binuclear de cobre (SHLEEV et al. 2005). Três diferentes estados de conformação do sítio ativo foram reportados por Eicken e colaboradores (1998): a forma oxidada (*met*) do Cu²⁺, a forma oxigenada (*oxi*) com Cu²⁺ - O₂ e a forma reduzida (*deoxy*) com Cu⁺.

O papel da PPO nas plantas não está completamente elucidado, mas sugere-se que ela possa estar envolvida no desenvolvimento de necrose por injúrias na superfície foliar e na defesa contra o ataque de insetos e fitopatógenos (PINTO et al., 2008; FORTEA et al., 2009).

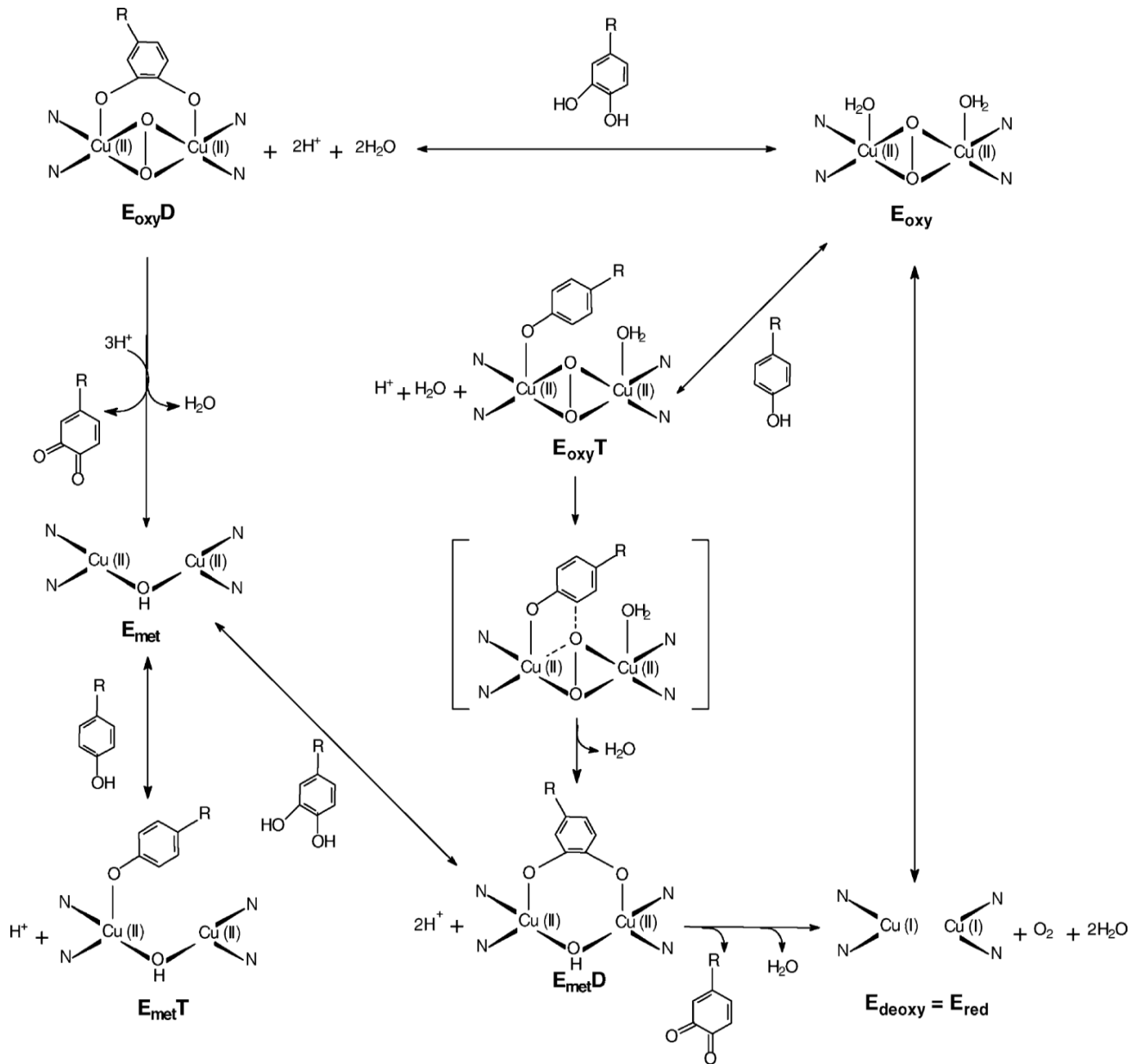


Figura 4 Ciclo catalítico para a oxidação de substrato do tipo monofenol e difenol para o-quinonas por tirosina na presença de oxigênio (SANCHEZ-FERRER, et al.,1995)

A presença de PPO tem sido descrita em uma variedade de plantas comuns e exóticas. Nelas, as polifenoloxidasas (PPO) são encontradas tanto livres no citoplasma da célula quanto associadas à membrana tilacóide dos cloroplastos, podendo apresentar diferentes isoformas. Uma característica interessante dessa enzima é sua capacidade de existir em um estado inativo ou latente (CHAZARRA et al., 1997; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

Segundo Pinto e colaboradores (2008), as quinonas geradas pela oxidação dos fenóis ou polifenóis podem provocar a precipitação de proteínas, além de serem mais tóxicas para os fitopatógenos do que os fenóis originais. Além disso, os produtos de oxidação da PPO conferem características antinutricionais aos tecidos vegetais, inibindo a atividade das enzimas digestivas de insetos predadores.

Aydemir (2004) relata a atuação da PPO no aumento da resistência da parede celular, onde a polimerização das *o*-quinonas forma complexos insolúveis com os fenóis oxidados pela PPO, gerando uma barreira física de resistência contra a entrada e propagação de patógenos.

As *o*-quinonas produzidas pela oxidação dos compostos fenólicos são moléculas altamente reativas. Estas reagem com os componentes celulares formando pigmentos, responsáveis pelo escurecimento indesejável observado na pós-colheita de produtos vegetais e alimentos processados (AYDEMIR, 2004; ÖZEL et al., 2010)

A inibição da PPO pode se dar de várias formas, seja pela ação de agentes antioxidantes, quelantes e até substratos preferenciais aos presentes no extrato vegetal. Entre os vários agentes quelantes que podem inibir a PPOs destacam-se: cianeto, monóxido de carbono, tropolona, 2-mercaptobenzotiazol, azida, ácido cítrico e ácido etileno diamino tetra cético (EDTA) (WALKER, 1975).

Já o ácido ascórbico (vitamina C) e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes que podem reagir irreversivelmente com as *o*-quinonas anulando o efeito da PPO. Por sua vez, há ainda o grupo de inibidores que tem ação sobre os substratos, *i.e.* ácidos carboxílicos aromáticos, que apresentam a estrutura química similar aos substratos fenólicos. Outrossim, estes inibidores são relatados como os mais efetivos, pois competem na ligação com a enzima atuando a longo prazo (NICOLAS et al., 1994).

2.3 FENÓIS

Processos industriais geram uma variedade de substâncias, que devido aos impactos negativos no ecossistema e para os seres humanos (toxicidade, propriedades carcinogênicas e mutagênicas), poluem o solo, o ar e as águas (BUSCA et al., 2008). A função orgânica fenol é caracterizada, por grupo hidroxila ligado a um anel aromático gerando composto incolor e

cristalino. É um dos contaminantes oxigenados presentes em efluentes industriais (BRITO e RANGEL, 2008).

Fenóis podem ser convertidos em xilenóis, alquilfenóis, clorofenóis, anilina e outros intermediários secundários da produção de surfactantes, fertilizantes, explosivos, tintas e removedores de tintas, têxteis, borracha, plásticos e antioxidantes. Fenóis também são blocos de construção para a síntese de produtos farmacêuticos, por exemplo, a aspirina e o paracetamol (BUSCA et al., 2008).

Por serem altamente solúveis em água, os fenóis constituem um sério contaminante para o meio ambiente (BRITO e RANGEL, 2008). Estas substâncias são introduzidas no ambiente de várias formas. Os clorofenóis e nitrofenóis (fenóis substituídos) em particular, são produzidas pela cloração de fenol em águas poluídas, pela fabricação de papel e celulose e pelas práticas agrícolas envolvendo o uso de inseticidas tóxicos que contaminam os cursos d'água naturais através do escoamento superficial (CHRISTOPHERSEN e CAT-DWELL, 1996).

Compostos fenólicos são tóxicos ao meio ambiente aquático, podendo provocar a morte de peixes em concentrações na faixa de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em concentrações inferiores a ppm, eles são tóxicos também a outras espécies biológicas, uma vez que destroem o delicado balanço ambiental aquático. Elevadas concentrações de fenóis podem causar perturbação e serem tóxicas às bactérias usadas nos lodos ativados das unidades de tratamento de efluentes (BRITO e RANGEL, 2008).

Os efluentes industriais geralmente contêm mais que um tipo de poluente fenólico, sendo que aqueles com estruturas mais complexas são frequentemente mais tóxicos que a molécula de fenol. A presença de fenóis nos efluentes de diversas indústrias varia gradualmente, mas em geral é alto, tais como as refinarias ($6\text{-}500 \text{ mg.L}^{-1}$), operações de coque ($28\text{-}3900 \text{ mg.L}^{-1}$), o carvão transformação ($9\text{-}6800 \text{ mg.L}^{-1}$), fabricação de produtos petroquímicos ($2,8\text{-}1220 \text{ mg.L}^{-1}$) (BUSCA et al., 2008).

A presença de compostos fenólicos em água potável pode causar sérios problemas à saúde, sendo tóxicos ao homem na concentração de 13 mg Kg^{-1} do peso corpóreo (VIEIRA et al., 2004).

Em doses sub-letais, eles afetam os sistemas nervoso e circulatório e são detectáveis em concentrações extremamente baixas ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$), com um sabor identificável na água. Esta

característica dos fenóis acaba por representar problemas operacionais em cervejarias, destilarias e unidades de engarrafamento de água mineral (BRITO e RANGEL, 2008).

O padrão de emissão de fenóis permitido pela legislação brasileira é de 0,5 mg L⁻¹ em rios e 5,0 mg L⁻¹ em redes de esgotos. A resolução CONAMA nº 357, publicada em 18 de março de 2005, revogou a Resolução CONAMA 20/86 e define como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor de 0,5 mg L⁻¹ de fenóis totais, expresso como fenol e 5,0 mg L⁻¹ em redes de esgotos (VIEIRA et al., 2004)

Análises de compostos fenólicos são feitas por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos, sendo os mais usuais a cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa ou ainda, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (ROSATTO et al., 2001). O reagente 4-aminoantipirina é usado no método padrão (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) para determinação de compostos fenólicos em águas naturais, de abastecimento, residuárias e águas do mar (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 1995). Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo “on site”, pois são caras, lentas, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda de amostra.

2.4 SENSORES QUIMICOS

Sensores químicos são dispositivos que respondem a um analito de maneira seletiva por meio de uma reação química e pode ser usado para determinação qualitativa ou quantitativa do analito. Sensores químicos são utilizados em diversas áreas: indústrias, (ex. controle de processos, controle de qualidade dos produtos, controles ambientais), governamentais (monitoramento de emissões de automóveis, monitoramento de efluentes, etc) e médicas (diagnósticos clínicos). Diante destas aplicações, sensores químicos tem resultado em benefícios econômicos e sociais (STETTER, PENROSE e YAO, 2003).

Sensores eletroquímicos contêm elementos de transdução de sinal em uma célula eletroquímica completa, sendo comumente aplicáveis à sistemas em fluxo (KISSINGER, 2005). Dividem-se em três categorias: amperométricos, potenciométricos e condutométricos. Sensores químicos são utilizados em diversas áreas: indústrias, (ex. controle de processos, controle de

qualidade dos produtos, controles ambientais), governamentais (monitoramento de emissões de automóveis, monitoramento de efluentes, etc) e médicas (diagnósticos clínicos). Diante destas aplicações, sensores químicos tem resultado em benefícios econômicos e sociais (STETTER, PENROSE e YAO, 2003).

2.4.1 Voltametria

A voltametria abrange medidas em que a informação do analito é obtida pela corrente em função do potencial aplicado suficientemente alto para ultrapassar todas as barreiras de energia, *i.e.* queda ohmica, polarização de concentração devido a difusão lenta, cinética de transferência eletrônica lenta, reorganização de espécies carregadas e solvatadas na dupla camada, etc, na interface eletrodo/solução. Classifica-se essa técnica como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de potencial (SKOOG et al., 2002).

O método baseia-se em uma resposta de corrente ao se aplicar um sinal de excitação de potencial variável, que pode ser maior ou menor dependendo da susceptibilidade da espécie em estudo ao processo redox. Utiliza-se de uma rampa de potencial e o resultado é expresso pela corrente em função do potencial. O sistema é composto por dois ou três eletrodos, em que o eletrodo de trabalho (eletrodo sob análise) é polarizado, seu potencial medido em função do eletrodo de referência não polarizável e o fluxo de corrente ocorrem entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (SOOKG et al., 2002).

O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, equação 1, é proporcional à quantidade de analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na célula eletroquímica (WANG, 2001; SOOKG et al., 2002)



A reação no eletrodo segue várias etapas, sendo que, para se descrever qualquer processo eletródico deve se considerar, inicialmente, o transporte das espécies até

a superfície do eletrodo e, em seguida, a reação que ocorre nessa interface eletrodo/solução (WANG, 2001; SOOKG et al., 2002).

As reações eletroquímicas são heterogêneas, ocorrendo na interface eletrodo-solução. O sobrepotencial aplicado leva a polarização da superfície eletródica, e formação da dupla camada. Assim espécies de carga opostas são atraídas por a interface por migração, enquanto espécies neutras eletroativas são atraídas por difusão, podendo ainda interagir ao eletrodo por adsorção (WANG, 2001; SOOKG et al., 2002).

Portanto, a corrente depende de processos como a transferência de massa (transferência da espécie do corpo da solução para a interface eletrodo-superfície); transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo) e das reações químicas que sucedem ou precedem a transferência de elétrons, que podem por sua vez ser homogêneos (protonação, dimerização, etc) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, desorção, cristalização) (WANG, 2001; SOOKG et al., 2002).

Existem três formas pela qual o transporte de massa pode ocorrer, a migração, a convecção e a difusão. O movimento por convecção se deve a processos mecânicos (agitação) ocorrem através do movimento espontâneo sob influência de gradiente de concentração. Já o mecanismo de migração depende do movimento de espécies devido à influência de um campo elétrico, que, por sua vez, é dependente do tamanho e da carga da espécie (só ocorre para espécies carregadas) e do nível de polarização do eletrodo (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002).

Por sua vez, os métodos voltamétricos podem variar de acordo com a forma em que o potencial é aplicado e a corrente amostrada.

Em voltametria a obtenção do voltamograma utiliza varredura de potencial de onda triangular em função do tempo (t) (Figura 4). Constitui-se em um método capaz de determinar rapidamente a termodinâmica de processos redox e a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons. A voltametria é caracterizada por alguns parâmetros que podem ser úteis também para análises quantitativas, tais como: potenciais de pico anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}), correntes de pico anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}), potencial de meio pico anódico ($E_{p/2}$) e potencial de meia onda ($E_{1/2}$) (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002).

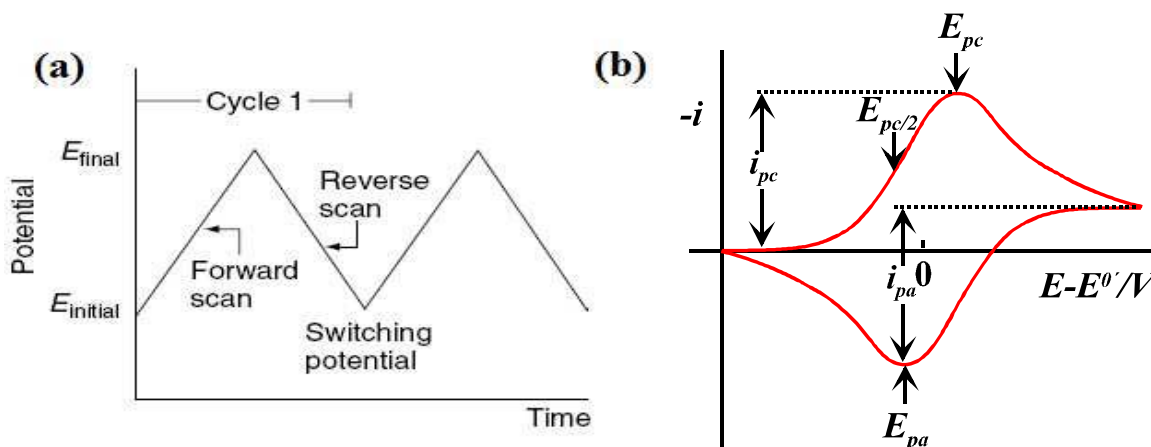


Figura 5 (a) Sinal de excitação da voltametria cíclica. (b) Voltamograma cíclico típico para processo redox reversível. Adaptado de WANG, 2001

No caso da voltametria de pulso diferencial (VPD) a instrumentação opera de tal modo que as medidas de corrente e aplicação de pulsos de potencial são realizados em intervalos de tempo muito pequenos (Figura 5A) e a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e a outra ao final do pulso (S2) (Figura 5 B) (WANG, 2001).

A primeira corrente é subtraída da segunda e a diferença é plotada *versus* o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste de picos de corrente cuja área é diretamente proporcional à concentração do analito (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002). A correção da corrente capacitiva é a diferença entre duas leituras de corrente. Em razão dessa corrente capacitiva ser compensada ao se registrar as diferenças de corrente, a sensibilidade da técnica de pulso diferencial atinge limites de detecção da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} molL⁻¹ (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002).

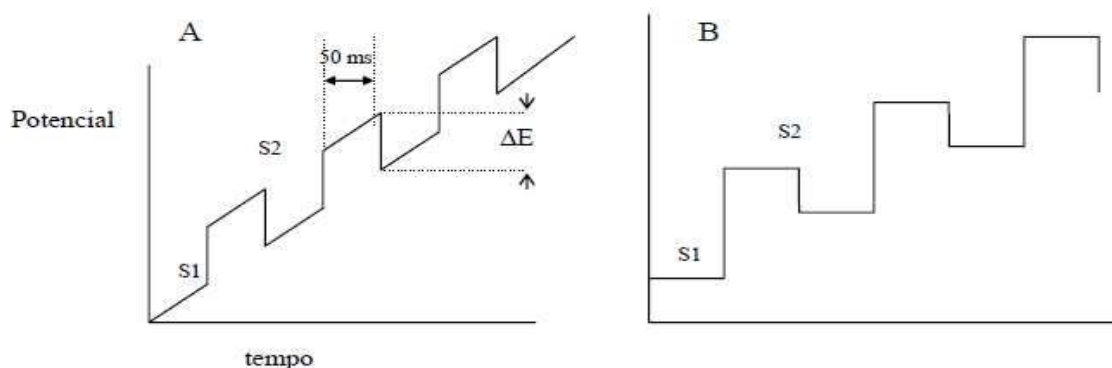


Figura 6 Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial.

Por sua vez, as reações eletroquímicas são processos heterogêneos que podem ocorrer de forma reversível, quase-reversível ou irreversível. Para uma reação reversível ($K_s > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$), a etapa de transferência de massa é determinante, pois a cinética da reação de transferência de carga é suficientemente rápida. Neste caso, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, a diferença entre processo anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) é menor ou igual a 60 mV (para $n = 1$ é), enquanto a razão $I_{pa}/I_{pc} = 1$.

Por sua vez, quando a velocidade de transferência de carga é lenta ($K_s < 10^{-5} \text{ cm/s}$), a reação é irreversível e as concentrações das espécies oxidadas e reduzida não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto, um comportamento nerstiano. Neste caso, a corrente de pico I_p varia linearmente com velocidade de varredura, enquanto a razão entre correntes anódicas e catódicas (I_{pa}/I_{pc}) é diferente da unidade. Para uma reação eletroquímica quase-reversível ($10^{-1} > k_s > 10^{-5} \text{ cm/s}$) a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002.)

2.4.2 Eletrodo de pasta de carbono

O desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificado possui a vantagem de melhorar o limite de detecção do analito de interesse e aumentar a seletividade das reações em relação ao eletrodo convencional. O procedimento é simples e a regeneração da superfície é

feita através da renovação da pasta na ponta do biossensor. Assim como outros materiais à base de carbono, tais como grafite, negro de carbono e fibra de carbono também são utilizados para construir a fase condutora, estes materiais têm uma inércia química alta e fornecem um amplo potencial de trabalho anódico e possuem uma estrutura que confere ao eletrodo uma corrente residual baixa e uma corrente sinal ruído alta (ZHANG, WRIGHT, e YANG, 2000)

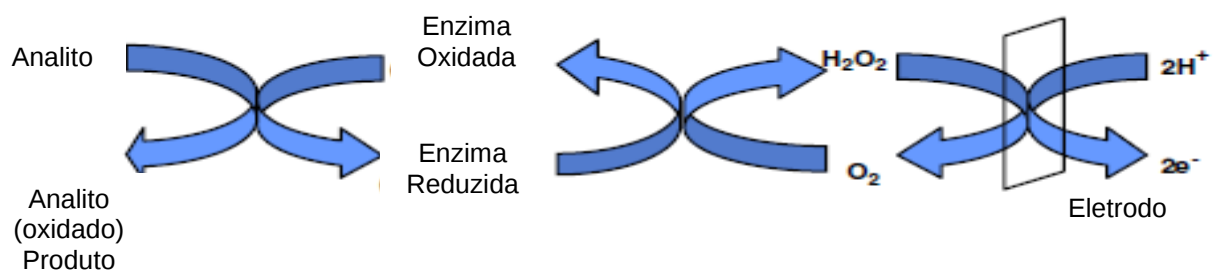
2.5 BIOSSENSORES

Desde que Leland e Clark fabricaram o primeiro eletrodo enzimático em 1956 os biossensores têm se tornado atrativo e popular, devido à sua grande simplicidade que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional à concentração do analito (ZHANG, WRIGHT, e YANG, 2000)

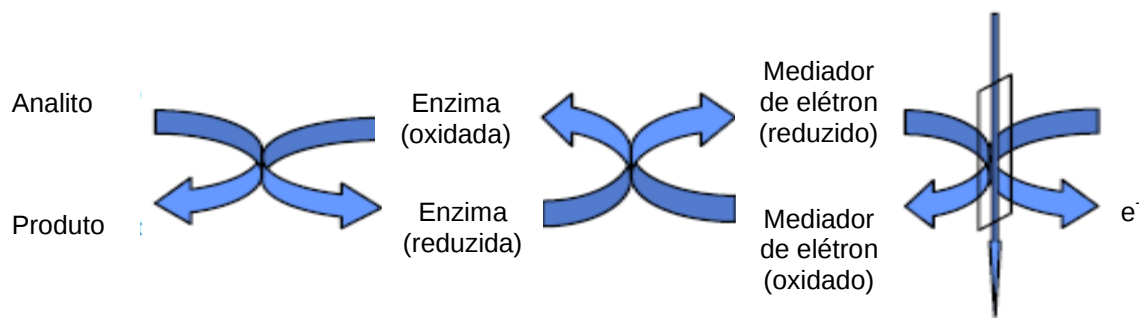
Biossensores são capazes de efetuar análises quantitativa ou semi-quantitativa específicas integrando um elemento de reconhecimento biológico com um elemento apropriado de transdução de sinal. Os biossensores amperométricos destacam-se, entre os demais biossensores, pela seletividade do agente de reconhecimento biológico (RASOOLY, 2005).

Ao longo do tempo, podemos dizer que o desenvolvimento de biossensores passou por três estágios:

(i) A primeira geração de biossensores rege que o produto normal da reação difunde para o transdutor causando a resposta elétrica.



(ii) biossensores de segunda geração que envolvem mediadores específicos entre a reação e o transdutor a fim de gerar uma melhor resposta. A segunda geração de biossensores envolve duas etapas: em primeiro lugar, há uma reação redox entre a enzima e o substrato que é reoxidado pelo mediador, e na segunda etapa, o mediador é oxidado pelo eletrodo.



(iii) Terceira geração de biossensores surgir a partir natureza própria do sensor onde a reação não gera diretamente uma difusão de produto ou mediador. Sensores de terceira geração são acompanhados por co-imobilização de enzimas e mediador em uma superfície do eletrodo, tornando o componente de bio reconhecimento uma parte integrante do eletrodo transdutor, ou seja, o contato elétrico direto da enzima com o eletrodo. Uma vez que nenhum mediador nem enzima devem ser adicionados, esse sistema facilita medidas repetidas (AHUJAA, MIRA, KUMARA E RAJESH, 2007)

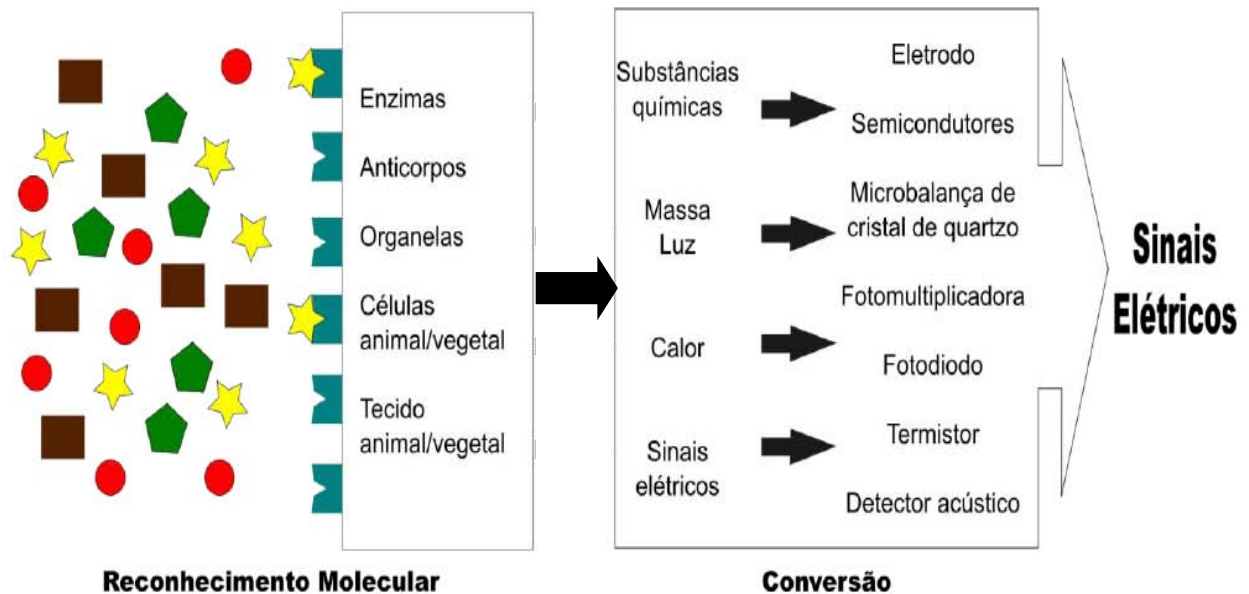


Figura 7 Esquema de tipos de biossensores e seus mecanismos de reconhecimento molecular e os detectores mais utilizados.

Nos biossensores, um agente de reconhecimento biológico se integra ao transdutor físico de três formas: preso a uma membrana que é fixada na superfície do transdutor, adsorvido na superfície do transdutor ou ligado através de ligações covalentes diretamente no transdutor. Moléculas biológicas tais como enzimas, anticorpos, DNA, etc. podem ser fixadas em uma matriz (figura 7). A seletividade destes agentes de reconhecimento é muito elevada, porém é vulnerável às condições extremas de variação de temperatura, pH e força iônica (KARYAKIN *et al.*, 1999).

As propriedades físicas mais exploradas na transdução de sinal são: propriedades eletroquímicas, ópticas e acústicas (RASOOLY, 2005).

O sistema de transdução do sinal produzido por alteração físico-química do analito alvo pelo agente de reconhecimento é de fundamental importância na sua detecção. No caso da transdução eletroquímica, substratos contendo grupos hidrolisáveis como éster ou amida podem ser mais facilmente detectados em sistemas potenciométricos, enquanto os substratos eletroativos, susceptíveis a reações de oxidoredução, se encaixam a enzimas oxido-redutases em transdução amperométrica. Independente do tipo de transdução, os parâmetros de validação analítica como exatidão, seletividade, sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade das medidas, bem como robustez e durabilidade.

A atividade de moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização ou estabilidade. A sensibilidade de um biossensor é ampliada quando a ele se aplica a imobilização de enzimas. A sensibilidade de um biossensor varia com a quantidade e natureza do agente de reconhecimento utilizado, dos procedimentos de imobilização e do tempo de utilização.

Por sua vez, a simplificação dos métodos analíticos e a portabilidade são tendências comuns a todas as áreas da química analítica. Assim nos últimos anos tem-se tornado disponível no mercado um maior número de detectores portáteis que permitem a análise *in situ* de amostras. Ademais, os biossensores potenciaram o desenvolvimento de uma família de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade (DONG e CHEN, 2002)

Assim o desenvolvimento de biossensores para monitoramento de compostos fenólicos constitui-se numa alternativa bastante promissora, pois agrega simplicidade, sensibilidade, seletividade e portabilidade num só dispositivo.

Fenóis podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta, porém, este procedimento possui desvantagens, principalmente, devido à alta sobrevoltagem gerada. Este alto potencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo, e conseqüentemente, um alto nível de ruído. Além disso, nas oxidações diretas de fenóis as reações paralelas que ocorrem, leva um a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo (ROSATTO et al., 2001). Operando com baixo potencial aplicado em relação ao eletrodo de referencia os biossensores amperométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis medindo a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, processando potenciais ao redor de 0,0 mV. Nessa faixa de potencial, a contribuição de espécies interferentes oxidadas ou reduzidas é minimizada (ROSATTO et al., 2001).

As enzimas fenoloxidasas como tirosinase e lacase são as mais utilizadas para construção de biossensores para determinação de fenóis. Mesmo possuindo mecanismos de ação diferentes, suas atuações em biossensores para detecção de compostos fenólicos são esquematizadas numa sequência de reação similares como mostra a figura 8.

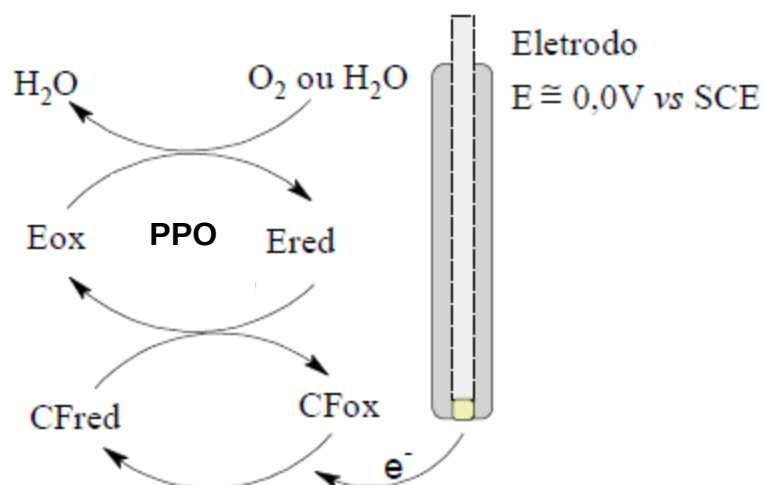


Figura 8 Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. Ered e Eox são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico (ADAPTADO DE ROSATTO et al., 2001)

Recentemente, o uso de insumos vegetais como fontes de enzimas PPOs para a confecção de biossensores tem sido proposto em diversos trabalhos. Além do fator econômico, já que apresentam custos mais baixos quando comparados às enzimas comerciais, outro aspecto que justifica esta tendência é o tempo de vida da enzima, comumente superior de enzimas comerciais. Já entre as desvantagens do uso de enzimas obtidas fontes vegetais, estão à menor seletividade e sensibilidade, fato inerente a baixa pureza de extratos vegetais brutos (FATIBELLO e VIEIRA, 2001)

2.5.1 Biossensores baseados em enzimas obtidas de fontes vegetais

Apesar da inerente seletividade e sensibilidade, o elevado custo de enzimas comerciais purificadas, tem levado a busca de alternativas mais viáveis economicamente (KUBOTA, 2010).

Além do uso de extratos brutos de enzimas produzidas em laboratório (MULLER, 2007; GARCIA, 2005), também tem merecido destaque o uso de enzimas vegetais (FATIBELLO, 2001).

O Brasil possui uma grande variedade de vegetais que são fonte de enzimas que podem ser aplicadas em diversas áreas de pesquisas. Recentemente é possível notar nas publicações uma

tendência de utilização de extratos brutos vegetais na construção de biossensores. Este uso se justifica, porque embora o uso de extrato bruto possa resultar em perda de seletividade, esta se compensa grandemente pela vantagem que é econômica e o maior tempo de vida (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2002).

Signori e Fatibello-Filho (1994), desenvolveram um biossensor para substratos fenólicos utilizando como fonte enzimática extrato bruto de polifenoloxidase, oriunda de diversos vegetais e frutas, imobilizado sobre uma membrana de acetato de celulose, utilizando glutaraldeído com braço espaçador, de um eletrodo de oxigênio. O extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*) foi a melhor fonte de polifenoloxidase, devido a sua estabilidade e atividade (U mg^{-1}). O biossensor que respondeu preferencialmente à pirogalol e catecol. Os autores mostraram a aplicabilidade deste biossensor em análises de compostos fenólicos em efluentes industriais, encontrando resultados concordantes com a determinação de fenóis por espectrofotometria de absorção molecular.

Dentre os materiais utilizados para a construção de biossensores, os materiais carbonáceos são os mais utilizados. Wang e Lin (1988) construíram um biossensor de pasta de carbono com tecido de banana, pó de grafite e Nujol, sensível a dopamina, L-dopa e adrenalina. O potencial foi constante de $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$. O eletrodo enzimático apresentou um tempo de resposta de 12 s, limite de detecção de $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e faixa linear de 5 a $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ para de dopamina.

Um biossensor potenciométrico simples e de baixo custo foi avaliado para determinação formulações farmacêuticas contendo catecolaminas e determinação da adrenalina *in vivo*. No trabalho foi utilizado polifenoloxidases de banana (*Musa sp.*), onde a atividade encontrada foi de 974 UA, o biossensor foi construído em tubo de polietileno (0,8mm) preenchido com pasta de carbono modificado com 50 UA de da enzima em tampão fosfato pH 7,0 utilizando vaselina como aglutinante. Obteve resposta linear na faixa de concentração de $8,0 \times 10^{-9}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, quando aplicado em amostras de medicamentos e $8,0 \times 10^{-7}$ a $8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ quando aplicado em amostras de sangue. O biossensor foi empregado em análises *in vivo* apresentado resultados promissores (MATAVELI, 2010).

Uma das principais vantagens da utilização da pasta de carbono para a confecção de biossensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação do “bulk” do material de eletrodo. Isto significa que é possível a imobilização de enzimas, cofatores, mediadores e estabilizadores na pasta resultando num sistema de eletrodo que não há a necessidade de adição de reagentes na

determinação. Entretanto, a principal desvantagem é que esse “bulk” é instável, principalmente quando eles são utilizados por um longo período de tempo ou na presença de solvente orgânicos.

Em Rosatto e colaboradores (2000) houve uma discussão sobre biossensores amperiométrico para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental, onde demonstraram o uso de enzimas polifenoloxidasas e peroxidases como catalisador. Discutiram que o biossensor amperométrico tem mostrado a viabilidade, para complementar método analítico laboratorial para a determinação de compostos fenólicos oferecendo alternativas aos métodos convencionais, que têm muitas desvantagens.

Alguns frutos do cerrado também já foram utilizados como base para extração de extratos vegetais para a confecção de biossensores. Como em Lima e colaboradores (2010), que imobilizaram polifenoloxidasas de Pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) em quitosana reticulada com cloreto cianúrico para determinação de tiodicarbamato. As melhores respostas do biossensor, utilizando voltametria de onda quadrada, foram quando preparado 70:20:10% (v./v./m.) de grafite, nujol e CHcych-PPO, 250UmL⁻¹ da enzima em tampão fosfato pH7,0. Foi linear na faixa de concentração de $3,75 \times 10^{-7}$ a $2,23 \times 10^{-6}$ com o limite de detecção de $1,58 \times 10^{-7}$ M. O biossensor foi aplicado na determinação de tiodicarbamato em amostras de frutas e vegetais e o resultado comparado com os obtidos usando cromatografia líquida de alta pressão.

CAPÍTULO 3 – MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-visível BEL 2000 com célula de plástico de 1 cm foi utilizada para ensaios de atividade enzimática da PPO.
- Os experimentos eletroquímicos foram executados num potenciostato μ Autolab.
- Centrífuga
- Moinho de facas

3.2 REAGENTES

- Os reagentes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água destilada/deionizada e ou em tampão fosfato de potássio ou Mellvaine's.
- Os reagentes, todos de pureza analítica, ácido clorídrico, triton x-100, Polivinil Polirridona (PVP), sulfato de amônia, fosfato de sódio, dodecilsulfato de sódio (SDS)
- Fenóis: Catecol, Fenol, Hidroquinona, TMB, Guaiacol, Pirogalol

3.3 MATERIAL VEGETAL

Os frutos utilizados neste trabalho foram coletados de única planta, única coleta em julho/2010 na Fazenda Estrela, localizada no município de Silvânia, Goiás.

3.3.1 Produção da farinha

As sementes de jatobá foram coletadas de frutos maduros, lavadas, secas e trituradas em moinho de facas e armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e acondicionados a 4 °C até o uso.

3.3.2 Produção de extratos

FARINHA DA SEMENTE DE JATOBÁ (EBJ)

Para a preparação do extrato, a 1 g de farinha foram adicionados 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,5 com 3% de PVP, sob agitação magnética a 4°C por 40 min. O extrato foi centrifugado por 8 minutos a 8000 rpm e utilizado para a determinação da atividade da PPO. Para otimizar o processo de extração da PPO, foram conduzidos experimentos seguindo planejamento fatorial 2^3 , cujas variáveis dependentes e independentes estão listadas na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 Planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Tempo de extração (minutos)		pH		
30	6,0	7,0	8,0	
40	6,0	7,0	8,0	
50	6,0	7,0	8,0	

3.3.3 Análise da atividade enzimática dos extratos

A atividade da polifenoloxidase (PPO) foi medida segundo metodologia de Carneiro, Rolim e Fernandes (2003), com modificações. 100 μL de extrato foram adicionados a 2,9 mL de solução de substrato contendo 46 mmol L^{-1} de catecol preparado em tampão Mellvaine's pH 6,5. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto sendo imediatamente processada a leitura a 420 nm. Uma unidade de enzima (UE) foi definida como sendo o aumento de 0,1 na absorbância por minuto de reação.

3.3.3.1 ESTUDO DA ATIVIDADE NO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

Para o estudo do comportamento das enzimas foi feito a preparação do extrato, a 1 g de farinha foram adicionados 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH7,5 com 3% de PVP, sob agitação magnética a 4°C por 40 min. O extrato foi centrifugado por 8 minutos a 8000 rpm e utilizado para a determinação da atividade inicial da PPO (já descrita) e armazenado em frascos na geladeira e feito medidas de atividade a cada 5 dias de armazenamento até o dia 25 e de 15 em 15 dias até o dia 60.

3.3.4 Purificação parcial da enzima

3.3.4.1 PRECIPITAÇÃO

A precipitação foi feita segundo Rapeanu, Van Loey, Smout e Hendrickx, (2006), com modificações. A 1 mL de EBJ, foram adicionados de 20, 40, 60 e 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ finamente moído, sob agitação magnética. A solução foi refrigerada por 30 min e posteriormente centrifugada a 8000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, armazenado a 2°C em pellet. O precipitado foi ressuspenso com 1 mL de 1% de triton X-100 em tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol L^{-1} , sob agitação por 10 min a 25°C , dialisado por 48 h e liofilizado. O sólido resultante foi chamado de EPJ e armazenado a 4°C para posteriores usos.

3.3.4.2 ATIVIDADE DA FRAÇÃO PRECIPITADA FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

A atividade enzimática da polifenoloxidase encontrado no EPJ foi analisada utilizando-se diferentes substratos.

Guaiacol

100 μL de solução de enzima foram adicionados a 2,4 mL de solução de guaiacol 1% (v/v) preparado em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto sendo imediatamente processada a leitura a 410 nm

(YEMENICIOGLU; OZKAN; CEMEROGLU, 1998). Uma unidade de enzima foi definida como sendo o aumento de 0,1 na absorbância por minuto de reação.

Pirogalol

100 μL de solução de enzima foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0 e 1 mL de solução 0,13 mol L^{-1} de pirogalol preparado em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,0. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto sendo imediatamente processada a leitura a 420 nm (HALPIN et al., 1989). Uma unidade de enzima foi definida como sendo o aumento de 0,1 na absorbância por minuto de reação.

Tetrametilbenzidina (TMB)

100 μL de solução de enzima foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0 e 1 mL de TMB. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto sendo imediatamente processada a leitura a 450 nm (RYAN; Ó'FÁGÁIN, 2007). Uma unidade de enzima foi definida como sendo o aumento de 0,1 na absorbância por minuto de reação.

Fenol

100 μL de solução de enzima foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0 e 1 mL de solução contendo 82,1 mmol L^{-1} de fenol e 1,2 mmol de 4-amonoantipirina em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto sendo imediatamente processada a leitura a 510 nm (WENG et al., 1991). Uma unidade de enzima foi definida como sendo o aumento de 0,1 na absorbância por minuto de reação.

3.3.5 Dosagem do teor protéico

O teor de proteínas dos extratos e da fração precipitada foi dosado pelo método de Bradford (1976). Em 100 μL da amostra foram adicionados 1 mL de reagente de Bradford e após reagir por 15 min à temperatura ambiente foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm. A

quantidade de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade específica de cada fração foi, então, calculada pela relação entre a atividade de PPO encontrada e a quantidade de proteína presente na amostra, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{UE}}{\text{mg proteína}}$$

3.3.6 Perfil protéico

Para análise do perfil protéico, o EB e o EPJ foram analisados utilizando o sistema de eletroforese (Mini-Gel/BIORAD) e gel de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970). As amostras foram preparadas em tampão de amostra desnaturante, fervidas durante 10 minutos e aplicadas no gel.

A corrida foi realizada sob amperagem fixa de 45 mA e posteriormente, quando a amostra entrou no gel de separação, a amperagem foi alterada para 40 mA.

O gel foi transferido para uma solução fixadora, deixado em repouso por 2 horas. Em seguida foi submetido a três lavagens com solução de etanol 50% (v/v), durante 10 minutos cada lavagem. Após as lavagens o gel foi incubado com solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) durante 1 minuto, lavado três vezes com água destilada por 20 segundos cada lavagem. Em seguida o gel foi incubado por 10 minutos com solução de nitrato de prata 0,2% contendo 75 µL de formaldeído, lavado novamente com água destilada por duas vezes durante 2 minutos cada lavagem.

A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio 6% (p/v) acrescido de 50 µL de formaldeído e 2 mL de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v). A revelação foi interrompida com adição de uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v).

3.4 CONSTRUÇÃO DE ELETRODO

3.4.1 Preparação da pasta

Dois tipos de eletrodos de pasta de carbono foram construídos: o primeiro, sem modificador e o segundo modificado com EPJ. O eletrodo de pasta de carbono (PC) sem enzima foi obtido pela homogeneização de 60 mg de pó de grafite e óleo mineral em almofariz com pistilo durante 20 min.

O eletrodo modificado com EPJ foi preparado através da mistura de 60 mg de grafite com o EPJ referente a precipitação de 1 mL do EBJ e 30 μ L de óleo mineral por 10 minutos em almofariz, até formar uma pasta

A pasta modificada com EPJ foi obtida homogeneizando-se 60 mg de pó de grafite, diferentes concentrações da enzima (10; 20; 30; 40 mg de EPJ) e 30 μ L de óleo mineral por 20 min. Este material foi deixado na geladeira por 24 h para secar e chamada de pasta modificada do jatobá (PCMJ).

Foram utilizadas porções adequadas da pasta para preencher cavidade de 2,0 mm de diâmetro por 0,5 mm de profundidade nos eletrodos suportes (eletrodo de trabalho). O sistema amperométrico para determinação de compostos fenólicos foi montado conforme Figura 9.

3.4.2 Medidas eletroquímicas

Para as medições eletroquímicas utilizou-se um Potenciostato/Galvanostato μ Autolab III da Eco Chemie (Holanda) acoplado ao *software* GPES 4.9, para a aquisição de dados; conectado a uma célula eletroquímica com sistema de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). Os eletrodos de trabalho são eletrodos de pasta de carbono modificados com EPJ; o eletrodo auxiliar é de espiral de platina e eletrodo de referência de calomelano (Figura 9).

Para ensaios comparativos foram realizadas análises com PC e PCMJ, na presença e na ausência de catecol na célula eletroquímica.

Para os testes iniciais os parâmetros selecionados foram faixas de potencial no intervalo compreendido entre -0,2 e +1,2 V. A velocidade de varredura selecionada foi de 100 mVs⁻¹. Para a obtenção do voltamograma, inicialmente registrou-se o branco. Em seguida, alíquotas de 250

μL da solução padrão de catecol foram adicionadas aos 10 mL de eletrólito suporte contido na célula eletroquímica e os voltamogramas obtidos foram registrados e comparados.

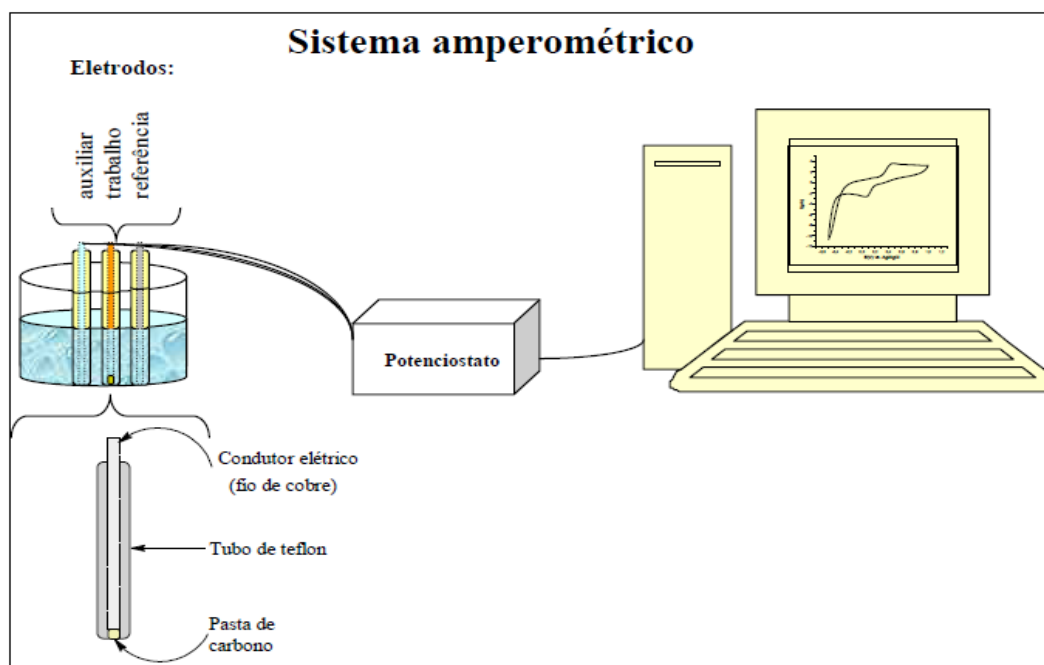


Figura 9 Sistema utilizado para as medidas eletroquímicas

Para a voltametria de pulso diferencial, utilizou-se 10 mL de solução de eletrólito suporte, adicionaram-se alíquotas de 250 μL da solução padrão de catecol (0,5 M) em intervalos de tempos iguais, até a obtenção do voltamograma. Os outros substratos utilizados foram TMB, fenol, hidroquinona e pirogallol 10 mgL^{-1} .

O estudo do pH de análise foi procedido em tampão fosfato dissódico / acetato (0,1 mol L^{-1}) variando o pH de 3 à 8.

3.4.3 Determinação de fenóis totais da amostra real

A amostra do efluente farmacêutico foi coletada na ETE da empresa, situada no Pólo Químico Farmacêutico na cidade de Anápolis, que recebe todo o efluente gerado na linha de produção com sínteses, resíduos do controle de qualidade, desinfecção e descontaminação da linha de produção. O efluente fica armazenado e separado por tipos de contaminantes até o seu tratamento para disposição na ETE do Distrito Agro Industrial de Anápolis. Após a coleta nestes

tanques, a amostra foi armazenada em frasco âmbar na geladeira por 2 dias e chamada de amostra real.

A quantidade de fenóis totais foi determinada colorimetricamente, conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteu, (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 1995) que consiste na reação entre o reagente Folin-Ciocalteu com fenóis formando um complexo azul. A mistura reacional contendo 1000 μL de efluente, 250 μL de uma solução de carbonato-tartarato de sódio (11 g. L^{-1}) e 25 μL do reagente Folin 2 mol.L^{-1} foi mantida a 20°C durante 30 minutos. Foi utilizada água deionizada como branco e a concentração de fenóis da amostra, foi obtida a partir de uma curva de calibração utilizando o fenol como padrão. A quantidade de fenóis foi determinada espectrofotometricamente, em um aparelho UV-visível BEL 2000, após leitura da absorbância da solução em 700 nm.

Para a análise eletroquímica adicionou-se 250 μL , sem prévio tratamento, na cuba eletrolítica e procedeu-se a análise com o melhor sistema otimizado. Todos os dados obtidos foram tratados pelo programa *Origin*, versão 8.0, que forneceu a curva analítica e os parâmetros estatísticos obtidos.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ATIVIDADE DA PPO NOS EXTRATOS VEGETAIS

Para a otimização da extração da PPO na farinha das sementes de jatobá foi utilizado um planejamento fatorial com fatores e níveis definidos na tabela 4, mantendo-se a temperatura constante em 4°C. Foi encontrado que a melhor extração é realizada na relação de pH maior que 7,5 e tempo extração de 40 min. Estes parâmetros foram escolhidos para posteriores extrações (figura 10).

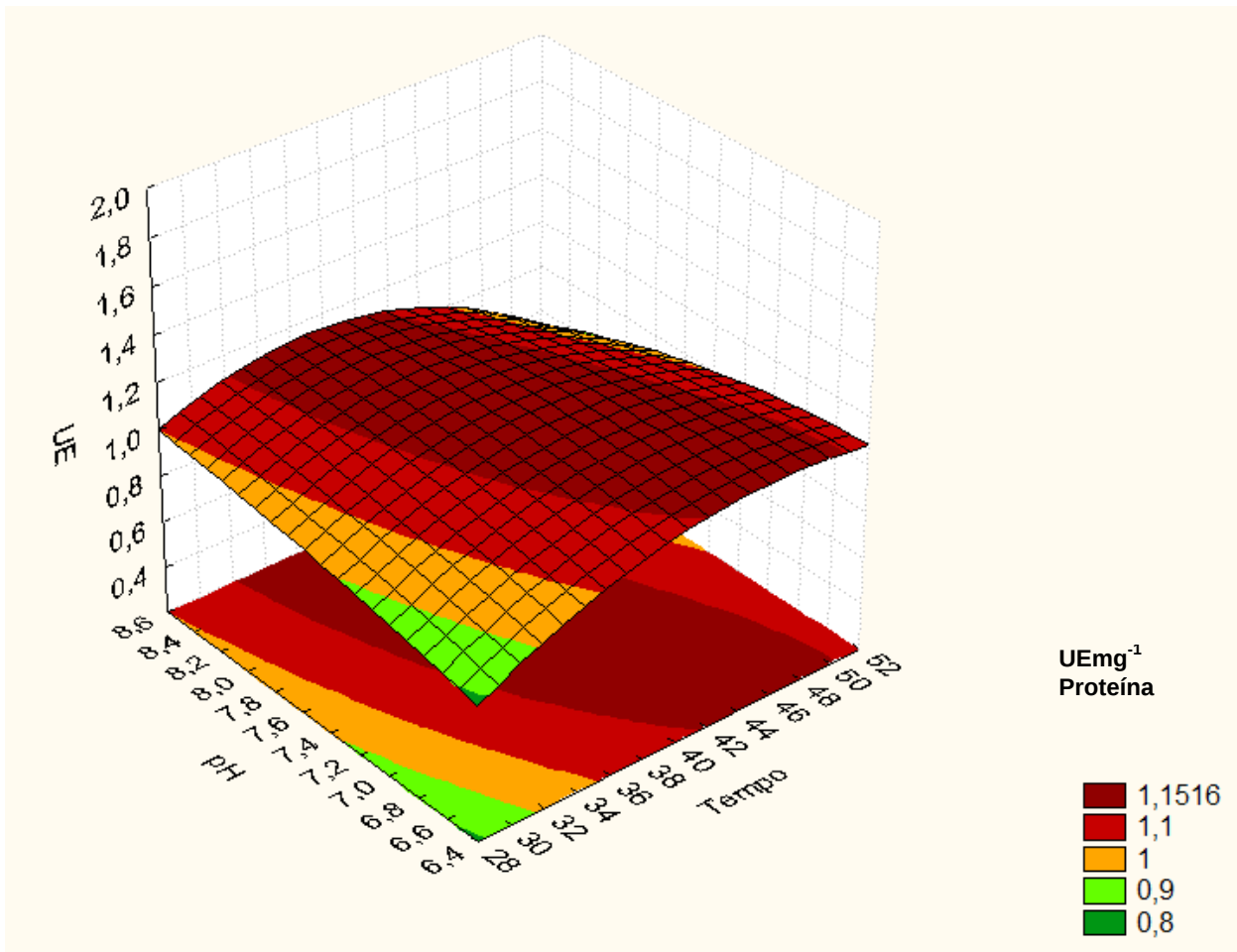


Figura 10 Superfície de resposta da relação entre pH e tempo de extração da PPO em sementes de jatobá

O EBJ foi extraído de sementes maduras e secas e o valor encontrado para a atividade de PPO foi de $0,97 \pm 0,03 \text{ UEmg}^{-1}$ de proteína. Entretanto, ressalta-se que a atividade enzimática esperada para frutos jovens seria maior, pois é conhecido que em frutos jovens a quantidade de enzimas responsáveis por mecanismos de defesa estão presentes em maior quantidade nos frutos jovens que em frutos maduros (MAZZAFERA E ROBINSON, 2000).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de atividade enzimática, teor de proteínas, atividade específica e fator de purificação da PPO presente nos extratos brutos e nos precipitados obtidos.

Tabela 3 Atividade enzimática da PPO frente ao catecol determinada no EBJ e EPJ.

	EBJ	EPJ
Atividade enzimática (UEg ⁻¹ de farinha)	55,02 ± 6,12	ND
Atividade enzimática (UE mL ⁻¹)	9,17 ± 1,02	15,73 ± 0,75
Teor de proteína (mg.mL ⁻¹)	9,51 ± 0,03	5,84 ± 0,02
Atividade específica (UE mg ⁻¹ proteína)	0,97 ± 0,03	2,69 ± 0,70
Fator de purificação	1	2.77

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três determinações.

A atividade baixa obtida no EBJ pode ser explicada em função do aumento da temperatura durante a secagem, com possível formação de complexos, proteína-proteína, proteína-carboidratos e proteína-lipídios. A formação de complexos aumenta o tamanho das moléculas e reduz a sua solubilidade, o que provoca menor extração de PPO ativa e, consequentemente, interfere na sua atividade (CHANG et al., 2007)

A quantidade de atividade enzimática no EPJ foi superior em UE mL⁻¹ e em UE mg⁻¹ proteína, comprovando que houve a parcial purificação, pois, mesmo a quantidade de proteínas terem diminuído após a precipitação com o sulfato de amônio, a atividade não decaiu.

Na caracterização bioquímica feita em Caramori e colaboradores (2003), encontraram atividade proteolítica e quantidade de fenóis alta. Devido a esses fatores e a que quanto mais purificado o extrato está, maior as chances de obter sucesso na confecção do biossensor, a precipitação com sulfato de amônio foi realizada a para buscar a PPO na sua forma latente.

4.2 ATIVIDADE DA PPO PRECIPITADA POR ADIÇÃO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NO EBJ

A diminuição significativa no teor de proteínas do precipitado em relação ao extrato bruto e, conseqüentemente, a atividade específica aumentada no precipitado nos permite determinar um fator de purificação de 2,77 vezes entre o EBJ e o EPJ, como visto na tabela 3.

A purificação parcial da enzima no EBJ foi obtida pela adição de sulfato de amônio de 20 a 80 %. Os resultados da purificação parcial da PPO estão apresentados na figura 11. A adição de 60% de sulfato de amônio resultou em um aumento da atividade PPO com uma purificação de 2,7 vezes maior.

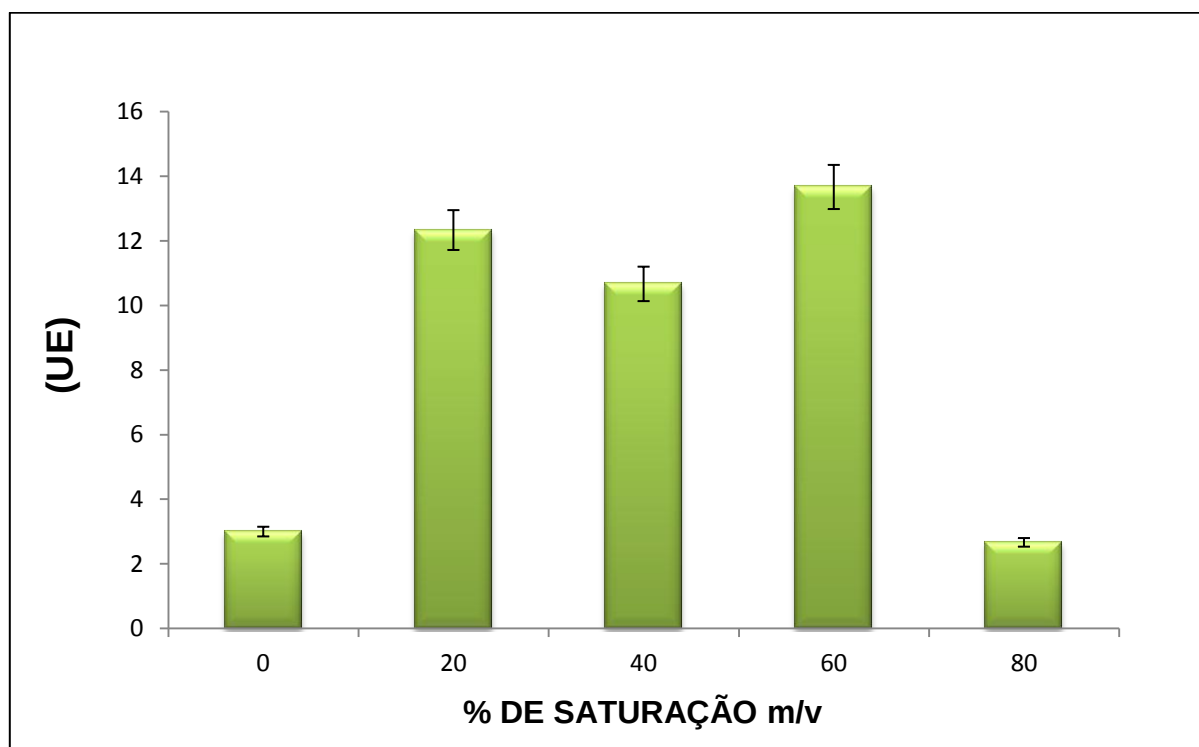


Figura 11 Atividade da PPO no EPJ em UE. mg^{-1} de proteína em diferentes concentrações de sulfato de amônio

A PPO ligada à fração precipitada foi fracionada e parcialmente purificada por solubilização com o detergente triton TX-100 de cadeia menor. Este detergente tem um ponto de nuvem em 23 ° C, que permite seu uso em uma faixa de temperatura compatível com a estabilidade da proteína. Esta técnica tem sido amplamente demonstrada como uma ferramenta útil na purificação de proteínas de membrana de tecidos vegetais (DELICADO, MEGÍAS, LÓPEZ E NICOLÁS, 2005). Marques et al. (1994) descreveram a PPO como uma proteína hidrofílica com uma curta cauda hidrofóbica que a prende a membrana dos tilacóides, portanto a extração da enzima da maioria das espécies requer o uso de detergentes tais como Triton X-110, Triton X-114 ou SDS (NICOLAS et al., 1994).

Após a centrifugação do pelet solubilizado, o sobrenadante ficou mais claro, livre de compostos fenólicos polares, e algumas proteínas de membranas que ficaram no precipitado, confirmado com a diminuição da quantidade de proteína no EPJ. De fato, a remoção de fenóis com TX-100 foi suficiente para evitar o escurecimento da solução enzimática, mesmo depois de ciclos de congelamento e descongelamento, ou depois de semanas de armazenamento a 4° C. A enzima foi assim, isolada em um estado latente como pode ser descrito para outras plantas (MAZZAFERA E RONBINSON, 2000; PINTO et al., 2008)

Diversos autores propuseram metodologias para a extração de polifenoloxidasas em plantas. Marri et al. (2003), obtiveram uma purificação de 4 vezes da PPO de batata utilizando fenil sepharose; Pinto e colaboradores (2008), em estudos com PPO de feijão-de-corda, utilizaram sulfato de amônio e obtiveram um fator de purificação de 3,3; enquanto Guo et al. (2009), trabalhando com PPO de feijão verde, conseguiram um fator de purificação de 3,5 utilizando precipitação com o mesmo sal.

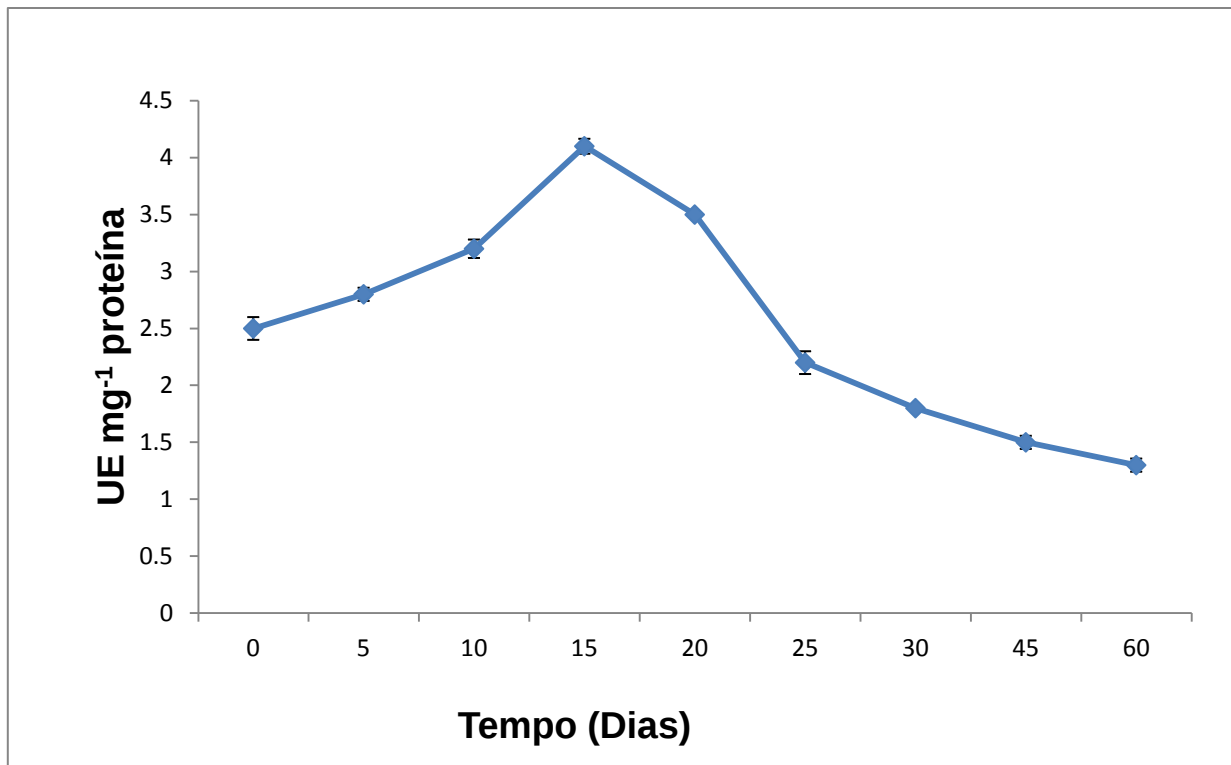


Figura 12 Estudo da atividade no período de armazenamento

Na figura 12 é demonstrado o estudo feito para esclarecer o tempo de atividade remanescente do EPJ para o uso no biossensor. No dia 15 a PPO teve a maior atividade decaindo nos dias subsequentes. . Esse aumento na atividade é devido a alguma modificação estrutural na cadeia da enzima. Em Concellon, Anón e Chaves (2004), os autores encontraram esse aumento no dia 6 durante a estocagem em baixas temperaturas. Como a PPO oxida compostos fenólicos no EPJ os compostos polifenólicos da semente de jatobá ainda estão presentes na parcial purificação ocasionando decréscimo na atividade que é acentuado depois de 20 dias de armazenamento.

4.3 ATIVIDADE DA PPO NO EPJ FRENTE A VÁRIOS SUBSTRATOS

Tipicamente, as polifenoloxidasas de plantas têm larga especificidade de substratos, oxidando diversos orto-difenóis (WANG; CONSTABEL, 2003). É importante ressaltar que a eficiência da reação de oxidação depende da estrutura do composto fenólico e de sua interação com o sítio catalítico da enzima.

A diferença de especificidade da PPO (Tabela 4) frente aos diversos substratos testados pode estar relacionada com a organização do sítio catalítico da enzima. Observando as estruturas dos substratos (**Figura 13**) percebe-se que catecol e guaiacol apresentam estruturas químicas semelhantes, sendo compostas por um anel benzênico substituído nas posições orto e meta. A presença de um grupo metoxi no guaiacol em lugar da hidroxila presente no catecol pode ser o fator preponderante para a diferença de especificidade observada para a PPO do EPJ.

Nota-se que as atividades com fenol e TMB foram muito baixas indicando baixa atividade cresolase (Tabela 4). Preparações enzimáticas com pouca ou alta habilidade de hidroxilação são comuns, mas preparações apresentando somente a atividade monofenolase também têm sido relatadas. Durante os últimos estágios de maturação de grãos de trigo e por Sttafford e Dresler (1972) em sorgo. Quando tanto a mono como a difenolase estão presentes nos vegetais, encontram-se numa proporção monofenolase:difenolase, em termos de atividade, de 1:10 até 1:40 (VÁMOS VIGYÁZÓ, 1981); que pode ser explicado pelo fato da difenolase ser a forma da PPO que prevalece nas plantas (MAYER, 2003).

Os demais substratos apresentam estruturas menos ou mais substituídas que o catecol, o que provavelmente interfere na ação da polifenoloxidase. Como a polifenoloxidase apresenta diversas isoformas dependendo da sua localização na célula vegetal e do tipo de planta, é de se esperar que sua especificidade também varie enormemente (RAPEANU, VAN LOEY, SMOUT E HENDRICKX, 2006), trabalhando com extração de PPO de uvas encontraram uma atividade relativa de 0,02% para o pirogalol e Simsek e Yemenicioglu (2007) relataram 31% de atividade relativa para o pirogalol em relação ao catecol para PPO extraída de cogumelos.

Tabela 4 Atividade da fração precipitada frente a diferentes substratos.

Substrato	Atividade específica (UE mg ⁻¹ proteína)	Atividade relativa ao catecol (%)
	EPJ	EPJ
Hidroquinona	9,91±1,02	368
Catecol	2,69±0,70	100
Pirogalol	2,29±0,98	85
Guaicol	2,01±0,32	75
Fenol	0,75±0,023	28
TMB	0,57±0,06	21

*Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três determinações

Embora a atividade da PPO no EPJ para hidroquinona ser 3,68 vezes maior do que com catecol, optou-se por trabalhar com o catecol em função da baixa toxicidade deste reagente.

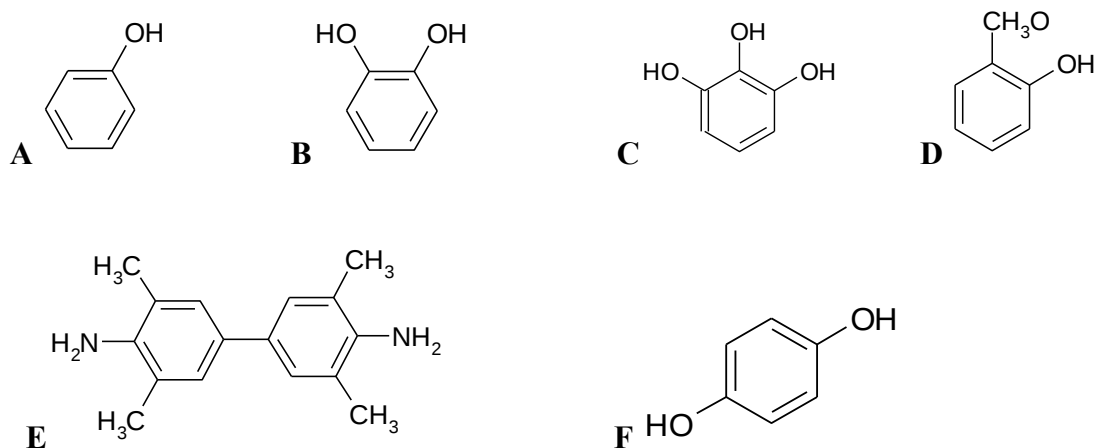


Figura 13 Estrutura molecular dos compostos utilizados como substratos para PPO. (a) fenol; (b) catecol; (c) pirogalol; (d) guaiacol; (e) TMB; (f) hidroquinona.

4.4 PERFIL PROTÉICO

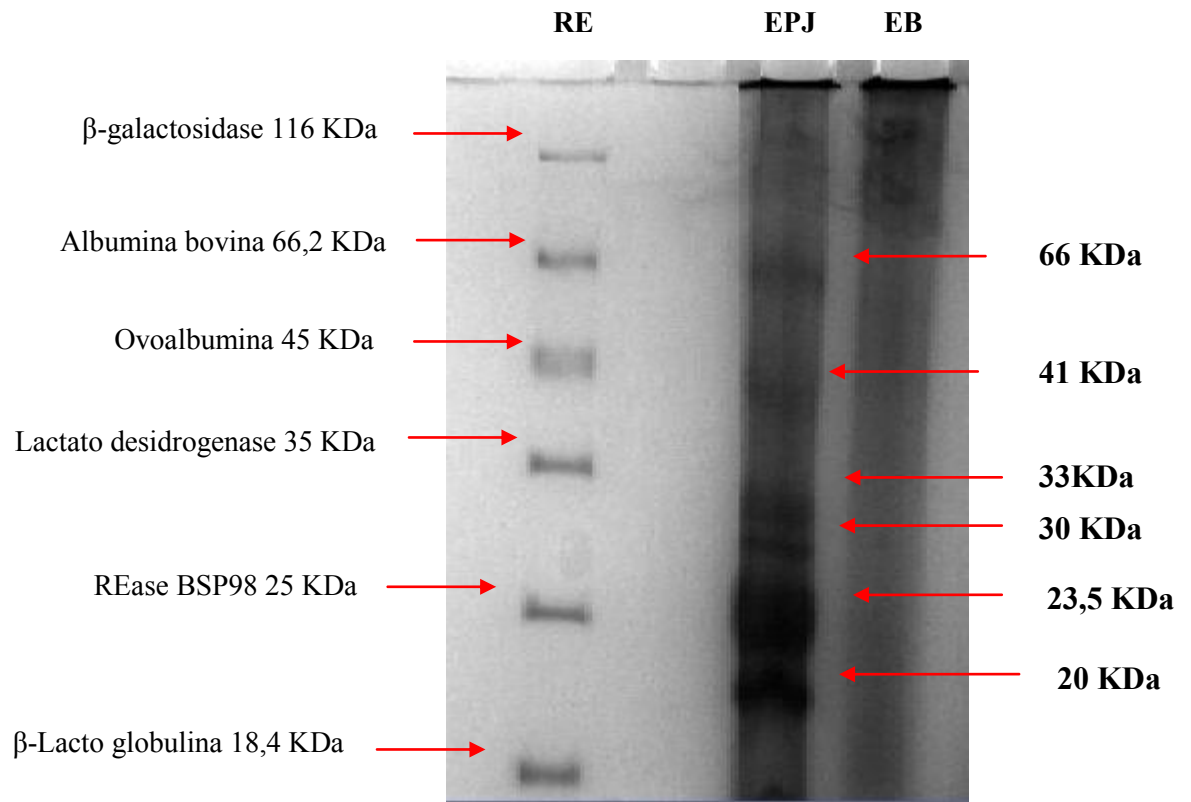


Figura 14 Eletroforese (SDS-PAGE) do extrato bruto de jatobá (EBJ) e fração protéica precipitada (EPJ) de farinha de fruto de jatobá e marcador (RE).

Como visto na figura 14 no EBJ não foi encontrado nenhuma banda, somente o arraste proveniente de sais e açúcares redutores na amostra. No EPJ apareceram 6 bandas fortes quando o gel foi corado com prata. As isoformas de PPO de fontes vegetais foram relatados na faixa de 32 a mais de 200 kDa, principalmente dentro da faixa de 35-70 kDa (YORUK e MARSHALL, 2003). É relevante mencionar que essa atribuição da multiplicidade de PPO com base em estimativas de peso molecular deve ser interpretada com cautela. Interconversão de várias formas de PPO total ou parcialmente desnaturada sob condições eletroforética tem sido amplamente relatados na literatura (MARQUES et al., 1995).

Pinto et al. (2008) determinaram a presença de três PPO's em caupi, com pesos moleculares de 58 kDa, 73 kDa e 220 kDa; Guo et al. (2009), trabalhando com feijão verde,

purificaram quatro isoformas de PPO com massa moleculares de 39 kDa, 46 kDa, 54 kDa e 57,5 kDa.

4.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os compostos fenólicos podem ser oxidados por eletrodos carbonáceos convencionais em potenciais geralmente altos (0,8 V *vs.* ECS). Nessas condições de sobrevoltagem, podem ocorrer processos de adsorção ou formação de produtos poliméricos com passivação do eletrodo, observando-se picos com intensidades muito abaixo da esperada em cada ciclo (GIL et al., 2009).

O alto potencial aplicado eleva acentuadamente a chance de eletropolimerização com passivação da superfície eletródica, bem como pode ainda elevar níveis de corrente capacitiva, o que também reduziria a sensibilidade. A figura 15 apresenta voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de pasta de carbono, em que se pode observar considerável queda dos níveis de corrente após ciclos sucessivos.

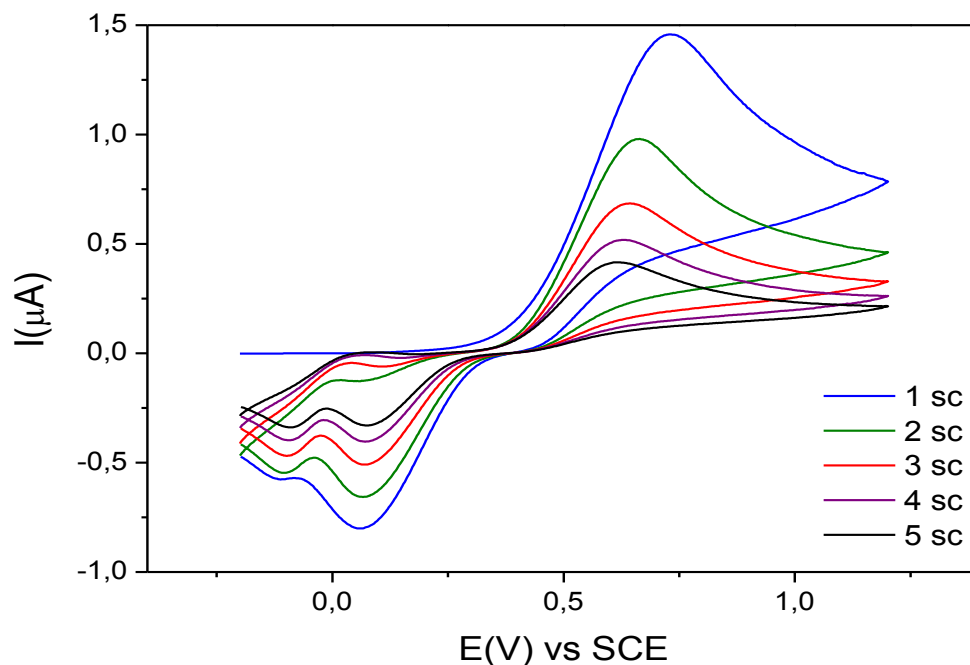
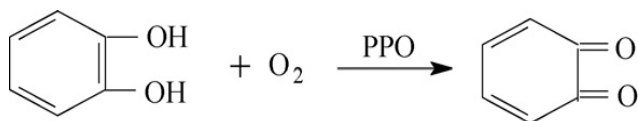


Figura 15 Voltamograma cíclico feito em KCl 0,01M, pH 7,0 contendo 1,25 mol.L⁻¹ de catecol. Faixa de potencial de - 0,2 a 1,2 V, 100 mVs⁻¹.

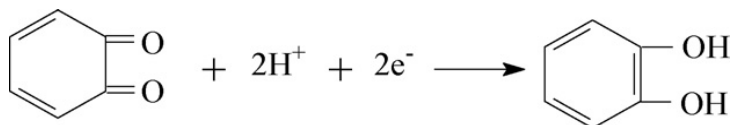
Embora, o perfil voltamétrico observado na figura 15 não reflita o esperado para sistema catecol/quinona, em condições experimentais ótimas, ou seja, $\Delta E \cong 60$ mV e $I_a/I_c \cong 1$, pode-se verificar claramente através da queda acentuada de corrente a partir de varreduras sucessivas, o efeito da adsorção e passivação do eletrodo. Outrossim, ressalta-se que no sentido de reduzir custos esperados para análise, foi utilizado para elaboração de pasta de carbono grafite de menor grau de pureza.

No sentido de evitar a necessidade de se aplicar potenciais anódicos elevados para oxidação das hidroxilas fenólicas a formas quinônicas, uma excelente alternativa é a oxidação bioquímica através de enzimas fenoloxidasas como no esquema.

A reação catalítica da PPO com catecol é a seguinte (1):



Formação de *o*-quinona é detectada pelo método amperométrico durante a redução no eletrodo (2):



Sendo a *o*-quinona produzida na oxidação bioquímica do catecol, eletroativa, ela pode ser reduzida eletroquimicamente em baixos potenciais de volta ao catecol. A participação de elétrons nesta etapa faz à corrente mudar e ela pode ser medida neste momento (ONNERFJORD et al., 1995)

A utilização da redução eletroquímica da *o*-quinona formada bioquimicamente como uma reação de detecção para a quantificação de fenóis é eficiente por pelo menos três vantagens:

- i) a inativação de reação de polimerização é dificultada (reações competitivas) pela remoção eletroquímica da quinona

- ii) o baixo potencial aplicado minimiza a influência de diferentes interferências da amostra-matriz, e
- iii) o risco de envenenamento do eletrodo diminui (ORTEGA et al.,1993).

4.5.1 Otimização da quantidade de EPJ na pasta de carbono

Um dos principais fatores que contribui para a versatilidade e aplicabilidade de um biossensor amperométrico, bem como para o seu custo de fabricação, é a quantidade de enzima na composição do eletrodo modificado. Tendo em vista a viabilidade e que a velocidade de uma reação catalisada por enzima depende diretamente de sua concentração, foram inicialmente investigadas 4 composições para a modificação da pasta de carbono.

A quantidade de enzima utilizada na construção do biossensor deve ser suficiente para que haja reação com o substrato, mas se não estiver na medida certa pode ocorrer problemas difusionais diminuindo a resposta do biossensor. O menor nível de corrente capacitiva que por sua vez implicaria em melhor desempenho analítico foi observado para eletrodo PCMJ de composição 10 mg de EPJ + 60 mg de grafite como visto na figura 16.

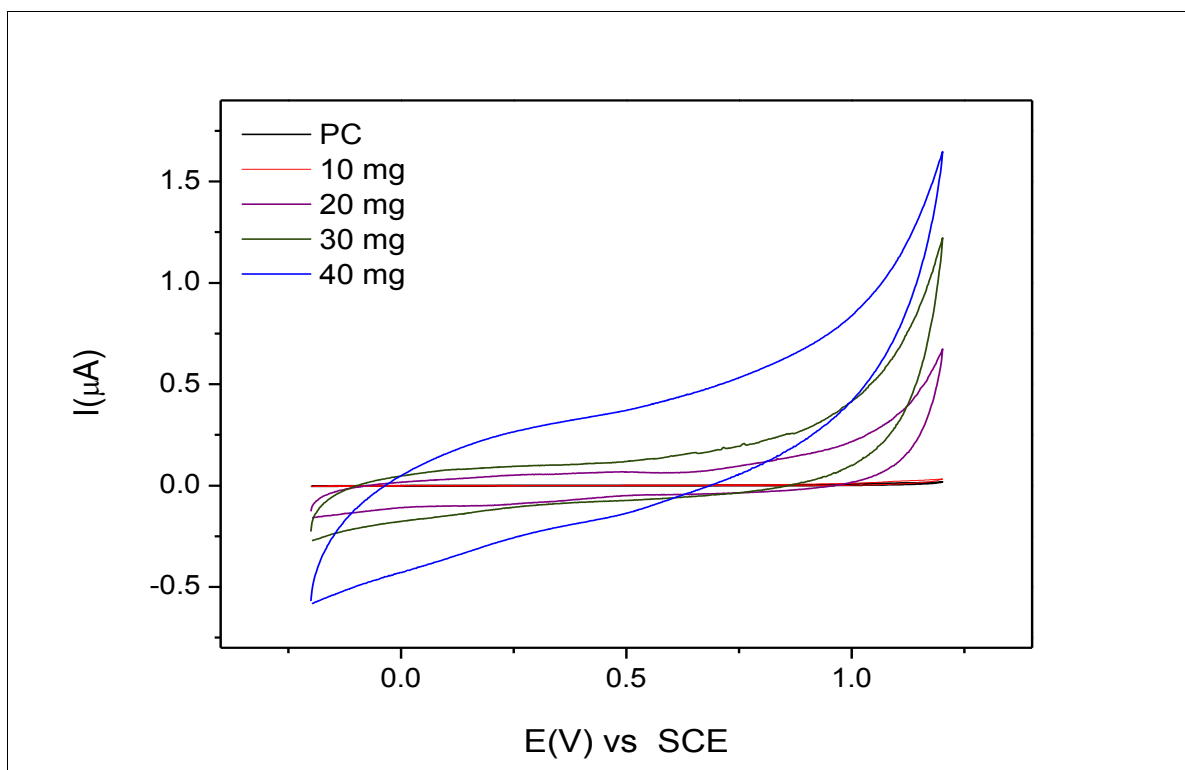


Figura 16 Voltamogramas obtidos para biossensores obtidos com diferentes proporções de extrato enzimático. KCl 0,01M, pH 7,0, -0,2 e + 1,2 V, 100 mV.s⁻¹.

Como pode ser observado para as 4 composições de PCMJ, o aumento na quantidade de EPJ resulta em aumento da resistência elétrica da pasta de carbono contida em cada eletrodo modificado, dificultando o processo de transferência de elétrons no biossensor. Este fato pode estar associado a presença de impurezas orgânicas presentes no extrato bruto, que em concentrações elevadas produziriam efeitos interfaciais indesejáveis, tais como bloqueio da superfície. Portanto, a pasta de carbono contendo menor proporção de EPJ em relação a mistura de pó de grafite e óleo mineral foi empregada na construção do biossensor.

A Figura 17 apresenta voltamogramas obtidos para biossensor otimizado PCMJ frente a duas concentrações de catecol em comparação ao eletrodo de pasta de carbono não modificado PC. A incorporação da enzima em quantidades ótimas, resultou em melhora das propriedades

condutoras da pasta, observando resposta mais eficiente frente a catecol incluso com aumento da reversibilidade (Figura 17).

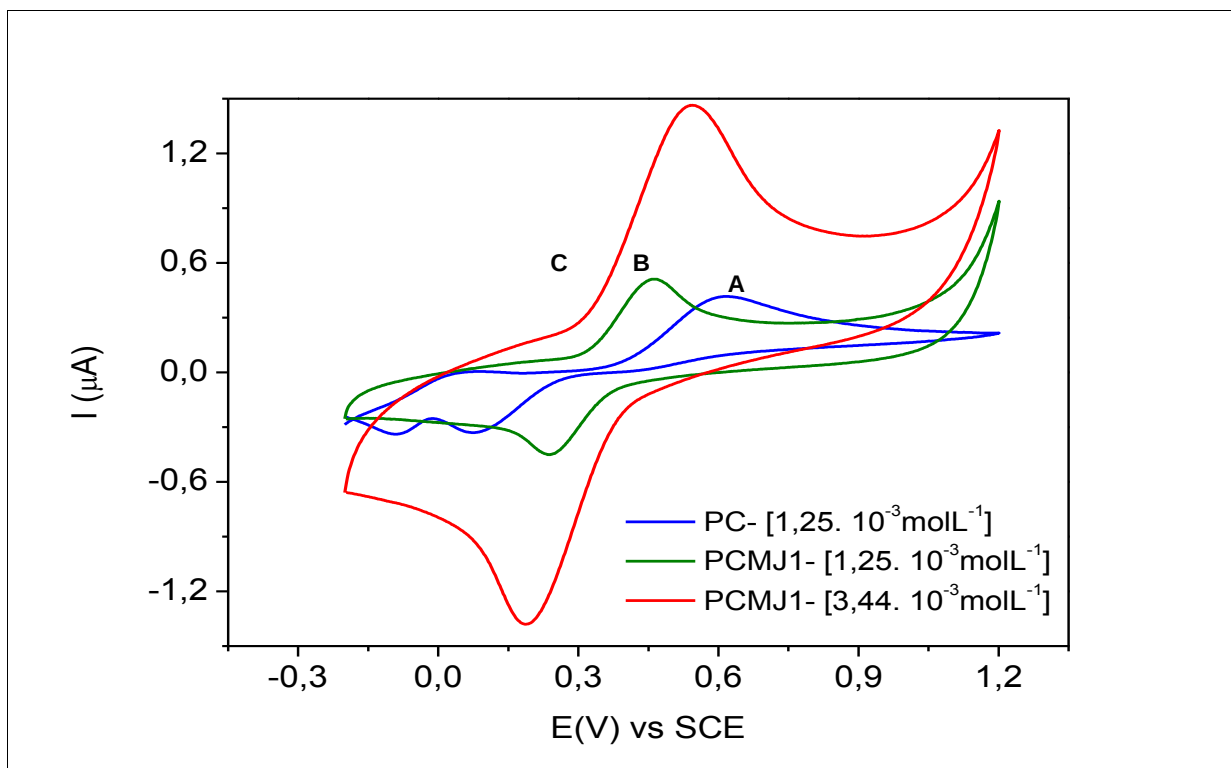


Figura 17 Voltamograma Cíclicos obtidos com PCMJ e PC. KCl 0,01 M, pH 7,0; - 0,2 a 1,2 V, 100 mV.s⁻¹.

4.5.2 Estudo de pH de análise

As enzimas apresentam atividade ótima em pH, onde a velocidade das reações são máximas. O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas, fato associado ao envolvimento de próton em várias reações redox, bem como a influência do pH na conformação tridimensional da enzima, que depende em grande parte de ligações intramoleculares do tipo ponte de hidrogênio. Sendo assim, foi estudado o efeito do pH de 3,0 a 8,0 sobre a resposta do biossensor com PCMJ (Figura 18). A melhor resposta do biossensor foi verificada em pH 6,0 a pH 8,0, que é a faixa relevante para a maioria das amostras e águas naturais, decrescendo em

valores de pH inferiores e superiores. Deste modo, os estudos foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0.

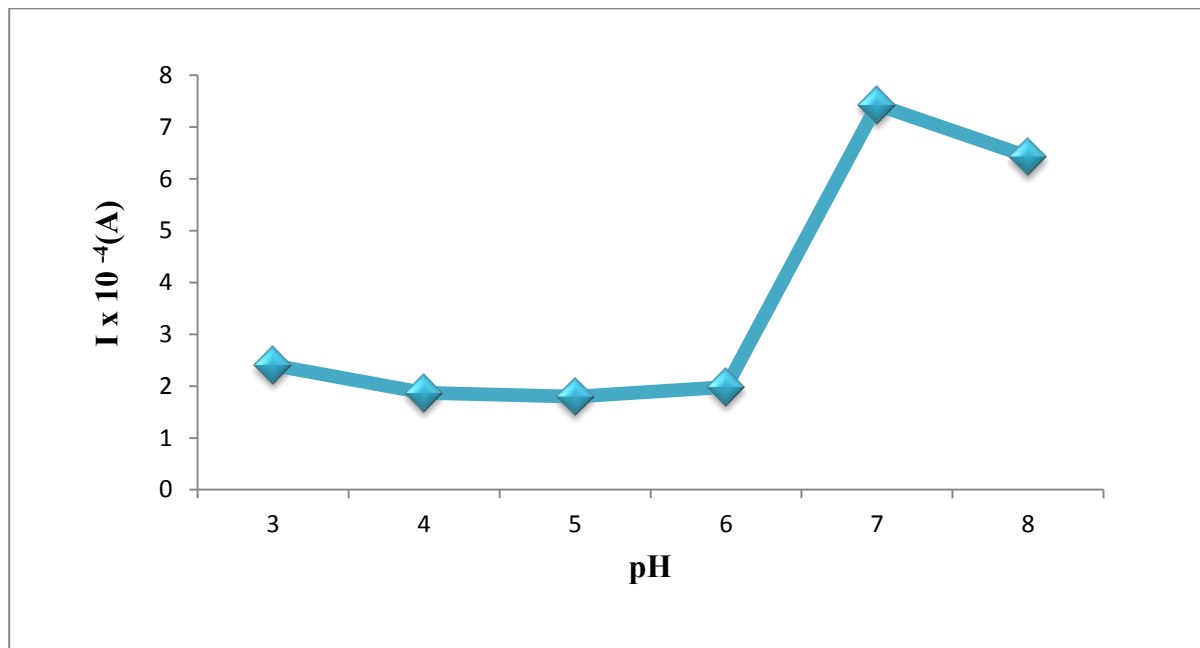


Figura 18 Estudo do pH sobre resposta do biossensor em célula eletroquímica contendo tampão fosfato/acetato 0.1 molL⁻¹ e catecol 0.5 mmolL⁻¹.

4.5.3 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Para comprovar a eficiência catalítica da enzima na pasta de carbono, voltamogramas de pulso diferencial foram feitos nas mesmas condições para eletrodos de PCMJ e PC. A figura 19 demonstra a diferença entre os níveis de corrente vistos para a redução da quinona obtidos com eletrodo PCMJ e o eletrodo com PC. Observa-se que a corrente é proporcional a concentração do catecol para PCMJ, enquanto para PC não há resposta quantitativa. Ressalta-se que, nesta faixa de potencial de trabalho não há oxidação eletroquímica do catecol, logo picos de redução estão associados exclusivamente a quinona formada enzimaticamente.

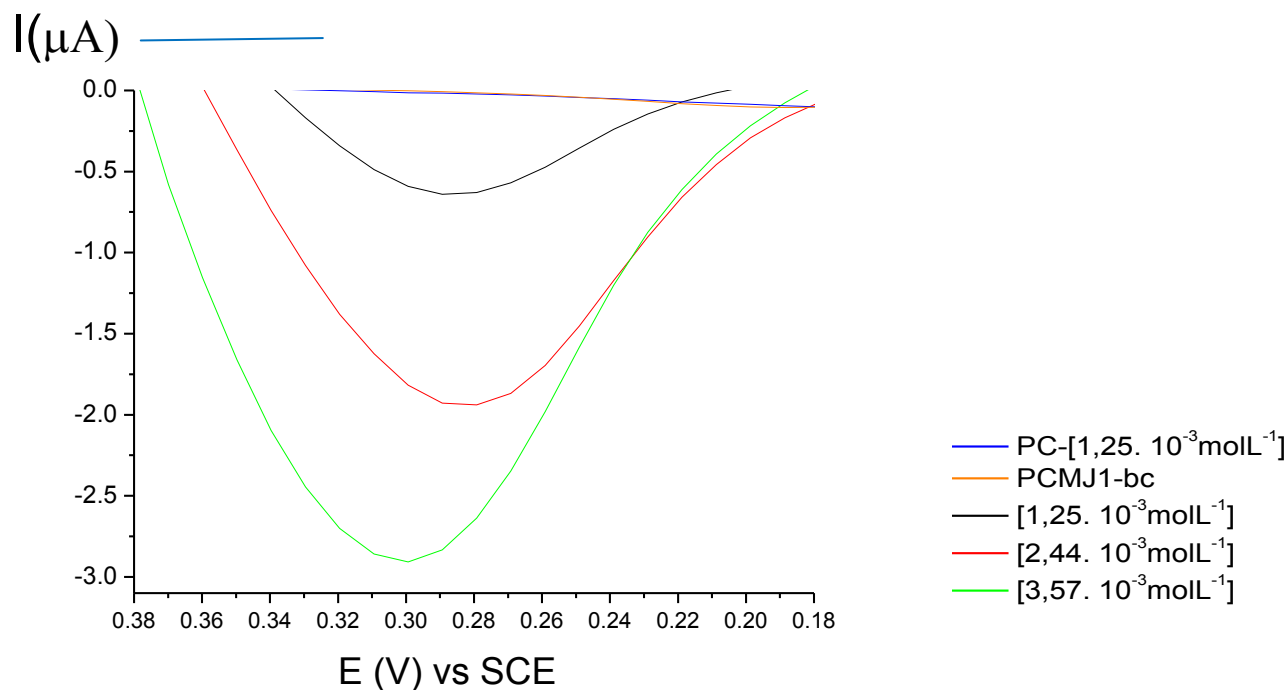


Figura 19 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para PC e PCMJ1 em solução contendo de $1,25 \times 10^{-3}$ a $3,57 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$ de catecol e PCMJ em tampão Fosfato 0,01 mol.L $^{-1}$, pH 7,0 sem catecol; 0,13 a 0,38 V, 100 mV.s $^{-1}$.

A curva analítica obtida para adições sucessivas de catecol, utilizando-se o biossensor otimizado PCMJ resultou em curva linear entre $0,5$ e $2,5 \times 10^{-4}$ molL $^{-1}$ de catecol, com um coeficiente de linearidade de $r = 0,998$, $n = 5$. As correntes de pico foram amostradas a potencial $E_{pc} \sim 0,32$ V vs SCE, potencial este suficientemente baixo para evitar problemas relacionados a adsorção e passivação do eletrodo, bem como para reduzir numero de interferentes potenciais.

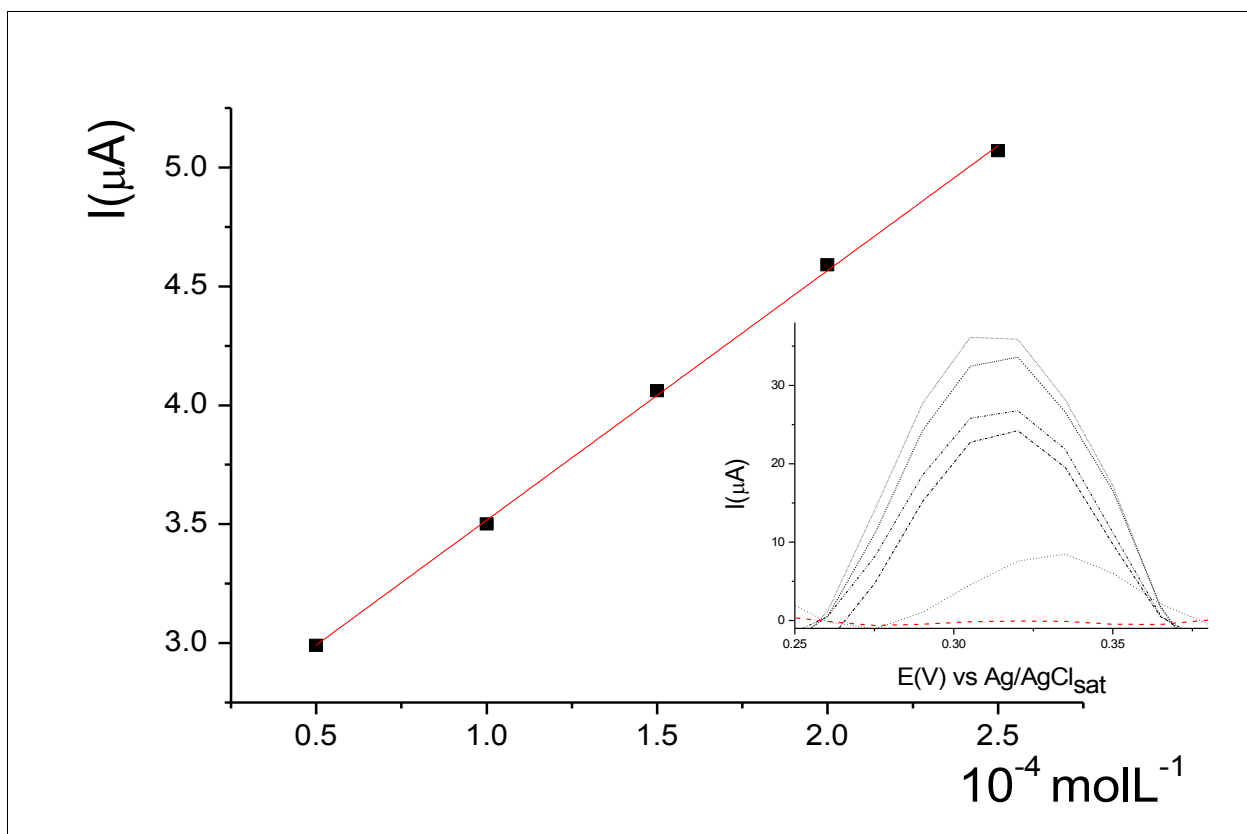


Figura 20 Curva de calibração e voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes concentrações de catecol em solução tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7.0.

Finalmente, o biossensor PCMJ foi avaliado frente a diferentes substratos para PPO, apresentando melhor atividade para a hidroquinona e na sequência a catecol, pirogualol e guaiacol e muito baixa atividade para fenol e TMB (figura 21).

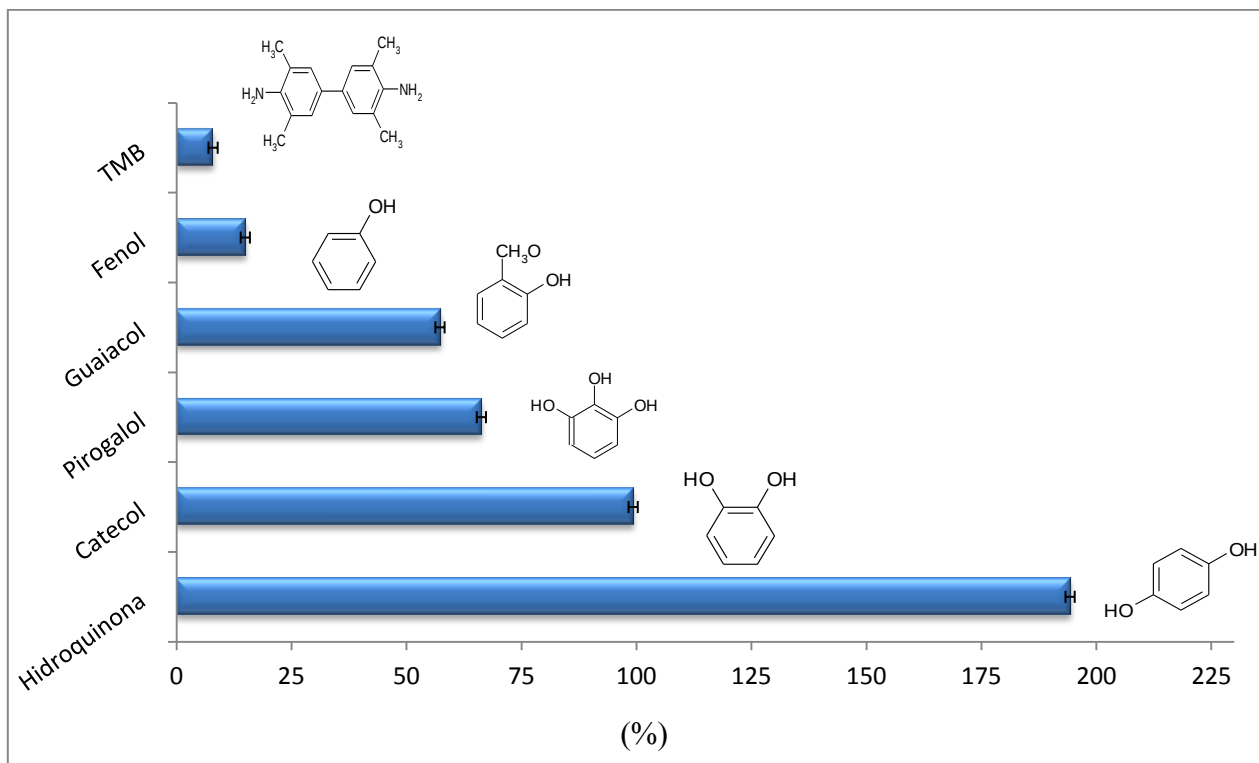


Figura 21 DPV – Atividades relativas (I_{pc}) apresentadas com a utilização do biosensor PCMJ para diferentes compostos fenólicos. Velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} . Potencial de varredura: 0,38 a - 0,13 V. Tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0. Considerando a resposta com o catecol com 100%.

As respostas apresentadas para PCMJ foram semelhantes a observada em ensaios em solução. Fato indicativo para PPO's com atividade catecolase.

4.6 ANÁLISE DE EFLUENTES

Em efluentes industriais, podem ser encontrados diversos tipos de poluentes fenólicos, *i.e.* corantes, fármacos, solvente, sendo que alguns podem apresentar atividade mutagênicas e/ou carcinogênicas, bem como serem persistentes no meio. Logo o monitoramento por técnicas *in situ* de alta sensibilidade, é de grande importância. Os fenóis são classicamente detectados por espectrofotometria, de modo que a quantificação espectrométrica da quantidade de fenol total foi realizada para fins de comparação. O valor médio encontrado para fenóis totais na amostra real

foi de $7,3 \text{ mgL}^{-1} \pm 0,3$. Valor este alto, e explicado pelo alto índice de descarte deste poluente em seus efluentes, pois na indústria utilizam-se fenóis para desinfecção da linha de produção e o resíduo gerado é lançado na ETE.

A fim de se avaliar o percentual específico de catecol, o biossensor PCMJ foi aplicado na amostra anteriormente citada. Para tanto, utilizou-se condições conforme as descritas para amostras utilizadas na otimização do método. Entretanto, na DPV da amostra real utilizando o biossensor com PCMJ não apresentou nenhum pico referente à redução de quinonas oxidadas enzimaticamente.

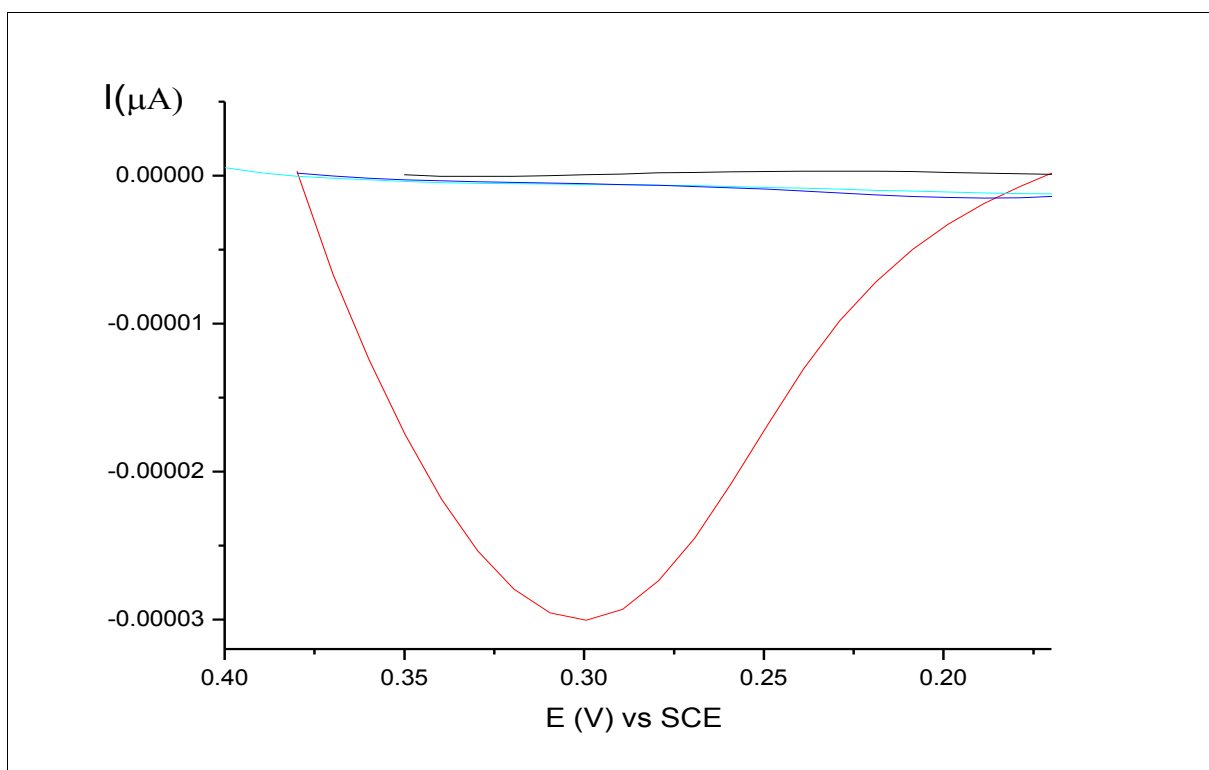


Figura 22 DPV obtidos para Tampão fosfato $0,01 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 (----); efluente com PC (----) e PCMJ (----) e solução contendo catecol $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$ com PCMJ (---). Amplitude de pulso 50 mV, faixa 0,4 a 0,1 V, 20 mV.s^{-1} .

Pode-se inferir que o EPJ seja rico em PPO que tenham maior afinidade enzimática à difenóis. Fato este condizente com ensaios em solução e PCMJ frente a diversos analitos (Figura 20). Esta evidencia esta também em acordo com a literatura, já que é descrito que extratos vegetais possuem maior atividade de difenolases em relação à fenolases, podendo esta razão ser

de 40 para 1. Outrossim, ressalta-se a necessidade de estudo de interferentes e/ou inibidores enzimáticos, sabendo-se que agentes quelantes e alguns fármacos são inibidores de PPO e que poderiam estar presentes como contaminantes da análise voltamétrica, tendo em vista que a amostra não teve tratamento prévio.

CAPITULO 5 – CONCLUSÕES

O biossensor modificado com extrato enzimático contendo PPO apresentou bom desempenho na determinação de compostos fenólicos em amostras laboratoriais. Assim foi comprovada a viabilidade do uso de extrato enzimático de sementes de jatobá, que são de fácil obtenção, baratos e abundantes na natureza, porém, serão necessários estudos mais detalhados sobre os inibidores enzimáticos, cinética e o fracionamento do extrato para o estudo de cada fração com atividade, encontrado na eletroforese do EPJ.

Os estudos bioquímicos do EBJ e EPJ demonstraram que a parcial purificação com sulfato de amônia elevou a concentração enzimática no extrato, mesmo tendo diminuído a quantidade de proteínas. A atividade do EPJ decaiu após 20 dias de armazenamento.

No perfil protéico, o gel apresentou 6 bandas fortes das quais 3 valores de peso molecular já foram encontrados como sendo de PPO.

A aplicação do biossensor no efluente de industria farmacêutica, indicou ausência de difenóis orto e para dissustituídos.

Sugestões para estudos futuros

Para se ter uma caracterização completa e inequívoca do biossensor faz-se necessário que:

Estudo cinético

Relação de atividade enzimática no UV-visível *versus* atividade de resposta eletroquímica utilizando CV e DPV. Estudar qual a relação existente entre a concentração enzimática e o I_{pc} do composto fenólico. Estudar uma possível equação de velocidade de reação da relação entre a concentração da enzima *versus* concentração do composto fenólico.

Estudo de inibidores e interferentes na catálise enzimática e nas análises voltamétricas

Conhecer inibidores e interferentes na análise dos compostos fenólicos

Estudo de parâmetros eletroquímicos

Utilizar outros métodos eletroquímicos para análise de compostos fenólicos utilizando o EPJ.

Para além da construção do protótipo do biossensor de acordo com os resultados da pesquisa preliminar e da verificação de pontos em que o seu desempenho pode ser melhorado, outros propósitos para o futuro, de carácter mais global apresentam-se com o fim desta dissertação.

REFERÊNCIAS

- AHUJAA, T., MIRA, I. A., KUMARA, D., RAJESH; **Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications**; Biomaterials 28, p. 791–805, 2007
- AYDEMIR, T. **Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads**. Food Chemistry, Vol. 87, p. 59-67, 2004
- BRADFORD, M., **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dyes binding**. Analytical Biochemistry, Vol. 72, p. 248-254, 1976
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357** de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, 18 mar. 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/resO5/res357O5.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2010
- BRITTO, J. M. E RANGEL, M. C.; **Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais**; Química Nova, Vol. 31, No. 1, p. 114-122, 2008
- BUSCA, G., BERARDINELLI, S., RESINI, C. E ARRIGHI, L.; **Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments**; Journal of Hazardous Materials, Vol. 160, p. 265–288, 2008
- CARAMORI, S. S., LIMA, C. S. L. e FERNANDES, K. F.; **Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas**; Brazilian archives of biology and technology; Vol.47, No. 2, p. 253-259, 2004
- CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. V. M.; FERNANDES, K. F. **Procedimento eficiente na inibição do escurecimento de guariroba (*Syagrus oleraceae*, Becc) durante processamento e armazenamento**. Agronomy, Vol. 25, No. 2, p. 253-258, 2003

CARVALHO, P. E. R.; **Jatobá-do-Cerrado *Hymenaea stigonocarpa***; Circular Técnica da Embrapa, Colombo, PR Novembro, 2007

CHANG, C.; ZHANG, H.P.; XU, J.; YOU, M. S.; LI B. Y.; LIU, G. T. **Variation in two PPO genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat.** Euphytica, Vol.144, No. 1-2, p. 181-193, 2007

CHAZARRA, S.; CABANES, J.; ESCRIBANO, J.; GARCIA-CARMONA, F. **Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS.** Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1339, p. 297-303, 1997

CHRISTOPHERSEN, M. J. E CAT-DWELL, T. J.; **Determination of total phenols in waters and wastewaters using flow injection with electrochemical detection; an alternative to the standard calorimetric procedure;** Analytica Chimica Acta 323, p. 39-46, 1996

CONCELLON, A., ANÓN, M. C., E CHAVES, A. R.; **Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature;** Food Chemistry 88, p. 17–24, 2004

DE LIMA, F., LUCCA, B. G., BARBOSA, A. M. J., FERREIRA, V. S., MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C., VIEIRA, I. C.; **Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination.** Enzyme and Microbial Technology 47(4), p. 153-158, 2010

DELICADO, E. N., MEGÍAS, M. S., LOPEZ, A J. P., NICOLÁS, J. M. L.; **Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape;** Food Chemistry 100, p. 108–114, 2007

DONG, S. E CHEN, X.; **Some new aspects in biosensors;** Reviews in Molecular Biotechnology 82, p. 303-323, 2002

EATON, A. D., CLESCERI, L. S. e GREENBERG, A. E.; **Standard methods for the examination of water and wastewater**; American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington, 19^o ed., p.5-36, 1995

EICKEN, C., ZIPPEL, F., KARENTZOPOULOS, K. B., e KREBS, B.; **Biochemical and Spectroscopic Characterization of Catechol Oxidase from Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*) Containing a Type-3 Dicopper Center**. FEBS Letters, Vol. 436, p. 293-299, 1998

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. **Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática**. Química Nova, Vol. 25, p. 455-464, 2001

FERREIRA, D. C. M., MELLO, L. D., MENDES, R. K., KUBOTA, L. T.; **Biosensors for fruit and vegetable processing**, Enzymes in Fruit and Vegetable Processing, p. 313-340, 2010

FORTEA, M. I.; LÓPEZ-MIRANDA, S.; SERRANO-MARTÍNEZ, A.; CARREÑO, J.; NÚÑEZ-DELICADO, E., **Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless)**. Food Chemistry, Vol. 113, p. 1008-1014, 2009

FREIRE, R., DURAN, N. e KUBOTA, L.; **Electrochemical Biosensor-Based Devices for Continuous Phenols Monitoring in Environmental Matrices**. Journal Brazilian Chemical Society, Vol. 13, No. 4, p. 456-462, 2002

GIL, E. S., MULLER, L., SANTIAGO, M. F. e GARCIA, T. A.; **Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds**; Portugaliae Electrochimica Acta, Vol. 27(3), p. 215-225, 2009

GUELL, M., e SIEGBAHN, P. E. M.. **Theoretical Study of the Catalytic Mechanism of Catechol Oxidase**. Journal Biology and Inorganic Chemistry, Vol. 12, p. 1251-1264, 2007

GUO, L.; MA, Y.; SHI, J.; XUE, S. **The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Food Chemistry, Vol. 117, p. 143-151, 2009

HALPIN, B.; PRESSEY, R.; JEN, J.; MONDY, N. **Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*)**. Journal of Food Science, Vol. 54, p. 644-649, 1989

JIMENEZ, M. e CARMONA, F. G.; **The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase**; Phytochemistry, Vol. 42, No. 6, p. 1503-1509, 1996

KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. **Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*)**. Food Chemistry, Vol. 74, p. 147-154, 2001

KLABUNDE, T., EICKEN, C., SACCHETTINI, J. C. E KREBS, B.; **Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center**; Nature Structure Biology, Vol. 5, p. 1084-1090, 1998

KISSINGER, P. T. **Biosensors - a perspective**. Biosensors and Bioelectronics, 20, p. 2512-2516, 2005

LAEMMLI, U. K., **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, Vol. 227, p. 680-685, 1970

LIMA, A.W.O.; **Desenvolvimento de métodos analíticos em sistemas de soluções em fluxo empregando polifenol oxidase naturalmente imobilizada sobre tecidos vegetais**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

LUPETTI, K. O., RAMOS, L. A. e FATIBELLO-FILHO, O.; **Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo**

com extrato bruto de abacate (*Persea americana*); Quimica Nova, Vol. 26, No. 2, p. 197-201, 2003

MARQUES, L.; FLEURIET, A.; CLEYET-MAREL, J. C.; MACHEIX, J. J. **Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion**. Phytochemistry, Vol. 36, p. 1117-1121, 1994

MARQUES, L., FLEURIET, A. e MACHEIX, J, **Characterization of multiple forms of polyphenol oxidase from apple fruit**. Plant Physiological Biochemistry, Vol. 33, 193–200, 1995.

MARRI, C.; FRAZZOLI, A.; HOCHKOEPLER, A.; POGGI, V.; **Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers**. Phytochemistry, Vol. 63, p. 745-752, 2003

MATAVELI, L. R. V., ANTUNES, N. J., BRIGAGAO, M. R. P. L., SCHMIDT DE MAGALHAES, C., WISNIEWSKI, C., LUCCAS, P. O. **Evaluation of a simple and low cost potentiometric biosensor for pharmaceutical and in vivo adrenaline determination**. Biosensors & Bioelectronics 26(2), p. 798-802, 2010

MATUDA, T. G. e NETTO, F. M., **Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.)**. Ciência Tecnologia de Alimentos, Vol.25, No.2, p. 353-357, 2005

MAZZAFERA, P. E ROBINSON, S. P.; **Characterization of polyphenol oxidase in coffee**; Phytochemistry 55, p. 285-296, 2000

MAYER, A. M. **Polyphenol oxidase in plants - recent progress**. Phytochemistry, Vol. 26, p. 11-20, 1987

MAYER, A. M., **Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review**; Phytochemistry 67, p. 2318–2331, 2003

MOORE, B. M.; FLURKEY, W. H. **Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase: Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase.** The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, p. 4982-4988, 1990

MULLER, L.; **Biossensor a base de lacase (*pycnoporus sanguineus*) para análise ambiental de compostos fenólicos;** Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S. KANEKO, K. **Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 43, No. 5, p. 1115-1121, 1995

NELSON, D. L. E COX, M. M.; **Lehninger, Principios de Bioquímica.** 3 Ed. Sarvier, São Paulo. p. 189-221, 2002

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. **Enzymatic browning reactions in apple and apple products.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition., Vol. 34, p. 109-157, 1994

ONNERFJORD, P., EMÑUS, J., VARGA, G. M., GORTON, L., ORTEGA, F. E DOMINGUEZ, E.; **Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols ;** Biosensors & Bioelectronics 10, p. 607-619, 1995

ORTEGA, F., DOMINGUEZ, E., PETTERSSON, G. E GORTON, L.; **Amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds using a tyrosinase graphite electrode in a flow injection system.** Journal Biotechnology, 31, p. 289-300, 1993

ÖZEL, A.; COLAK, A.; ARSLAN, O.; YILDIRIM, M. **Purification and characterization of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents.** Food Chemistry, Vol. 119, p. 1044-1049, 2010

PINTO, M. S. T.; SIQUEIRA, F. P.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. S. **A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings**. *Phytochemistry*, Vol. 69, p. 2297-2302, 2008

PORTACCIO, M.; DI MARTINO, S.; MAIURI, P.; DURANTE, D.; DE LUCA, P. LEPORE, M.; BENCIVENGA, U.; ROSSI, S.; DE MAIO, A. e MITA, D. G. **Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, p. 97–102, 2006

RAPEANU, G.; LOEY, A. V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. **Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*)**. *Food Chemistry*, Vol. 94, p. 253-261, 2006

RASOOLY, A. “**Biosensor technologies**”, *Methods* 37: 1-3, 2005 ROSATTO, S. S., FREIRE, R. S., DURÁN, N. E KUBOTA, L. T.; **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**; *Quimica Nova*, Vol. 24, No. 1, p. 77-86, 2001

RYAN, B. J.; Ó’FÁGÁIN, C. **Effects of single mutations on the stability of horseradish peroxidase to hydrogen peroxide**. *Biochimie*, Vol. 89, p. 1029-1032, 2007

SANCHEZ-FERRER A, RODRIGUEZ-LOPEZ JN, GARCIA-CANOVAS F, GARCIA-CARMONA F. **Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism**. *Biochimica Biophysica Acta* 1247, p. 1–11, 1995

SHLEEV, S., TKAC, J., CHRISTENSON, A., RUZGAS, T., YAROLOV, A. I., WHITTAKER, J. W., LO GORTON; **Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes**; *Biosensors and Bioelectronics* 20, p. 2517–2554, 2005

SHIN, R.; FRODERMAN, T.; FLURKEY, W. H. **Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase**. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 1, p. 15-21, 1997

SIGNORI, C. A.; FATIBELLO-FILHO, O. ; **Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*)**; Química Nova 17, p. 38, 1994

SIMSEK, S.; YEMENICIOGLU, A. **Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms**. Process Biochemistry, Vol. 42, p. 943-950, 2007

STTAFFORD, H. A.; DRESLER, S. **4-hydrocinnamic acid hydroxylase and polyphenolase activities in *Sorghum vulgare***. Plant Physiology,, Vol. 19, p. 590-595, 1972

STETTER, J. R.; PENROSE, W. R. e YAO, S. **Chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS**. Journal of The Electrochemical Society, p. S11-S16, 2003

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5. ed. Porto Alegre/São Paulo: Artmed – Bookman, p. 806, 2002

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. **Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition., Vol. 15, p. 49-127, 1981

VIEIRA, I. C., FATIBELLO-FILHO, O., GRANATO, A. C. E LUPETTI, K. O., **Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante**; Eclética Química., São Paulo, 29(2):p. 7-14, 2004

WANG, J.; CONSTABEL, C. P. **Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar**. Phytochemistry, Vol. 64, p. 115-221, 2003

WANG, J. **Analytical Eletrochemistry**, 2. ed. New York: VCH Publishers,p. 205, 2001

WANG, J., LIN, M. S.; **Mixed plant tissue carbon paste bioelectrode**; Analytical Chemistry 60, p. 1545, 1998

WANG, P.; LIU, M.; KAN, J. **Amperometric phenol biosensor based on polyaniline**. Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.140, p. 344-350, 2009

WENG, Z.; HENDRICKX, M.; MAESMANS, G.; GEBRUERS, K., TOBBACK, P. **Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase**. Journal of Food Science, Vol. 56, p.567-570, 1991

YANG, C. P.; FUJITA, S.; ASHRAFUZZAMAN, M. A.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. **Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp**. Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 48, p. 2732-2735, 2000

YORUK, R. e MARSHALL, M.R, **Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review**. Journal Food Biochemistry Vol 27, p. 361–422, 2003.

YEMENICIOGLU, A.; OZKAN, M.; CEMEROGLU, B. **Thermal Stabilities of peroxidases from fresh pinto beans**; Journal of Food Science, Vol. 63, p. 987-990, 1998

ZHANG, S. WRIGHT, G. e YANG, Y.; **Materials and techniques for electrochemical biosensor design and Construction**; Biosensors & Bioelectronics 15, p. 273–282, 2000